



HAL
open science

Effets délétères de l'hypoxie intermittente associée au syndrome d'apnées obstructives du sommeil sur la croissance et la dissémination métastatique du cancer du sein : implication de la voie HIF1/VEGF/Endothéline

Mélanie Minovés-Kotski

► To cite this version:

Mélanie Minovés-Kotski. Effets délétères de l'hypoxie intermittente associée au syndrome d'apnées obstructives du sommeil sur la croissance et la dissémination métastatique du cancer du sein : implication de la voie HIF1/VEGF/Endothéline. Médecine humaine et pathologie. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2021. Français. NNT : 2021GRALV001 . tel-03281122

HAL Id: tel-03281122

<https://theses.hal.science/tel-03281122v1>

Submitted on 8 Jul 2021

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Physiologie- Physiopathologie - Pharmacologie**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Mélanie MINOVES-KOTZKI

Thèse dirigée par le **Pr. Diane GODIN-RIBUOT, UFR Médecine Pharmacie, Université Grenoble Alpes**, et co encadrée par le **Dr. Véronique JOSSERAND, Université Grenoble Alpes**

Préparée au sein du **Laboratoire Hypoxie et Physiopathologie Cardiovasculaires et Respiratoires -U1042- UGA**

dans **l'École Doctorale de Chimie et Sciences du Vivant**

Effets délétères de l'hypoxie intermittente associée au syndrome d'apnées obstructives du sommeil sur la croissance et la dissémination métastatique du cancer du sein : implication de la voie HIF1/VEGF/Endothéline

Thèse soutenue publiquement le 07/01/2021 devant le jury composé des :

Monsieur le Professeur Jean-Louis Pépin, Président du Jury
PU-PH, Université Grenoble Alpes, CHU Grenoble Alpes

Madame le Professeur Carole Planes, Rapporteur
PU-PH, Université Paris 13, Hôpital Avicenne (APHP)

Monsieur le Professeur Wojciech Trzepizur, Rapporteur
PU-PH, Université d'Angers, CHU d'Angers

Madame le Docteur Sabine Bailly, Membre
Directeur de recherches, CEA/ Université Grenoble Alpes



Remerciements

Au Pr Jean-Louis Pépin, de me faire l'honneur de présider cette thèse et de juger mon travail. Merci également pour vos conseils éclairés au cours de ces dernières années.

J'exprime ma gratitude au Pr Carole Planes, au Pr Wojciech Trzepizur, et au Dr Sabine Bailly pour votre estimable présence dans ce jury de thèse.

Je tiens également à remercier le Pr Carole Planes et le Pr Wojciech Trzepizur, de l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant d'être rapporteurs de cette thèse.

Merci au Pr Diane Godin-Ribuot, ma directrice de thèse, qui m'a accueillie au sein de son équipe et qui m'a fait confiance dès mon stage de master 2. Je suis également reconnaissante pour son aide et son soutien, en particulier concernant mon évolution et mon parcours professionnel toutes ces dernières années. Sans elle je n'en serais pas là.

Au Dr Véronique Josserand, pour avoir accepté de co-encadrer ma thèse, pour ton accueil, ta gentillesse, tes remarques constructives et ton expertise dans le domaine de l'imagerie du petit animal. Merci de m'avoir accompagné au bout de cette thèse.

Merci à tous les membres l'équipe du laboratoire Hp2, pour votre accueil et votre accompagnement durant toutes ces années.

Merci tout particulièrement à Anne pour ton soutien sans faille, tes encouragements, les discussions scientifiques et les conseils avisés sans lesquels cette thèse n'aurait pas été possible.

Au personnel technique et administratif, dont la présence est essentielle au fonctionnement du laboratoire, merci pour votre compétence. Ma reconnaissance se dirige vers Emeline Lemarié, Brigitte Gonthier, Sophie Bouyon pour votre aide technique au cours de cette thèse mais surtout pour votre attention bienveillante.

Merci à mes co-thésards : Jessica, Emmanuelle, Guillaume, Maximin, Raphael, Lydie, Olfa, Clément et tous les autres pour les moments partagés.

A l'équipe OPTIMAL, pour votre expérience et votre aide durant les manip mais aussi pour votre bonne humeur tellement communicative !

A l'ensemble de l'équipe des essais cliniques, pour votre accueil chaleureux, votre bienveillance et votre soutien. Merci pour tous ces moments partagés et ceux qui viendront je l'espère !

A ma famille et mes amis, merci pour tous ces précieux instants partagés ensembles.

A Sylvain, pour la famille que nous avons construite, pour le duo fusionnel et inébranlable que l'on forme dans le travail comme dans la vie personnelle. Merci pour ton amour, ta présence et ton soutien inconditionnels.

A mes deux filles, pour tous ces moments de bonheur qui jalonnent notre quotidien et qui m'apportent tant de force, d'énergie et de joie. A toi mon Emma, qui a tant d'amour et d'affection à donner, merci pour ta sensibilité, tes rires, tes regards malicieux et ta curiosité. Te voir grandir et t'épanouir est la plus grande des réussites. A toi ma Naïs, pour ta joie de vivre et tes éclats de rire, pour tes danses et tes chansons, pour ton espièglerie et ton tempérament de feu qui renferment un océan de tendresse et d'amour.

A mes parents, merci d'avoir toujours crus en moi, et de m'avoir accompagnée, encouragée dans tous mes choix. Pour tous les moments passés en famille et ceux qui suivront...Je serai toujours présente pour vous.

A ma nièce et mon neveu préférés, à Léa, Cyril, Nelly et POK merci pour l'affection et l'amour que vous me portez et merci de partager notre quotidien.

Merci à Fernand, Karen et Logane pour vos témoignages d'affection et votre présence malgré la distance qui nous sépare.

A ma famille de cœur, Sophie, Romain, Julie, Mat pour ces merveilleuses années voire décennies d'amitiés.

Table des matières

Contents

Liste des abréviations	7
Liste des figures	8
Liste des tables.....	10
INTRODUCTION.....	11
A. Le cancer du sein en France et dans le monde en 2019	13
I. Données épidémiologiques	13
1. <i>Au niveau mondial</i>	<i>13</i>
2. <i>Au niveau de la France</i>	<i>14</i>
II. La prise en charge du cancer du sein	17
3. <i>Le diagnostic</i>	<i>17</i>
4. <i>Les stratégies thérapeutiques</i>	<i>18</i>
III. Facteurs de risque du cancer du sein	21
B. Le syndrome d'apnées obstructives du sommeil	25
I. Généralités	25
1. <i>Physiopathologie</i>	<i>25</i>
2. <i>Epidémiologie.....</i>	<i>28</i>
II. Facteurs de risque et conséquences du SAOS	30
1. <i>Facteurs de risque du SAOS</i>	<i>30</i>
2. <i>Conséquences des obstructions des voies aériennes induites par le SAOS</i>	<i>34</i>
III. Diagnostic et prise en charge du SAOS	38
1. <i>Le diagnostic du SAOS</i>	<i>38</i>
2. <i>La prise en charge du SAOS</i>	<i>40</i>
C. Le SAOS comme facteur de risque du cancer	45
I. La surmortalité des patients atteints de SAOS par cancer : un indice épidémiologique.....	45
II. Cancer et hypoxie intermittente	49
1. <i>Cancer et Hypoxie</i>	<i>49</i>
2. <i>Hypoxie intermittente – Stress Oxydant – Inflammation – HIF-1</i>	<i>52</i>
3. <i>Hypoxie intermittente – Stress Oxydant – Inflammation – NF-κB</i>	<i>55</i>
III. SAOS, hypoxie intermittente et cancer du sein	57

D. Hypothèse et Objectif	62
APPROCHE EXPERIMENTALE.....	67
A. Mise au point d'un dispositif de cultures cellulaires exposées à l'Hypoxie Intermittente	68
I. Introduction	68
II. Résumé en Français	70
III. An innovative intermittent hypoxia model for cell cultures allowing fast pO ₂ oscillations with minimal consumption.	72
IV. Discussion	81
B. Exploration des effets de l'hypoxie intermittente sur le développement tumoral mammaire : étude préclinique sur modèles cellulaire et animal..	85
I. Introduction	85
II. Manuscrit	87
III. Discussion	118
RESULTATS PRELIMINAIRES ET PERSPECTIVES.....	132
A. Hypoxie intermittente, hypoxie cyclique et hypoxie continue	133
B. Exploration de l'oxygénation tissulaire mammaire saine et tumorale.....	139
CONCLUSION.....	147
BIBLIOGRAPHIE.....	151
TITRES ET TRAVAUX ANNEXES.....	166
1. Editorial European Respiratory Journal	167
2. Manuscrit du protocole de recherche ECHAPs	172

Liste des abréviations

5-HT2 : Récepteur 5-hydroxytryptamine de type 2

5-HT3 : Récepteur 5-hydroxytryptamine de type 3

AASM : Académie Américaine de la Médecine du Sommeil

ABD : Mouvements abdominaux

AHI : Apnea hypopnea index

ATP : Adénosine-triphosphate

BL : Valeur de base

BRCA1 : Gène breast cancer 1 CAMK : Protéine kinase

Ca²⁺/calmodulinedépendante

CHC : Carcinome hépatocellulaire

CHU : Centre hospitalier et universitaire

CRB : Centre de ressources biologiques

ECG: Electrocardiogramme

EEG: Electroencéphalogramme

EMG: Electromyogramme

EOG: Electro-oculogramme

ER+ : Récepteur alpha à l'œstrogène

ERBB2 : Gène du récepteur HER2

ERO : Espèces réactives de l'oxygène

ET-1 : Endothéline-1

ETA : Récepteur A de l'endothéline

ETB : Récepteur B de l'endothéline

HAS : Haute autorité de santé HER2 : Récepteur au facteur de croissance épidermique 2

HR : Expression d'un récepteur hormonal, à l'œstrogène et/ou à la progestérone

HI: Hypoxie intermittente

HC: Hypoxie continue

HIF-1: Hypoxia inducible factor 1 HIF-1 α : Hypoxia-inducible Factor 1 α subunit

HIF-1 β : Hypoxia-inducible Factor 1 β subunit

HIF-2: Hypoxia inducible factor 2

IAH: Index d'apnées Hypopnées

IDO : Index de désaturation en oxygène

IH : Intermittent hypoxia

I κ B : complexe inhibiteur de NF κ B

IL-6 : Interleukine 6

IL-8 : Interleukine 8

IMC : Indice de masse corporelle INSERM : Institut national de la santé et de la recherche médicale LEG : Mouvements des jambes mTOR : mammalian Target Of Rapamycin MMP : Métalloprotéinase matricielle

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate NAFLD : Nonalcoholic fatty liver disease = stéatose hépatique non-alcoolique NASH : Non alcoholic steatohepatitis (Stéatohépatite métabolique)

NOX: NADPH oxydase

NF- κ B : Nuclear factor-kappa B

NO : Monoxyde d'azote

NOS : Nitric-oxide synthase

ODI : oxygen desaturation index

OAM : Orthèse d'avancée mandibulaire

O₂ : Oxygène

PKC : protéine kinase C

PLC : Phospholipase C

PPC : Pression positive continue

PSG : polysomnographie

PSQI : Pittsburgh sleep quality index

ROS : Reactive oxygen species

SaO₂ : Saturation en oxygène SAOS : Syndrome d'apnées obstructives du sommeil

SAS : Syndrome d'apnées du sommeil

SpO₂ : Saturation pulsée en oxygène

SREBP : Sterol Regulatory Element-Binding Protein HO : Mouvements thoraciques

TNF α : Tumor necrosis factor alpha Tsat 90 % : Temps passé avec une saturation inférieure à 90 VAS : voies aériennes supérieures

VEGF : Vascular endothelial growth factor

Liste des figures

Figure 1 : Représentation de la répartition des cas et des décès pour les 10 cancers les plus courants en 2018, dans le monde chez les femmes.....**13**

Figure 2 : Représentation de l'évolution du taux d'incidence des cancers du sein, du col de l'utérus et de l'anus, par âge, chez la femme entre 1990 et 2018 en France métropolitain....**15**

Figure 3 : Représentation de survie relative à 5 ans de 25 localisations de cancer en fonction de leur incidence annuelle en France.....**16**

Figure 4 : Carcinome canalaire in situ et Carcinome lobulaire invasif.....**17**

Figure 5 : Représentation des évènements respiratoires en fonction de la gravité du collapsus pharyngé.....**26**

Figure 6 : Modifications maxillo-faciales et des tissus mous dans le SAOS.....**26**

Figure 7 : Représentation des dix pays pour lesquels l'estimation de patients souffrant d'apnées obstructives du sommeil est la plus importante.....**29**

Figure 8 : Représentation du rôle de l'obésité dans le SAOS.....**31**

Figure 9 : Relation entre la perte de poids ($\geq 5\%$, $< 5\%$) et le changement d'AHI.....**32**

Figure 10 : Prévalence des troubles respiratoires du sommeil chez les hommes et les femmes et selon le statut ménopausique des femmes.....**34**

Figure 11 : Résumé des mécanismes reconnus pour participer aux effets délétères de l'hypoxie intermittente chronique.....**37**

Figure 12 : Exemple de tracé de polysomnographie nocturne représentant la fragmentation du sommeil (micro éveils visibles sur l'EEG), les fluctuations de la saturation artérielle en oxygène, les efforts respiratoires thoraco-abdominaux.....**38**

Figure 13 : Au cours du collapsus pharyngé induisant une apnée, la langue bloque le passage de l'air (à gauche).....**42**

Figure 14 : Taux de survie des patients inclus dans la cohorte Wisconsin entre 1989 et 2011 en fonction de la présence et de la sévérité d'un syndrome d'apnées du sommeil estimée par l'index d'apnées-hypopnées (AHI)**45**

Figure 15 : L'association entre SAOS et mortalité par cancer.....	49
Figure 16 : Hypothèses physiopathologiques sur le lien entre SAOS et cancer.....	51
Figure 17 : Figure représentant les différentes voies de signalisation intervenant dans l'expression et l'activité de HIF-1 en réponse à l'HI.....	53
Figure 18 : Activation différentielle de HIF-1 par hypoxie intermittente (IH) et continue (CH) dans les cellules de phéochromocytome PC12.....	53
Figure 19 : Représentation de l'activité NF-κB. NF-κB existe sous une forme inactive liée à l'inhibiteur IκB, qui retient le NF-κB dans le cytoplasme.....	55
Figure 20 : Effets de l'hypoxie continue (CH) ou de l'hypoxie intermittente (IH) comparée à la normoxie (N) sur la migration et la prolifération des cellules MDA-MB-231.....	58
Figure 21 : Effets protecteurs et délétères de l'hypoxie intermittente (HI) liés à des mécanismes adaptatifs à l'échelle de l'organisme entier.....	59
Figure 22 : Interactions entre la signalisation ET1 et la voie de signalisation HIF1α	64
Figure 23 : Hypothèse du macroenvironnement.....	66
Figure 24 : L'hypoxie continue augmente la prolifération et la migration des cellules cancéreuses du sein in vitro.....	136
Figure 25 : Le blocage non sélectif des récepteurs de l'endothéline limite l'effet de l'hypoxie continue sur la cicatrisation.....	137
Figure 26 . Effet de l'hypoxie intermittente sur l'oxygénation et la vascularisation de la glande mammaire controlatérale saine évaluée par imagerie photoacoustique	142
Figure 27 . Effet de l'hypoxie intermittente sur l'oxygénation et la vascularisation tumorale évaluée par imagerie photoacoustique.....	144
Figure 28 . Niveau d'hypoxie en fonction du volume tumoral.....	145

Liste des tables

Tableau 1 : Epidémiologie des tumeurs solides en France métropolitaine, chez la femme.....	14
Tableau 2 : Représentation de la prévalence, du pronostic et de la prise en charge thérapeutique du cancer du sein en fonction du type de récepteur exprimé par la tumeur.....	18
Tableau 3 : Prise en charge thérapeutique du cancer du sein en fonction des récepteurs exprimés.....	20
Tableau 4 : Sévérité du SAOS en fonction de l'index d'apnées-hypopnées (IAH).....	27
Tableau 5 : Principales molécules testées dans l'indication de SAOS.....	44
Tableau 6 : Incidence et densité d'incidence de cancers en fonction de la sévérité du syndrome d'apnées obstructives du sommeil.....	47
Tableau 7 : Niveaux d'oxygénation retrouvés dans les tissus en conditions physiologiques et dans certaines tumeurs.....	84

INTRODUCTION

A. Le cancer du sein en France et dans le monde en 2019

I. Données épidémiologiques

1. Au niveau mondial

Les données internationales publiées par l’OMS indiquent que le cancer du sein représente la première cause de mortalité avant 70 ans dans les pays occidentaux (Bray et al., 2018). Au niveau mondial, le cancer du sein apparaît en seconde position en termes d’incidence avec 2 088 0849 nouveaux cas estimés en 2018 juste derrière le cancer du poumon (2 093 876 cas en 2018) et en 5^{ème} position en termes de mortalité avec un taux de mortalité de 6.6 % loin derrière le poumon cette fois (18.4 %). En revanche, lorsque l’on s’intéresse aux cancers dans la population féminine mondiale, le cancer du sein est en première position tant en termes d’incidence (24.2 % des nouveaux cas en 2018) que de mortalité (15.0 %) du fait de son incidence (Figure 1).

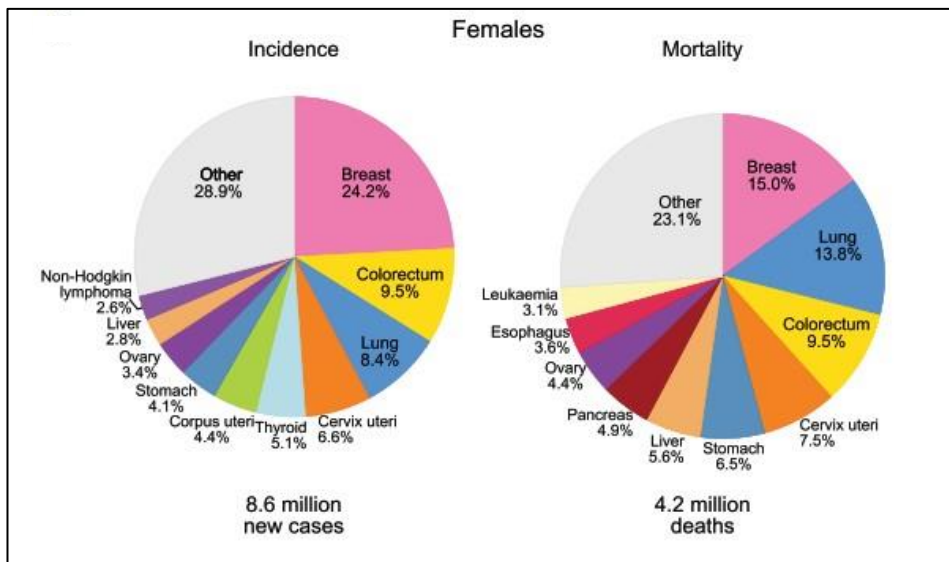


Figure 1 : Représentation de la répartition des cas et des décès pour les 10 cancers les plus courants en 2018, dans le monde chez les femmes. Pour chaque sexe, la surface du diagramme circulaire reflète la proportion du nombre total de cas ou de décès ; les cancers de la peau autres que le mélanome sont inclus dans la catégorie "autres"; d’après (Bray et al., 2018).

2. Au niveau de la France

A l'échelle nationale le cancer du sein représente, après le mélanome, le plus fréquent des cancers de la femme (Bray et al., 2018; Defossez et al., 2019). Une étude rétrospective publiée en Juillet 2019 a compilé toutes les données disponibles en France sur l'incidence et la mortalité par cancer toutes localisations confondues entre 1990 et 2018 (Defossez et al., 2019). Parmi les 382 000 nouveaux cas de cancers diagnostiqués en 2018, le rapport montre que, chez la femme, le cancer du sein arrive en tête avec 58 459 cas sur 177 433 nouveaux cas soit une proportion de 32.94 % (Tableau 1). Même s'il ne s'agit que d'une valeur estimée, le calcul étant fondé sur 25 ans de données, ce résultat ne doit pas être très éloigné de la réalité. Une analyse un peu plus détaillée montre que l'incidence du cancer du sein a augmenté dans toutes les classes d'âge entre 1990 et 1998 (Figure 2). Le cancer du sein est le plus fréquent chez la femme mais son incidence augmente peu.

Tableau 1 : Epidémiologie des tumeurs solides en France métropolitaine, chez la femme. Cas incidents / décès estimés, Taux d'incidence/de mortalité (TSM) par localisation en 2018 et tendance évolutives (1990-2018)

	Incidence				Mortalité			
	Situation en 2018		Variation annuelle moyenne (%) et [IC 95%]		Situation en 2018		Variation annuelle moyenne (%) et [IC 95%]	
	Nombre de nouveaux cas	Taux d'incidence ⁽¹⁾	1990-2018	2010-2018	Nombre de décès	Taux de mortalité ⁽¹⁾	1990-2018	2010-2018
Mélanome de la peau	7 627	14,2	2,7 [2,5 ; 3,0]	2,4 [1,9 ; 3,0]	840	1,0	0,2 [-0,1 ; 0,4]	-0,3 [-0,9 ; 0,3]
Côlon-rectum ⁽²⁾	20 120	23,9	0,0 [-0,1 ; 0,1]	0,0 [-0,3 ; 0,3]	7 908	6,9	-1,6 [-1,6 ; -1,5]	-1,6 [-1,8 ; -1,3]
Poumon ⁽³⁾	15 132	23,2	5,3 [5,1 ; 5,5]	5,0 [4,4 ; 5,5]	10 356	14,0	3,5 [3,4 ; 3,6]	3,0 [2,7 ; 3,2]
Corps de l'utérus ⁽⁴⁾	8 224	11,0	0,1 [-0,1 ; 0,3]	0,0 [-0,5 ; 0,4]	2 415	2,3	-0,5 [-0,6 ; -0,3]	0,4 [0,0 ; 0,8]
Sein	58 459	99,9	1,1 [1,0 ; 1,2]	0,6 [0,3 ; 0,9]	12 146	14,0	-1,3 [-1,4 ; -1,2]	-1,6 [-1,8 ; -1,4]
Thyroïde ⁽²⁾	8 065	18,5	4,4 [4,1 ; 4,6]	2,5 [1,9 ; 3,1]	227	0,2	-3,4 [-3,7 ; -3,0]	-2,8 [-3,7 ; -1,9]
Tous cancers	177 433	274,0	1,1 [1,1 ; 1,2]	0,7 [0,5 ; 0,9]	67 817	72,2	-0,8 [-0,8 ; -0,8]	-0,7 [-0,8 ; -0,6]

Le cancer du sein est associé à une mortalité importante en valeur absolue puisque 12 146 femmes sont décédées en 2018. Le taux de mortalité exprimé par le nombre de femmes décédées d'un cancer du sein par rapport au nombre total de personnes atteintes d'un cancer tout type de cancer confondu est de 14 % en 2018, ce qui est comparable à celui du cancer du poumon (Tableau 1). Le cancer du sein reste toutefois de bien meilleur pronostic que le cancer

du poumon comme en témoigne les données de survies à 5 ans en fonction de l'incidence du cancer (Figure 3). Le cancer du sein présente une survie à 5 ans > 80% vs < 20% pour le cancer du poumon. Une seconde étude d'ampleur menée cette fois sur la survie des patients atteints de cancers toutes localisations confondues a mis en évidence une amélioration de la survie nette à 5 ans dans le cancer du sein passant de 80 % des cas diagnostiqués en 1989 à 87 % pour ceux diagnostiqués en 2005 (Manus, 2019). La survie nette à 5ans représente la survie qui serait observée lorsque la seule cause de décès possible est la maladie étudiée. L'analyse détaillée des données par classe d'âge montre que la survie varie en fonction de l'âge au moment du diagnostic. En l'occurrence, le rapport établit que la survie nette passe de 94 % pour une femme de 45 ans à 85 % chez la femme de 80 ans.

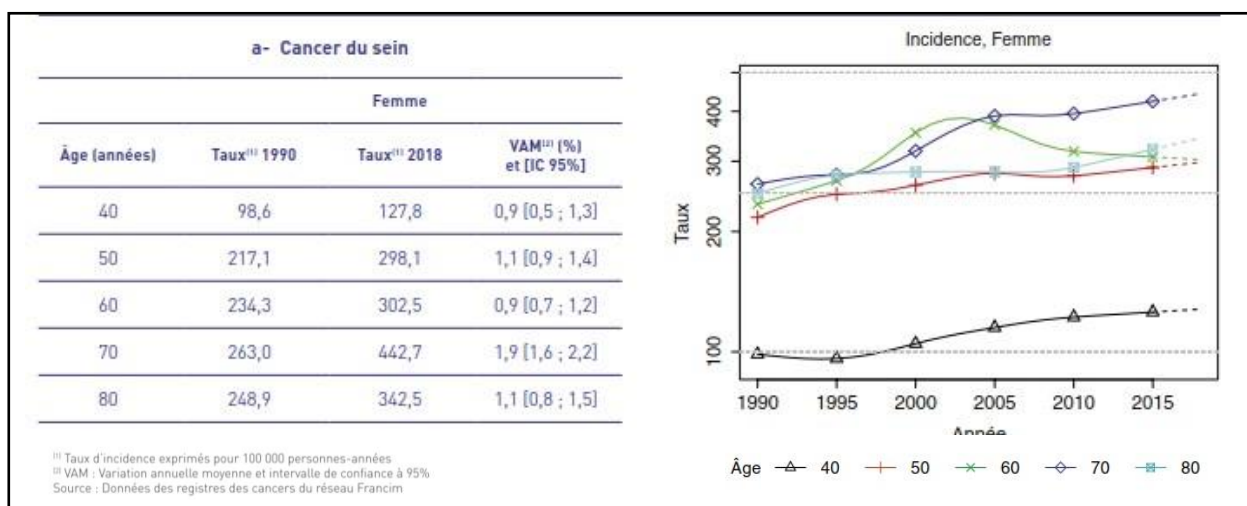


Figure 2 : Représentation de l'évolution du taux d'incidence des cancers du sein, du col de l'utérus et de l'anus, par âge, chez la femme entre 1990 et 2018 en France métropolitaine; d'après (Defossez et al., 2019).

Autre donnée d'importance, la probabilité de décès durant la première année après le diagnostic est très faible chez la femme de moins de 70 ans avec moins de 2 % de risque tandis qu'après 70 ans ce risque triple quasiment (5.5%). Les auteurs rappellent que cette différence de survie en fonction de l'âge est bien connue et qu'elle tient en partie au stade du cancer lors de sa découverte, souvent plus précoce chez les femmes qui ont bénéficié d'un dépistage à partir de 50 ans.

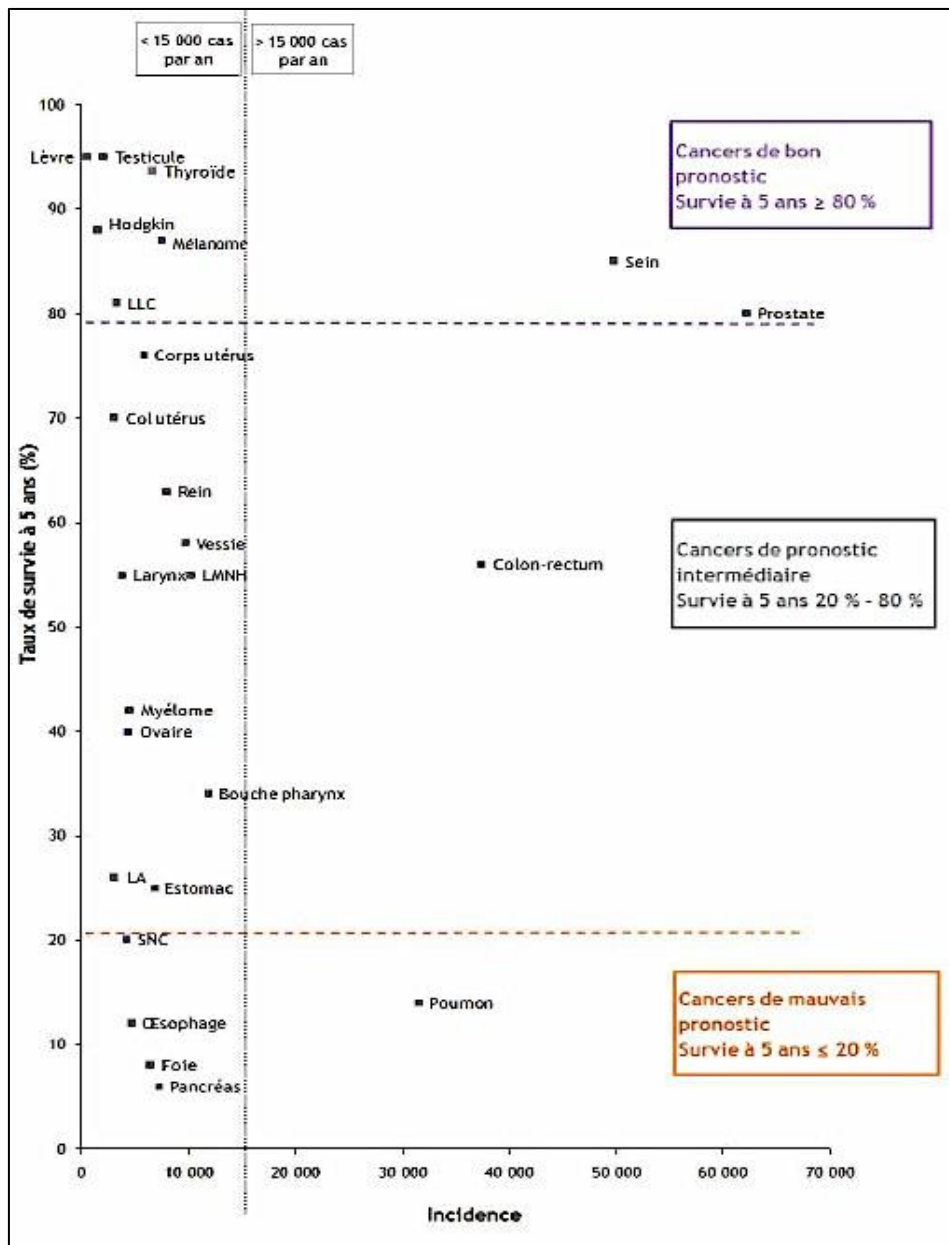


Figure 3 : Représentation de la survie relative à 5 ans de 25 localisations de cancer en fonction de leur incidence annuelle en France; d'après (Mazeau-Woynar et al., 2010).

II. La prise en charge du cancer du sein

3. Le diagnostic

Le diagnostic du cancer du sein est histologique comme pour la majorité des cancers. Le cas le plus fréquent est le cancer canalaire qui touche entre 50 et 75% des patients (Figure 4.A) suivi par le cancer lobulaire invasif (5 à 15%) (Figure 4.B). Environ 70% des cancers invasifs expriment le récepteur alpha à l'œstrogène (ER+) tandis que 20% des tumeurs expriment le récepteur au facteur de croissance épidermique 2 HER2 (gène ERBB2). Il existe également les cancers dits triple-négatifs qui eux n'expriment aucun récepteur spécifique ; ils concernent environ 15% des patients et sont associés à un moins bon pronostic que les cancers ER et HER2 positifs (Tableau 2). Ainsi, la présence ou l'absence de l'un ou l'autre de ces récepteurs orientera la stratégie thérapeutique mais donnera également une information sur le pronostic.

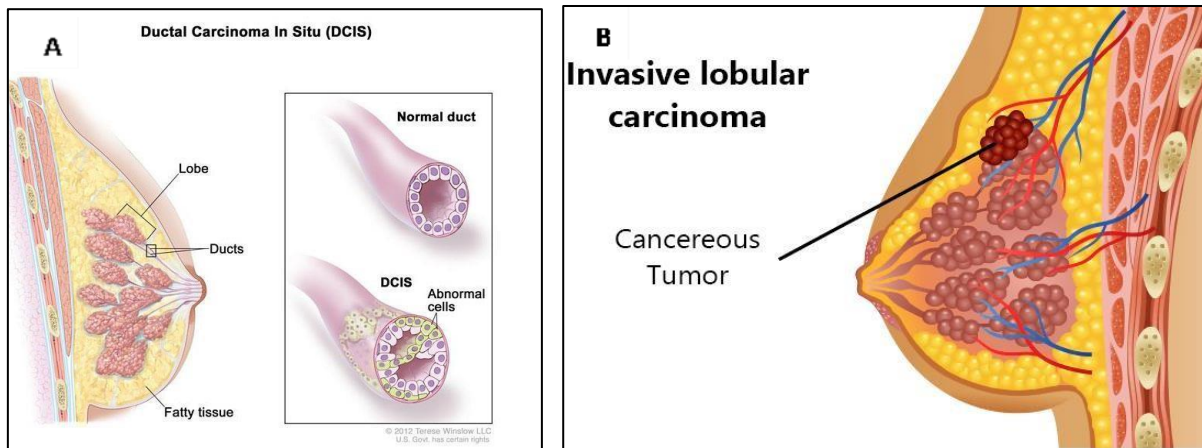


Figure 4 : A. Carcinome canalaire in situ et B. Carcinome lobulaire invasif ; d'après (www.medlife.com).

4. Les stratégies thérapeutiques

Sont résumés dans le Tableau 2 les principales différences d'expression biomoléculaire, de prévalence, de pronostic et de prise en charge thérapeutique entre les cancers HR+ (qui expriment un récepteur hormonal, à l'œstrogène et/ou à la progestérone), les cancers HER2+ et les triples négatifs.

Tableau 2 : Représentation de la prévalence, du pronostic et de la prise en charge thérapeutique du cancer du sein en fonction du type de récepteur exprimé par la tumeur : cancer exprimant le récepteur alpha à l'œstrogène (HR+), exprimant le récepteur HER2 (gène ERBB2), ou n'exprimant ni le récepteur à l'œstrogène ni le récepteur à la progestérone ni le récepteur HER2, cancer dit triple négatif ; d'après (Waks et al., 2019).

	Hormone Receptor (HR) +/ERBB2-	ERBB2+ (HR+ or HR-)	Triple-Negative
Pathological definition	≥1% Of tumor cells stain positive for estrogen receptor or progesterone receptor proteins	Tumor cells stain strongly (3+) for ERBB2 protein or ERBB2 gene is amplified in tumor cells. Approximately half of ERBB2+ tumors are also HR+	Tumor does not meet any pathologic criteria for positivity of estrogen receptor, progesterone receptor, or ERBB2
Molecular pathogenesis	Estrogen receptor α (a steroid hormone receptor) activates oncogenic growth pathways	The oncogene ERBB2, encoding ERBB2 receptor tyrosine kinase from the epidermal growth factor receptor family, is overactive	Unknown (likely various)
Percentage of breast cancer cases, % ¹²	70	15-20	15
Prognosis			
Stage I (5-y breast cancer-specific survival), % ^{13,a}	≥99	≥94	≥85
Metastatic (median overall survival) ^{14-16,b}	4-5 y	5 y	10-13 mo
Typical systemic therapies for nonmetastatic disease (agents, route, and duration)	<ul style="list-style-type: none"> • Endocrine therapy (all patients): <ul style="list-style-type: none"> • Tamoxifen, letrozole, anastrozole, or exemestane • Oral therapy • 5-10 y • Chemotherapy (some patients): <ul style="list-style-type: none"> • Adriamycin/cyclophosphamide (AC) • Adriamycin/cyclophosphamide/paclitaxel (AC-T) • Docetaxel/cyclophosphamide (TC) • Intravenous therapy • 12-20 wk 	<ul style="list-style-type: none"> • Chemotherapy plus ERBB2-targeted therapy (all patients): <ul style="list-style-type: none"> • Paclitaxel/trastuzumab (TH) • Adriamycin/cyclophosphamide/paclitaxel/trastuzumab ± pertuzumab (AC-TH±P) • Docetaxel/carboplatin/trastuzumab ± pertuzumab (TCH±P) • Intravenous therapy • 12-20 wk of chemotherapy; 1 y of ERBB2-targeted therapy • Endocrine therapy (if also hormone receptor positive) <ul style="list-style-type: none"> • Tamoxifen, letrozole, anastrozole, or exemestane • Oral therapy • 5-10 y 	<ul style="list-style-type: none"> • Chemotherapy (all patients): <ul style="list-style-type: none"> • AC • AC-T • TC • Intravenous therapy • 12-20 wk
^a Prognosis estimated from nearly 44 000 patients with breast cancer enrolled in the California Cancer Registry (2005-2008); stage I breast cancer defined by the American Joint Committee on Cancer staging manual anatomic staging table, 8th edition. 95% CIs for stage I 5-year breast cancer-specific survival		estimates are as follows: 98%-100% for HR+/ERBB2-, 83%-100% for ERBB2+ and 75%-98% for triple-negative.	
		^b Prognosis listed is from time of diagnosis of metastatic breast cancer.	

Dans le cancer non métastatique, les stratégies thérapeutiques doivent permettre d'éradiquer les cellules tumorales au niveau du sein et des ganglions lymphatiques tout en limitant le risque de dissémination métastatique. Le premier traitement local est la résection chirurgicale totale (mastectomie) ou l'excision partielle associée à un traitement par radiothérapie

adjuvante pour cibler le tissu tumoral restant. Le choix de la stratégie chirurgicale dépendra de plusieurs critères comme la présence de calcifications par exemple.

La chirurgie des ganglions lymphatiques axillaires est indépendante de la chirurgie mammaire. Elle est utile à la fois pour le diagnostic de cancer avec l'analyse histologique de tissu tumoral mammaire et permet de retirer d'éventuelles cellules malignes potentiellement invasives. La chirurgie seule n'est parfois pas suffisante et des séances d'irradiations aux rayons gamma peuvent être proposées en thérapie adjuvante. Il a notamment été montré que la radiothérapie réduisait de près de moitié le risque de récurrence en le faisant passer de 35% à 19.3% et améliorait significativement la survie à 10 et 15 ans. La radiothérapie est d'autant plus efficace que la tumeur est sévère et qu'une atteinte ganglionnaire est présente. Il existe différents protocoles de radiation mais que nous ne traiterons pas dans le cadre de ce manuscrit.

Dans le cancer du sein métastatique, le recours à une thérapie pharmacologique systémique est souvent indispensable pour toucher les différents foyers métastatiques secondaires dont les plus fréquents sont le foie, les os le poumon. Le choix du traitement pharmacologique dépend du sous-type de tumeur. Les principaux traitements utilisés en première et seconde intention sont résumés dans le Tableau 3.

Les cancers hormono-sensibles (HR+) sont pris en charge par une thérapie endocrinienne avec un anti-œstrogène oral comme le tamoxifène plus ou moins associé à un traitement inhibiteur de l'aromatase (anastrozole, exemestane, letrozole) capable de diminuer le taux circulant d'œstrogène en limitant sa synthèse hormonale. Il a été montré qu'un traitement endocrinien pris quotidiennement pendant 5 années permet de réduire de 50% le risque de récurrence et que l'efficacité du traitement est corrélée à la sévérité. La thérapie endocrinienne sera utilisable pour tous les cancers HR+ indépendamment du statut HER2. Les cancers HER2+ et HR- ne sont

pas sensibles à la thérapie endocrinienne. Les traitements des cancers de sous-type HER2+ associent plusieurs molécules. En première ligne on retrouve des cytotoxiques comme les taxanes (docetaxel, paclitaxel), le cyclophosphamide ou encore l'adriamycine ainsi que des immunothérapies dirigées directement contre HER2 comme le trastuzumab ou le pertuzumab. Enfin en cas de cancer triple-négatif il n'existe pas de traitement spécifique d'où un moins bon pronostic. Les principales chimiothérapies utilisées sont les taxanes, les sels de platine et les anthracyclines.

Tableau 3 : Prise en charge thérapeutique du cancer du sein en fonction des récepteurs exprimés ; d'après (Waks et al., 2019).

Breast cancer receptor subtype	Therapeutic approach	Notes
Hormone receptor positive (HR+) and ERBB2-	<p>Serial endocrine therapy-based regimens until disease is endocrine resistant, then transition to single-agent chemotherapy</p> <p>Initial line(s) of therapy Aromatase inhibitor plus CDK4/6 inhibitor^a Median progression-free survival = 24.8 mo Overall response rate = 53%-59%</p> <p>In some patients, CDK4/6 inhibitor may be reserved for second line</p> <p>Later lines of therapy Hormonal and/or targeted therapy Fulvestrant ± everolimus Exemestane + everolimus Tamoxifen Abemaciclib^b (if ≥1 line prior hormonal therapy and ≥1 line prior chemotherapy) Olaparib or talazoparib (if germline BRCA1/2 mutation) If resistant to multiple lines of hormonal therapy, transition to single-agent chemotherapy.</p>	In general, premenopausal women with HR+ metastatic breast cancer should undergo treatment to achieve medical or surgical menopause.
ERBB2+	<p>ERBB2-targeted agent combined with chemotherapy, or combined with endocrine therapy if HR+</p> <p>Initial line(s) of therapy Taxane^c + trastuzumab + pertuzumab^d Median progression-free survival = 18.5 mo Overall response rate = 80%</p> <p>Selected patients with HR+/ERBB2+ disease can receive endocrine therapy plus ERBB2-targeted therapy</p> <p>Ado-trastuzumab emtansine^e Median progression-free survival = 9.6 mo Overall response rate = 47%</p> <p>Later lines of therapy ERBB2-targeted agent plus chemotherapy or endocrine therapy if HR+ Trastuzumab + chemotherapy Trastuzumab + endocrine therapy Lapatinib + capecitabine</p>	ERBB2+ brain metastases are common (eventually occurring in up to 50% of patients with metastatic disease) and may be treated with both local (radiation, surgery) and systemic therapies. ^f
Triple-negative	<p>Single-agent chemotherapy</p> <p>Initial line(s) of therapy Single-agent chemotherapy^g Taxane Median progression-free survival = 4.5 mo Overall response rate = 36%</p> <p>Platinum Median progression-free survival = 3.1 mo Overall response rate = 31%</p> <p>Anthracycline</p> <p>Later lines of therapy Single-agent chemotherapy^h Capecitabine Eribulin Vinorelbine Gemcitabine Olaparib or talazoparib (if germline BRCA1/2 mutation)</p>	There is no single recommended first-line chemotherapy regimen.

III. Facteurs de risque du cancer du sein

Malgré un bon pronostic, avec une survie à 5 ans supérieure ou égale à 80 %, le cancer du sein fait partie des cancers solides les plus prévalents et donc les plus mortels (en valeur absolue de patients atteints). Parmi les causes de survenue de cancer du sein, la part d'héritage génétique est estimée entre 5 et 10%. L'âge et les modifications hormonales sont des facteurs de risque reconnus tout comme les antécédents personnels de cancer du sein ou des voies génitales. D'autres facteurs ont été identifiés en rapport avec le mode de vie (consommation d'alcool, de tabac et la sédentarité notamment).

Les effets hormonaux sont de loin les mieux décrits avec de nombreuses études ayant établi et confirmé l'effet des hormones sexuelles dans la survenue de cancer. En effet une ménarche précoce entrainerait un risque augmenté notamment à cause d'une exposition aux hormones plus longue (Titus-Ernstoff et al., 1998). Une étude de Gaudet et al. a montré que l'âge de primiparité était également impliqué avec un risque de cancer augmentant de 3 à 5 % pour chaque année supplémentaire (une femme ayant son premier enfant à 30 ans a environ 3% de plus de risque qu'une femme de 29 ans) (Gaudet et al., 2011). Enfin, un lien entre la survenue du cancer et la prise de contraceptifs oraux est évoqué : il semble que la prise de contraceptifs oraux pendant plus de 5 ans contribue à une augmentation du risque de 60 % chez la femme de 20 à 45 ans avec un rôle probable de la durée d'exposition (Beaber et al., 2014). L'implication du système hormonal dans la survenue du cancer du sein n'est pas surprenante puisqu'environ 80 à 90 % des cancers expriment au moins un récepteur hormonal : récepteurs à l'œstrogène, à la progestérone ou encore au facteur HER2. Les cancers dit triples négatifs représenteraient ainsi 15 % des cas et concerneraient surtout les femmes qui présentent la mutation BRCA1.

Il existe cependant d'autres facteurs qui peuvent conduire à une augmentation du risque de cancer du sein et qui ne sont pas directement liés aux hormones mais plutôt au mode de vie au sens large. Il a ainsi été montré qu'un régime alimentaire avec une surconsommation de viande rouge et de graisses animales associées à une sous-consommation de fruits, de légumes et de denrées sources de vitamines (C, D et E en particulier) pouvait être associé un risque augmenté (Dong et al., 2011; Pan et al., 2011; Farvid et al., 2014). Ces liens entre habitudes alimentaires et cancer du sein ne sont pas encore formellement démontrés et méritent d'être approfondis. Il est cependant intéressant de noter que parmi les résultats de l'étude EPIC (European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition Cohort Study) l'une des études de cohortes les plus larges au monde qui s'est intéressée à l'effet de la nutrition, du régime alimentaire, des habitudes de vie et des facteurs environnementaux dans la survenue de cancer, les femmes qui ont déclaré suivre un régime méditerranéen présentaient un risque diminué (Buckland et al., 2013). A côté du régime alimentaire, la relation entre consommation d'alcool et survenue du cancer de sein a aussi été investiguée. De nombreuses études épidémiologiques se sont intéressées au sujet et certaines ont montré qu'il existe une relation linéaire entre quantité d'alcool consommé et incidence. En 2011, Chen et al ont publié les résultats d'une étude sur plus de 100 000 femmes et ont montré qu'une consommation même faible de 5 à 10 g d'alcool par jour ou de 3 à 6 verres par semaine conduisait à une augmentation significative du risque relatif (RR = 1.15, 95% CI 1.06–1.24). L'alcool contribuerait notamment en perturbant les taux d'œstrogène circulants (Chen et al., 2011). Parmi les facteurs de risques individuels, c'est-à-dire non environnementaux, ceux qui semblent être les plus impliqués mais aussi dont les preuves sont les plus convaincantes proviennent des conséquences de la sédentarité et de l'absence d'activité physique qui entraînent surpoids, obésité, insulino-résistance, diabète mais aussi des modifications des taux

d'hormones circulantes (Neilson et al., 2017). Une première étude a ainsi montré que des femmes âgées de 50 à 79 ans qui avait été actives régulièrement à l'âge de 35 ans présentaient une diminution du risque de cancer du sein de 14 % (RR = 0.86, 95% CI 0.78–0.95) (McTiernan et al., 2003). L'activité physique serait donc protectrice mais ce qui semble le plus impactant ce sont les conséquences de son absence ou de son insuffisance.

Il y a tout d'abord les conséquences sur la prise de poids. Dans une revue récemment publiée par Garcia-Estevez et Moreno-Bueno, les auteurs rappellent que l'indice de masse corporelle (IMC) est un facteur d'impact majeur du cancer du sein (Garcia-Estevez et al., 2019). En particulier, alors qu'un IMC élevé s'avère plutôt protecteur avant la ménopause, il devient un très mauvais facteur chez la femme ménopausée. En particulier, les auteurs rapportent les données d'une méta-analyse, réalisée sur plus de 2.5 millions de femmes issues de 34 études, qui montrent que le risque et le pronostic en postménopause sont associés à l'augmentation de l'IMC.

Le lien mécanistique entre obésité et cancer du sein pourrait se trouver dans la survenue d'une inflammation chronique chez la femme obèse qui conduirait à une dérégulation de la production d'hormones stéroïdiennes et d'adipokines responsables notamment d'une inflammation du tissu adipeux. Cette inflammation tendrait *in fine* à activer la synthèse locale d'œstradiol, d'où le risque augmenté de cancer du sein chez la femme obèse. L'obésité apparaît donc comme un facteur aggravant direct, avec une augmentation de la mortalité ou du risque de récurrence qui pourrait être de l'ordre de 35 à 40 % selon les méta-analyses, indépendamment du statut ménopausique et du statut hormonal de la tumeur.

L'obésité et l'absence d'activité physique sont également responsables d'une

hyperinsulinémie, voire d'une insulino-résistance. Or l'une comme l'autre sont connues depuis longtemps comme étant des facteurs de risques de survenue du cancer du sein (Bruning et al., 1992) même si le mécanisme sous-jacent est longtemps resté encore à approfondir.

En somme, nous avons brièvement vu que, si l'on exclut les conséquences directement imputables aux perturbations du taux d'hormones sexuelles circulantes, il existe une population à risque composée de femmes sédentaires, souvent obèses et qui présentent ou peuvent présenter une inflammation de bas grade et une insulino-résistance. Or cette population, que l'on pourrait qualifier peu ou prou de population à risque de développer un syndrome métabolique (obésité, diabète, hypertension, et hypertriglycéridémie), est aussi susceptible de développer une autre forme de comorbidité à composante respiratoire cette fois : le syndrome d'apnées obstructives du sommeil (SAOS).

B. Le syndrome d'apnées obstructives du sommeil

I. Généralités

1. Physiopathologie

Les apnées sont usuellement classées en deux grandes catégories : les apnées centrales d'une part et les apnées obstructives d'autre part. Tandis que les premières trouvent leur origine dans un dysfonctionnement des centres du système nerveux central régulant la respiration, les secondes sont la conséquence d'une obstruction des voies respiratoires qui entraîne des troubles de la respiration associés à une ventilation inadaptée. Le syndrome d'apnées obstructives du sommeil (SAOS), comme son nom l'indique, appartient à cette dernière catégorie (Thorpy, 2012).

Le SAOS se caractérise ainsi par la survenue d'épisodes récurrents d'obstruction partielle, voire totale, des voies aériennes supérieures pendant le sommeil (Malhotra et al., 2002). La physiopathologie du SAOS est multifactorielle, associant une réduction du diamètre des voies aériennes supérieures consécutive à des troubles fonctionnels et/ou anatomiques comme l'obésité ou un défaut anatomique maxillo-facial (Mayer et al., 1996; White, 2005) ou encore à un déficit du réflexe protecteur neuromusculaire au niveau pharyngé qui conduit à un risque majoré de collapsus (Horner, 2007). Lorsqu'elle est complète l'obstruction est qualifiée d'apnée ; elle est définie par une baisse du flux respiratoire de plus de 90 % par rapport au flux de base pendant au moins 10 secondes. Lorsqu'elle est partielle, l'obstruction est appelée hypopnée. L'hypopnée est définie comme une diminution de plus de 30% du flux respiratoire qui entraîne une diminution de la saturation sanguine en oxygène de plus de 3% (Berry et al., 2012) (Figures 5 et 6).

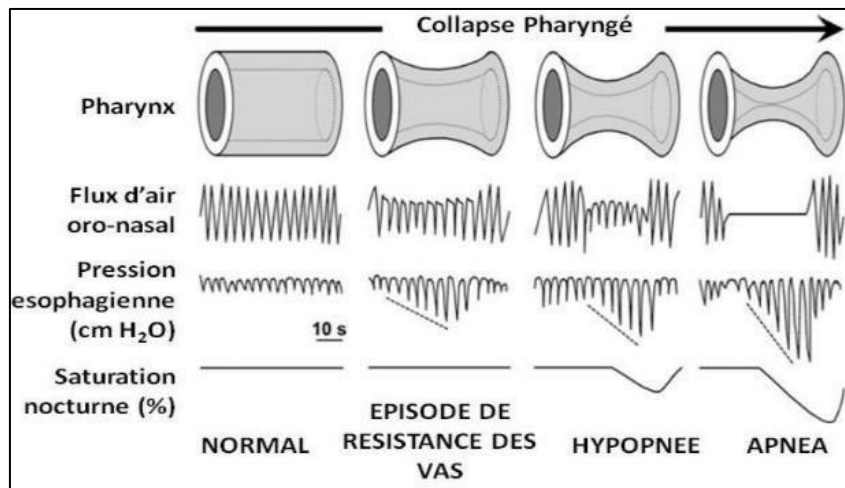


Figure 5 : Représentation des évènements respiratoires en fonction de la gravité du collapsus pharyngé. VAS : voies aériennes supérieures ; d'après (Dematteis et al., 2009).

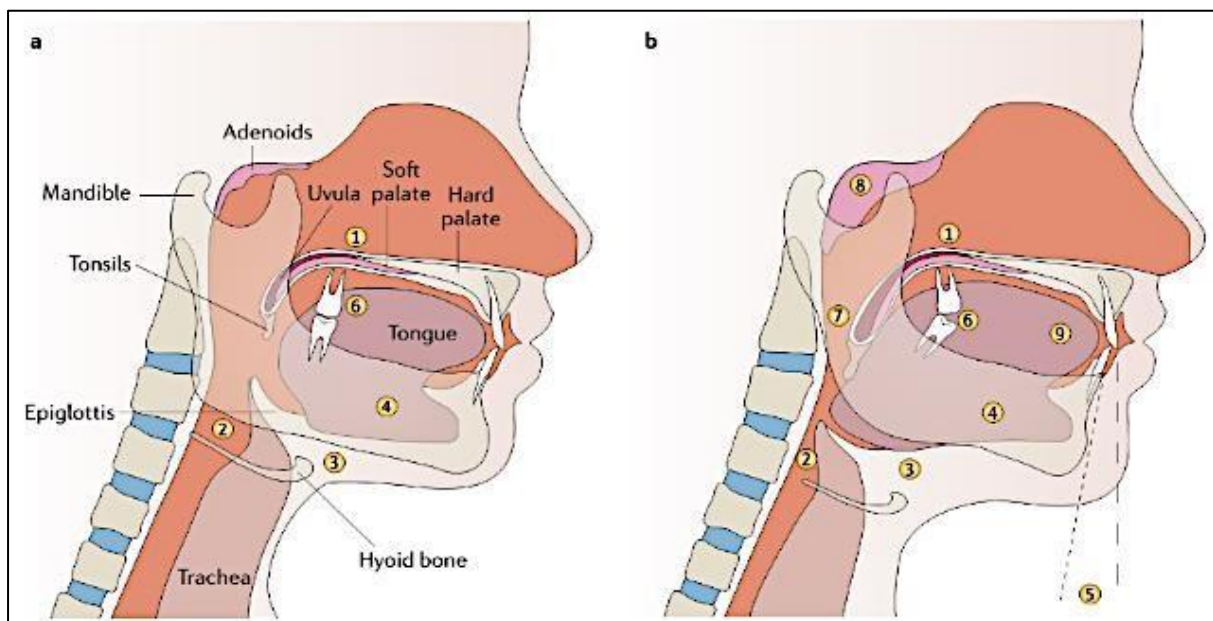


Figure 6 : Modifications maxillo-faciales et des tissus mous dans le SAOS. a. Anatomie normale. b. Modifications typiques liées au SAOS: un palais long et mou et une luette élargie (1); un espace oropharyngé réduit (2); une distance accrue entre l'os hyoïde et la mandibule (3); une mandibule plus courte et plus verticale (4); une position postérieure de la mandibule (5); occlusion dentaire anormale (6); hypertrophie amygdalienne (7); hypertrophie adénoïde (8); macroglossie (9); d'après (Lévy et al., 2015).

Ces séquences d'apnées et/ou hypopnées durent généralement de 10 à 30 secondes et peuvent survenir jusqu'à plus de 30 fois par heure dans les cas les plus sévères. Ces épisodes transitoires sont associés à des séquences répétées de désaturation-réoxygénation induisant une hypoxie intermittente (HI). L'HI joue un rôle central dans la physiopathologie du SAOS

(Lévy et al., 2008) ainsi que dans ses conséquences délétères parmi lesquelles peuvent être citées : une somnolence diurne, un allongement du temps d'endormissement (Gottlieb et al., 1999), de nombreuses comorbidités cardiovasculaires (McNicholas et al., 2007; Levy et al., 2011; Lévy et al., 2013), métaboliques (Savransky et al., 2007; Drager et al., 2011; Levy et al., 2011; Thomas et al., 2017) et une augmentation du risque de décès toutes causes confondues qui font du SAOS un enjeu majeur de santé publique (Yaggi et al., 2005).

Le diagnostic de SAOS est établi à partir d'une polysomnographie nocturne complète, au cours de laquelle des données neurologiques, cardiaques et respiratoires sont enregistrées, ou à partir d'une polygraphie respiratoire ambulatoire. Toutefois, les patients sont considérés comme apnéiques si leur syndrome se traduit par certains des symptômes ou signes cliniques suivants : un temps d'endormissement augmenté, un sommeil non-réparateur, une fatigue diurne ou des accès de somnolence diurne, des insomnies, un ronflement associé à des pauses respiratoires, des troubles de l'humeur ou cognitifs, de l'hypertension artérielle ou des atteintes cardiométaboliques. En l'absence de symptômes évocateurs, le diagnostic de SAOS peut être établi si le nombre d'évènements respiratoires par heure durant le sommeil, également appelé index d'apnées-hypopnées (IAH), est supérieur à 15 (Tableau 4).

Tableau 4 : Sévérité du SAOS en fonction de l'index d'apnées-hypopnées (IAH)

IAH	Sévérité
< 5	Pas de SAOS
5 – 15	SAOS léger (Uniquement si symptômes associés)
15 – 30	SAOS modéré
> 30	SAOS sévère

2. Epidémiologie

Le SAOS est l'une des pathologies respiratoires chroniques les plus fréquentes bien qu'il soit probablement sous-diagnostiqué puisqu'on estime que 82% des hommes et 93% des femmes atteints l'ignorent (Young et al., 1997). La prévalence mondiale du SAOS a récemment été estimée à partir d'une recherche, sur les bases PubMed et Embase, de 17 études réparties sur 16 pays. En appliquant un algorithme de standardisation du diagnostic et d'évaluation de la sévérité à travers la mesure de l'IAH, les auteurs ont pu estimer la prévalence mondiale du SAOS dans la population générale des adultes de 30 à 69 ans (Benjafield et al., 2019). En se basant sur les critères de diagnostic de l'Académie Américaine de la Médecine du Sommeil publiés en 2012 (Berry et al., 2012), Benjafield et al. ont montré que près d'un milliard d'individus, soit 12% de la population mondiale, souffriraient de SAOS, dont près de la moitié à un niveau modéré (IAH \geq 15). La répartition mondiale des patients montre que la France serait particulièrement touchée avec 24 millions de patients (72 % de la population) atteints de SAOS léger et 12 millions (36 % de la population) atteints de SAOS modéré (Figure 7). Ces résultats viennent renforcer l'hypothèse selon laquelle la prévalence du SAOS a longtemps été largement sous-estimée. Il faut également prendre en compte le fait que la prévalence du SAOS est en constante augmentation depuis les années 1990. Ainsi, alors que 5 à 6% des patients de 30 à 70 ans présentaient un IAH $>$ 15 au début des années 1990, des valeurs de 6 à 13% ont été observées à la fin des années 2000 pour atteindre environ 36% en 2010 (Peppard et al., 2013). L'augmentation de la prévalence du SAOS dans les pays occidentaux pourrait être partiellement imputée à une meilleure estimation de la prévalence mais également au vieillissement de la population et surtout à la progression constante de l'épidémie d'obésité.

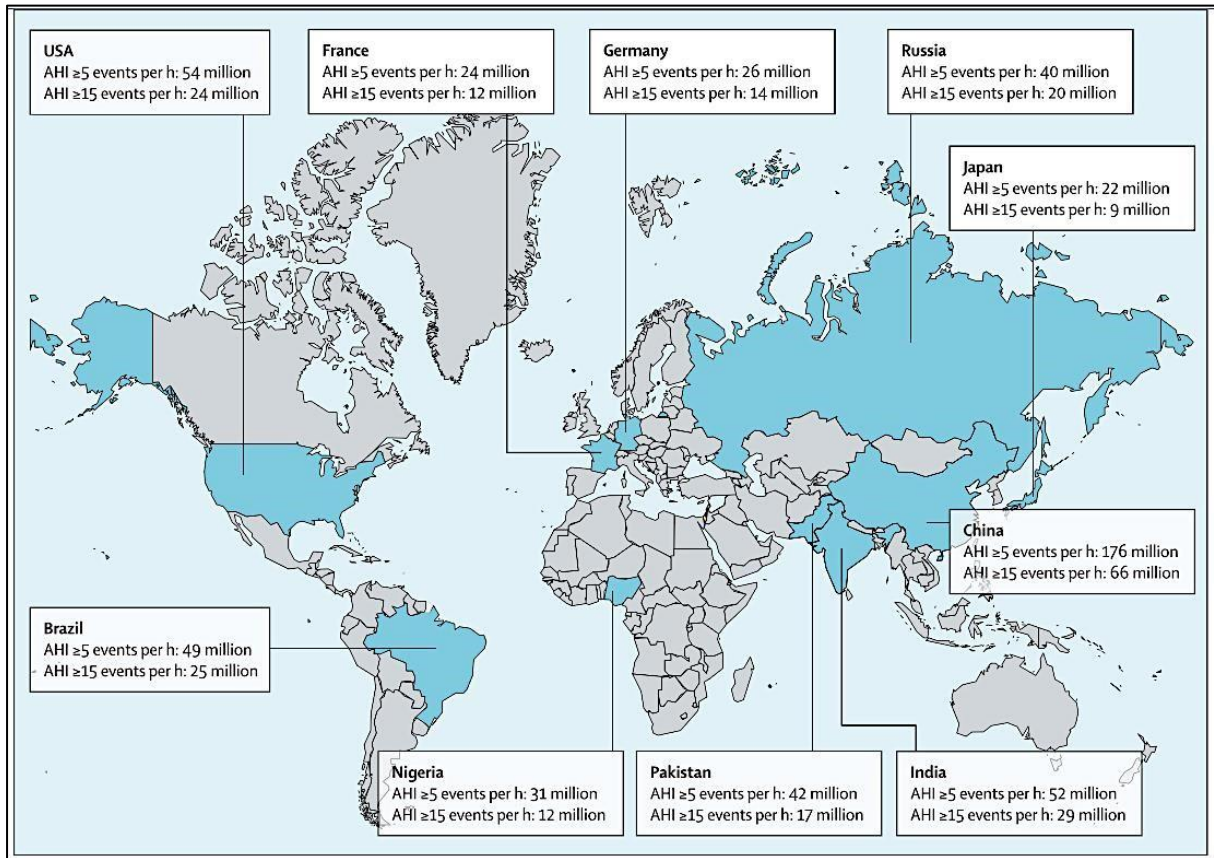


Figure 7 : Représentation des dix pays pour lesquels l'estimation de patients souffrant d'apnées obstructives du sommeil est la plus importante, selon les critères 2012 de l'American Academy of Sleep Medicine ; d'après (Benjafeld et al., 2019).

II. Facteurs de risque et conséquences du SAOS

1. Facteurs de risque du SAOS

L'obésité représente le facteur de risque le plus important dans la survenue d'un SAOS puisqu'elle est associée à près de 60% des cas modérés à sévères (Peppard et al., 2000). L'accumulation de graisse au niveau viscéral serait associée à une infiltration graisseuse au niveau du cou favorisant l'obstruction des voies aériennes supérieures pendant le sommeil mais également une augmentation de la pression abdominale et finalement une réduction du volume pulmonaire (Figure 8) (Lévy et al., 2015). C'est ainsi qu'un gain de 10% de poids a été associé à une augmentation d'environ 32% de l'IAH (Peppard et al., 2000). Une étude menée sur un millier d'hommes adultes a montré que la prévalence du SAOS modéré ($IAH \geq 15$) augmentait drastiquement en fonction de l'IMC avec 11% de SAOS chez les patients ayant un IMC normal, 23% chez les patients en surpoids ($25 \leq IMC \leq 30$) et 63% chez les patients obèses ($IMC \geq 30$). Une tendance similaire était observée chez la femme avec des prévalences de 3%, 9% et 22%, respectivement (Tufik et al., 2010). Une étude clinique récente s'est intéressée à l'effet d'une réduction pondérale, induite par une prise en charge multifactorielle (baisse des apports caloriques et augmentation de l'activité physique), sur la prévalence du SAOS (Figure 9) (Kline et al., 2018). La population d'étude était féminine pour 90%, âgée de 50 ans en médiane et présentait un IMC moyen de $34 \pm 4.6 \text{ kg/m}^2$. Avant prise en charge, cette population présentait un IAH moyen de voisin de 7 (50% de patients avec un SAOS léger à modéré et 12% de patients avec un SAOS modéré à sévère). Le principal résultat de cette étude est qu'une réduction de poids de plus de 5% s'est accompagnée d'une diminution d'environ 1.5 point d'IAH alors qu'une augmentation d'environ 1 point d'IAH a été observée chez les patients ayant perdu moins de poids. Dans ce travail, les auteurs ont également mis en évidence une interaction réciproque entre obésité et SAOS puisqu'ils ont observé que le

régime avait été plus efficace, en termes de perte de poids, chez les patients non apnéiques. Dès 2012, Borel et al. avaient observé qu'un régime hypocalorique associé à des exercices réguliers entraînait une moindre perte de poids chez des patients apnéiques que les non apnéiques (Borel et al., 2012). Ils avaient alors souligné le cercle vicieux dans lequel se retrouvent les patients obèses apnéiques puisque d'un côté la perte de poids est fortement indiquée pour diminuer la sévérité du SAOS et que d'un autre côté les mesures de perte de poids sont moins efficaces chez ces patients. Il se pourrait que les patients avec SAOS soient notamment moins adhérents au respect de leur régime et répondraient moins bien aux interventions pour les inciter à faire davantage d'activités physiques. Il se pourrait également que le SAOS aggrave les dérégulations métaboliques responsables de la prise de poids et/ou modifie la sensation de satiété. Ces dérégulations délétères se traduiraient notamment par une augmentation de la tolérance au glucose et plus largement par l'installation d'un contexte diabétogène.

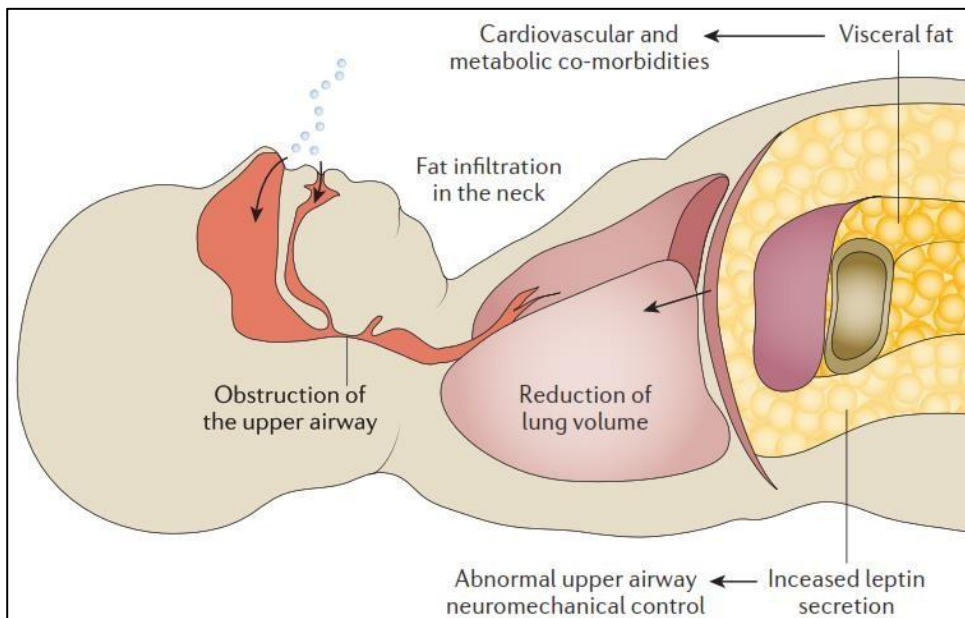


Figure 8 : Représentation du rôle de l'obésité dans le SAOS. L'obésité prédispose au syndrome d'apnées obstructives du sommeil (OSA) d'une part par les infiltrats de graisses localisés au niveau du coup favorisant le collapsus des voies aériennes supérieures, et d'autre part par une augmentation de la pression abdominale liée à l'accumulation de graisse abdominale entraînant une réduction du volume pulmonaire. L'accumulation de tissu

adipeux via la synthèse de leptine pourrait aussi altérer le contrôle neuronal des voies aériennes supérieures ; d'après (Lévy et al., 2015).

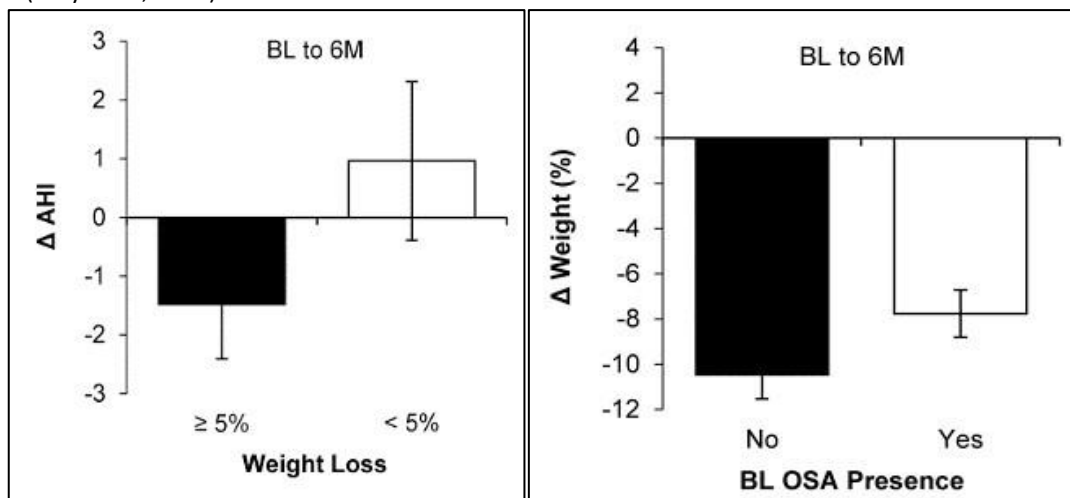


Figure 9 : Relation entre la perte de poids ($\geq 5\%$, $< 5\%$) et le changement d'AHI. 6M : 6 mois ; AHI : indice d'apnéehypopnée ; BL : valeur de base; d'après (Kline et al., 2018).

Le lien entre SAOS, obésité et diabète de type 2 a fait l'objet de nombreux travaux. Plus d'une dizaine d'études longitudinales ont ainsi montré qu'il existe une association entre la présence d'un SAOS et l'incidence du diabète, résultat confirmé par une méta-analyse menée sur près de 64 000 patients issus de ces mêmes études (Reutrakul et al., 2017). L'Association Américaine du Diabète a reconnu le SAOS comme une comorbidité importante du diabète allant même jusqu'à conseiller la réalisation d'une exploration du sommeil à domicile chez les patients diabétiques de type 2 (American Diabetes Association, 2015).

Tout comme pour l'obésité, la prise en charge du diabète améliore dans la plupart des cas la sévérité du SAOS. Il existe donc une association forte SAOS – Diabète – Obésité, ce qui explique que la prévalence du SAOS augmente autant dans une société qui consomme de plus en plus de sucres et de graisses et qui fait de moins en moins d'activité physique. La difficulté aujourd'hui est que cette relation est tellement étroite qu'il devient très difficile voire impossible de discriminer quelles sont les complications imputables à l'une ou l'autre de ces comorbidités.

Concernant l'étude de l'effet du SAOS dans la survenue et l'évolution du cancer du sein, l'intrication entre ces comorbidités est un facteur de confusion dans l'interprétation de certains résultats cliniques mais aussi un facteur limitant dans l'exploration préclinique des mécanismes physiopathologiques.

Obésité et diabète ne sont pas les seuls facteurs de risque, le tabagisme et la consommation d'alcool sont aussi décrits comme pouvant aggraver le SAOS. En effet, comparés à des non-fumeurs, les fumeurs ont un risque plus élevé de ronflement et de présenter un SAOS modéré à sévère (Wetter et al., 1994). La consommation d'alcool impacte sur la tonicité des voies aériennes supérieures et la prise d'une seule dose d'alcool avant la nuit majore l'IAH ainsi que le niveau de la désaturation sanguine lors des événements nocturnes (Mitler et al., 1988). Le genre est aussi un facteur important. Il semble en effet que les hommes soient deux à trois fois plus touchés que les femmes. Les raisons précises de cette différence ne sont pas encore élucidées mais le statut hormonal pourrait être l'une des explications. Chez la population féminine, celle qui nous occupe dans ce manuscrit, on note par exemple que les femmes ménopausées sans traitement hormonal substitutif présentent une prévalence plus élevée de SAOS comparativement aux femmes ménopausées avec traitement de substitution ou aux femmes pré-ménopausées (Bixler et al., 2001). Le lien entre SAOS et ménopause a récemment été étudié par une équipe suisse (Heinzer et al., 2018). Dans leur étude, les chercheurs ont fait passer une polysomnographie à 2121 sujets dont 1097 femmes puis ils se sont intéressés à la sévérité du SAOS en fonction du statut ménopausique. En premier lieu l'étude confirme bien la prévalence plus élevée du SAOS chez les hommes par rapport aux femmes. Mais surtout, leur travail a permis de mettre en évidence que les femmes ménopausées étaient beaucoup plus à risque de développer un SAOS que les femmes non ménopausées (Figure 10).

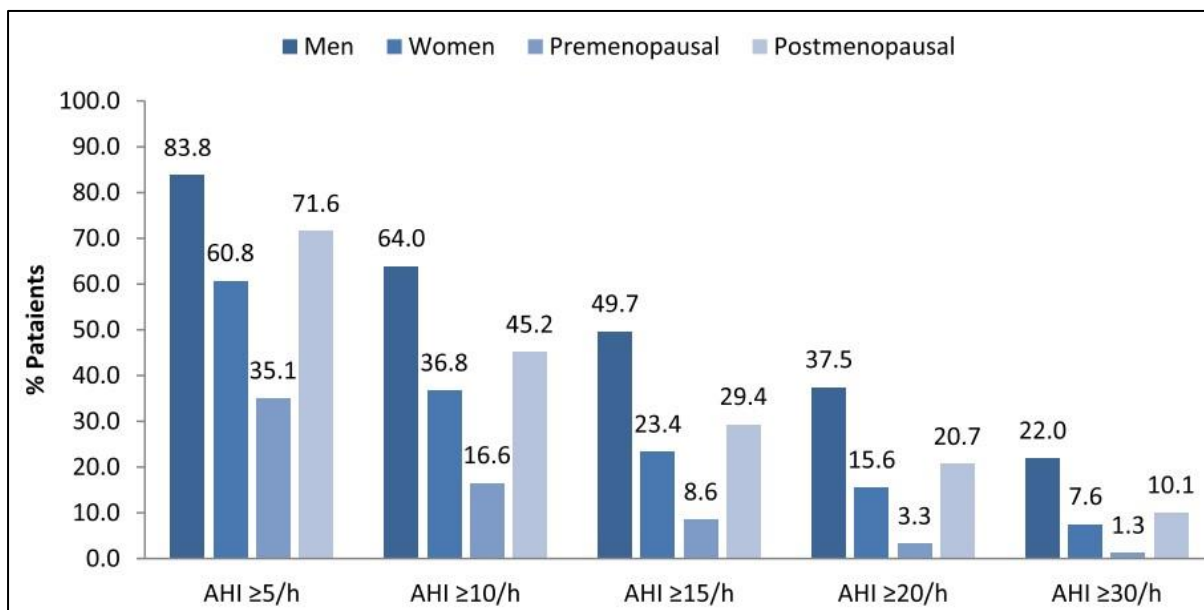


Figure 10 : Prévalence des troubles respiratoires du sommeil chez les hommes et les femmes et selon le statut ménopausique des femmes; d'après (Heinzer et al., 2018)

2. Conséquences des obstructions des voies aériennes induites par le SAOS

Fragmentation du sommeil et variations de la pression intrathoracique La fragmentation du sommeil, causée par les micro-éveils accompagnant les apnées, est à l'origine d'une diminution de la qualité de vie des patients. En effet, la fatigue excessive qui en résulte réduit la vigilance augmentant le risque d'accidents et diminue l'efficacité au travail à l'origine de difficultés professionnelles (Ayas et al., 2014). Pour finir, la fragmentation du sommeil peut, en elle-même, entraîner des conséquences métaboliques délétères (Briançon Marjollet et al., 2015; Tobaldini et al., 2017).

Une autre conséquence des obstructions est la diminution de la pression intrathoracique au cours des apnées causée par des efforts inspiratoires sur les voies aériennes supérieures fermées. La variation de la pression intrathoracique expose le cœur à d'importantes contraintes mécaniques qui sont particulièrement lourdes de conséquences chez les patients insuffisants cardiaques souffrant de SAOS (Kasai et al., 2011). Enfin, ces variations sont

également responsables, avec la fragmentation du sommeil et l'hypoxie intermittente, d'une hyperactivité du système sympathique (Dewan et al., 2015).

L'hypoxie intermittente chronique

L'HI induite par les séquences répétées d'apnées/hypopnées apparaît comme étant le principal facteur responsable des atteintes cardiovasculaires (hypertension, dysfonction endothéliale, athérosclérose) et métaboliques (hyperlipidémie, insulino-résistance) du SAOS. En effet, l'HI entraîne un ensemble de réponses adaptatives au niveau cellulaire à travers l'expression de facteurs de transcription tels que l'Hypoxia Inducible Factor 1 (HIF-1), le « Nuclear Factor kappa B » (NF-κB), suivie de l'expression de leurs gènes cibles, tels le « Vascular Endothelial Growth Factor » (VEGF) et l'Endothéline-1 (ET-1) (Gras et al., 2016), qui vont conduire à un stress oxydant (Belaidi et al., 2016), à une inflammation (Arnaud et al., 2011; Aron-Wisnewsky et al., 2012; Gautier-Veyret et al., 2013), à une activation sympathique (Tamisier et al., 2011), ainsi qu'à des dysfonctions endothéliales responsables de la majorité des comorbidités liées au SAOS (Arnaud et al., 2009). Les interactions entre toutes les réponses médiées par l'HI sont multiples et sont susceptibles de s'auto-entretenir. Toute la lumière n'est pas encore faite sur les mécanismes en cause mais nous pouvons toutefois tenter d'en résumer les grandes lignes.

L'hypoxie intermittente, lorsqu'elle est chronique, entraîne une dysfonction mitochondriale associée à une activation de la NADPH oxydase (NOX) et de la xanthine oxydase (XO) et à un découplage de la « nitric oxide synthase » (NOS). Ces modifications du métabolisme cellulaire se traduisent par une surproduction d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). Le stress oxydant qui en résulte est à l'origine des comorbidités liées au SAOS de façon directe mais également indirecte via la production/activation de facteurs de transcription sensibles à l'hypoxie tels

que HIF-1 et NF- κ B (Belaidi et al., 2016). Ces trois acteurs centraux (ERO, HIF-1 et NF- κ B) sont capables de s'activer respectivement et de s'auto-entretenir mutuellement dans des proportions qui dépendent beaucoup du contexte cellulaire, tissulaire, organique et aussi pathologique. En conditions d'HI on retrouve notamment une baisse importante de la production de NO ainsi qu'une expression accrue des gènes-cibles des facteurs de transcription tels que l'ET-1 et le VEGF. Ceci concourt à la mise en place des trois principaux mécanismes délétères qui interviennent dans toutes les complications cardiovasculaires et métaboliques du SAOS : inflammation (Aron-Wisnewsky et al., 2012; Gautier-Veyret et al., 2013), dysfonction vasculaire endothéliale (Bironneau et al., 2020) et activation du système nerveux sympathique (Weiss et al., 2015). Nous avons tenté de résumer sommairement ces phénomènes dans la figure présentée ci-dessous (Figure 11).

Bien qu'encore insuffisantes pour expliquer l'ensemble des conséquences de l'HI, les études expérimentales décrites ci-dessus ont toutefois contribué à considérer définitivement le SAOS comme une comorbidité majeure dans de nombreuses pathologies chroniques et ont permis la conduite de nombreuses études cliniques. Celles-ci ont entre autres permis de démontrer :

- Que près de 40% des gens souffrant d'hypertension artérielle souffrent également de SAOS (Elmasry et al., 2002). Ce chiffre passe même à 80% lorsqu'il s'agit de personnes prenant 3 ou 4 médicaments pour abaisser leur pression artérielle (Logan et al., 2001).
- Qu'il y a cinq fois plus de risques de développer une maladie coronarienne quand on souffre de SAOS (Peker et al., 2006).
- Que plus de 60% des patients qui ont eu un accident vasculaire cérébral souffrent également de SAOS (Yaggi et al., 2005).
- Que 30 à 35% des personnes ayant un diabète de type 2 souffrent également de SAOS

(Laaban et al., 2009).

- Qu'environ 40% des personnes obèses souffrent de SAOS (Young et al., 2002).

Le SAOS en tant que facteur de risque continue à être étudié dans un nombre grandissant de pathologies et notamment dans le cancer comme nous le verrons par la suite.

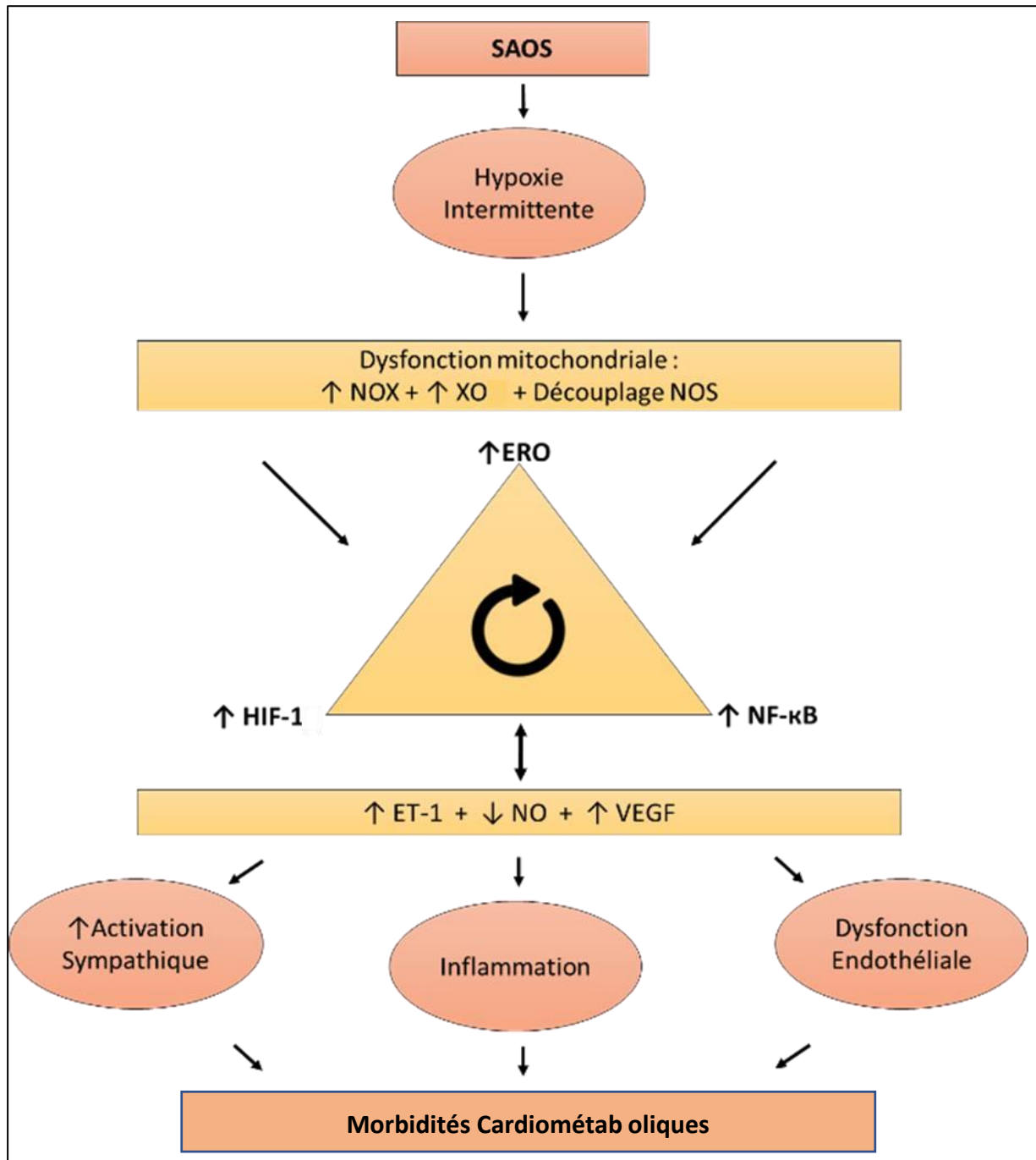


Figure 11 : Résumé des mécanismes reconnus pour participer aux effets délétères de l'hypoxie intermittente chronique.

III. Diagnostic et prise en charge du SAOS

1. Le diagnostic du SAOS

Le diagnostic formel de SAOS est établi par un examen approfondi du sommeil en réalisant une polysomnographie nocturne complète ou une polygraphie respiratoire, ou dans les cas les plus simples une oxymétrie nocturne.

La Polysomnographie : le « gold standard »

La polysomnographie (PSG) est la méthode de référence pour diagnostiquer le SAOS. Elle consiste en l'enregistrement simultané de plusieurs paramètres physiologiques durant une nuit de sommeil. Elle associe un électroencéphalogramme, un électromyogramme, un électrooculogramme, un transducteur de pression mesurant le flux d'air oronasal, un oxymètre mesurant la saturation en oxygène sanguine (SaO_2), un brassard de pression artérielle, un microphone au niveau de la trachée enregistrant les ronflements, un capteur au niveau des jambes pour analyser leur mouvement lors du sommeil ainsi qu'une ceinture d'impédance thoraco-abdominale enregistrant les mouvements respiratoires (Figure 12). La PSG est un examen qui nécessite obligatoirement une hospitalisation.

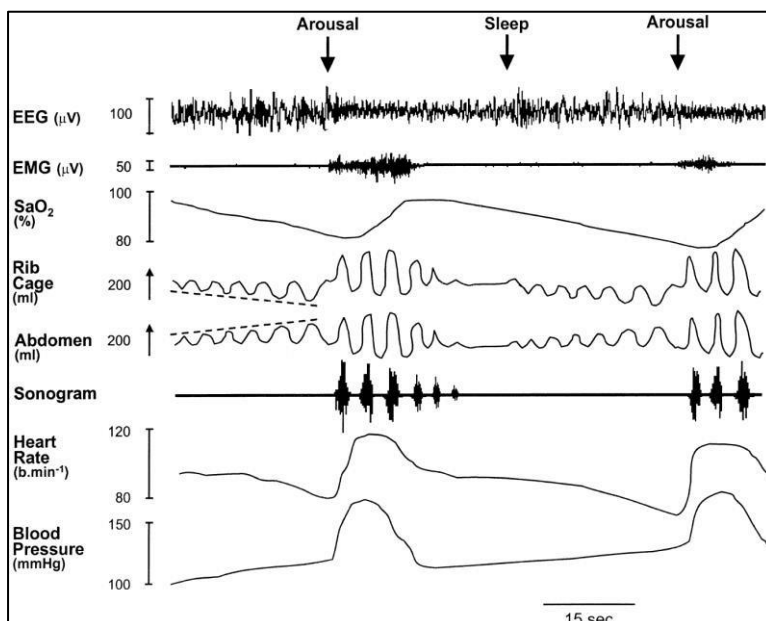


Figure 12 : Exemple de tracé de polysomnographie nocturne : représentant la fragmentation du sommeil (micro éveils visibles sur l'EEG), les fluctuations de la saturation artérielle en oxygène, les efforts respiratoires thoraco-abdominaux. EEG, électroencéphalogramme ; EMG, électromyogramme ; EOG, électro-oculogramme ; ECG, électrocardiogramme ; SaO₂, saturation en oxygène ; LEG, mouvements des jambes ; THO, mouvements thoraciques ; ABD, mouvements abdominaux ; d'après (Thompson et al., 2001).

Chaque apnée entraîne des perturbations des différents paramètres mesurés : une fragmentation du sommeil, une diminution de la saturation en oxygène, une augmentation des variations de pressions thoraciques et abdominales, de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle.

Polygraphie respiratoire et oxymétrie de pouls

Il existe d'autres examens moins complets mais moins contraignants que la PSG puisque réalisables à domicile et comportant moins de capteurs : la polygraphie respiratoire et l'oxymétrie de pouls qui sont devenus les examens de routine pour le dépistage du SAOS. La polygraphie respiratoire est une polysomnographie sans mesure d'EEG, d'EOG et d'EMG. Elle enregistre la saturation en oxygène, les mouvements respiratoires et la fréquence cardiaque. Elle permet le diagnostic du SAOS mais n'est pas utilisée comme examen de référence dans la littérature. L'oxymétrie nocturne est une simple mesure de la saturation artérielle en hémoglobine au niveau de la pulpe du doigt à partir de laquelle est calculé un index de désaturation en oxygène (IDO) par heure d'enregistrement qui permet le dépistage et une estimation de la sévérité du SAOS. La majorité de ces dispositifs présentent l'inconvénient de ne pas permettre le suivi des micro-éveils, puisque ne comportant pas d'EEG, et donc de ne pas mettre en relation l'état d'éveil avec les mesures réalisées. De plus, on retrouve davantage de faux négatifs (chez les patients présentant principalement des hypopnées par exemple) et de faux positifs (chez les patients BPCO par exemple), en particulier avec l'oxymétrie nocturne.

2. La prise en charge du SAOS

Les objectifs de la prise en charge du SAOS sont de soulager les symptômes, de limiter les comorbidités, d'améliorer la qualité de vie et de faire baisser la mortalité. Le traitement du SAOS dépendra ainsi de la sévérité du diagnostic combinée avec les comorbidités du patient.

Perte de poids et chirurgie bariatrique

Chez les patients atteints d'un SAOS léger ou modéré, la perte de poids par un régime hypocalorique, une modification des habitudes alimentaires et une activité physique régulière peut suffire pour réduire significativement l'IAH (Mitchell et al., 2014). Chez les patients atteints d'un SAOS modéré à sévère présentant un IMC supérieur à 30kg/m², le régime seul est rarement suffisant pour réduire la sévérité du SAOS et le recours à une chirurgie bariatrique est souvent envisagé. Il a notamment été montré que chez ces patients, un régime seul permet de faire baisser l'IAH d'environ 12 évènements alors que la chirurgie bariatrique entraîne une diminution de 29 évènements, soit plus du double (Ashrafian et al., 2015). Il convient toutefois de préciser que la chirurgie peut entraîner des effets indésirables post-opératoires et augmente le risque de décès du patient.

Pression positive continue

La pression positive continue (PPC) est le traitement de référence du SAOS, notamment prescrit en première intention chez les patients atteints d'un SAOS sévère (recommandations HAS 2014). La technique consiste à insuffler de façon continue dans les voies respiratoires de l'air ambiant mis sous pression et ce, grâce à un masque facial (nasal ou bucco-nasal). Le recours à une pression positive, c'est-à-dire supérieure à la pression atmosphérique ambiante, permet le maintien des voies aériennes supérieures en position ouverte. Une revue récente a montré que la PPC ne présente pas d'effet bénéfique sur les marqueurs inflammatoires et

métaboliques altérés par le SAOS (Jullian-Desayes et al., 2015). La PPC ne permet pas de réduire le risque cardiovasculaire ni la mortalité (McEvoy et al., 2016; Yu et al., 2017) des patients apnéiques modérés à sévères. Elle permet surtout de réduire le temps d'endormissement et la somnolence diurne (Sullivan et al., 1981; Patel et al., 2003). Le manque d'efficacité de la PPC sur le risque cardiovasculaire serait lié à un manque d'observance (moins de 4h par nuit) des patients (McEvoy et al., 2016). Les études ayant montré un effet bénéfique ont été effectuées sur des patients plus adhérents à la PPC. (Barbé et al., 2012; Martínez-García et al., 2013). La PPC seule est donc rarement suffisante pour limiter les effets délétères du SAOS et il est souvent nécessaire de l'associer à une prise en charge complémentaire telle qu'un régime ou une chirurgie bariatrique (Chirinos et al., 2014). Enfin, aucune donnée ne semble montrer une efficacité significative de la PPC chez les patients atteints de SAOS léger à modéré.

Orthèse d'avancée mandibulaire

Le traitement par orthèse d'avancée mandibulaire (OAM) est une alternative au traitement de référence (voir ci-dessous) pour les patients présentant un SAOS léger à modéré. L'OAM ressemble à un appareil dentaire avec pour objectif de faire avancer la mâchoire inférieure afin de repousser la langue vers l'avant et dégager le fond de la gorge. Ce procédé mécanique permet d'ouvrir les voies aériennes supérieures et d'améliorer le passage de l'air au cours du sommeil (Figure 13). Les prothèses sont faites sur mesure et doivent être posées par un orthodontiste.

Le recours à l'OAM a une efficacité comparable à celle du traitement de référence, la PPC, vis-à-vis de la sévérité du SAOS et permet une meilleure compliance ce qui se peut se traduire par une meilleure efficacité à long terme (Phillips et al., 2013).

L'OAM est recommandée lorsque l'IAH est compris entre 15 et 30 en l'absence de maladie cardiovasculaire grave associée. Dans ce cas, l'OAM est en effet plus efficace que le dispositif de PPC (recommandations HAS 2014).

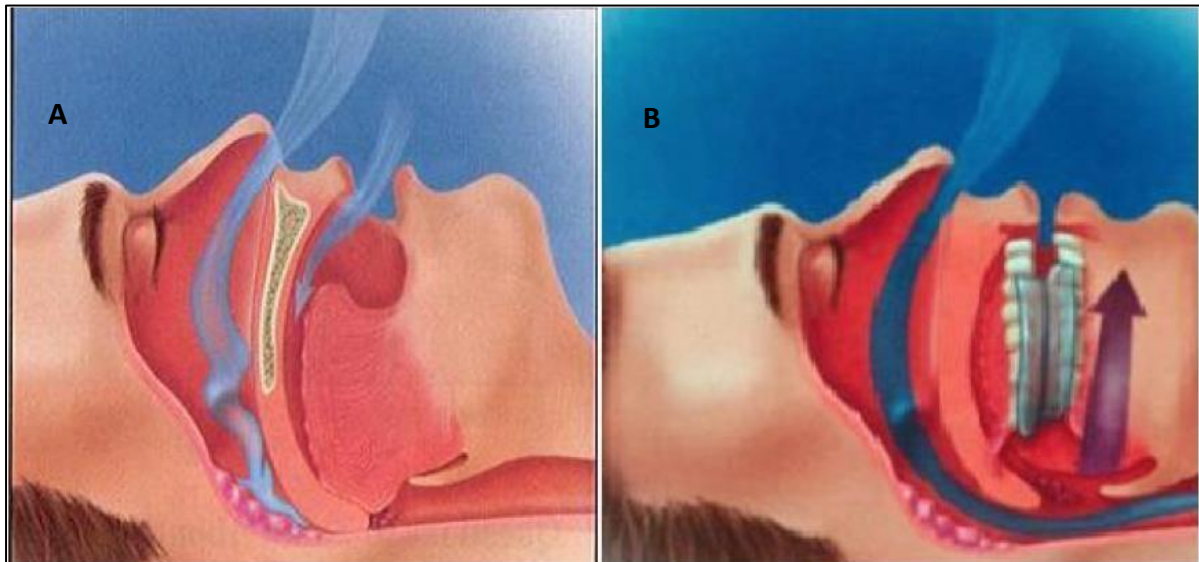


Figure 13 : Au cours du collapsus pharyngé induisant une apnée, la langue bloque le passage de l'air (A). Le port de l'orthèse d'avancée mandibulaire pendant le sommeil permet de maintenir la mâchoire inférieure en position avancée ce qui facilite le passage de l'air (B) ; d'après <http://blog.reseau-morphee.fr/2016/07/07/loam-bonnealternative-traitement-sahos/>.

Traitement chirurgical

La chirurgie des voies aériennes supérieures ne présente aucun intérêt chez les patients présentant un SAOS léger à modéré. L'intervention la plus fréquente consiste à élargir l'accès oro-pharyngé afin de limiter le rétrécissement dû au collapsus pharyngé. L'efficacité de l'opération semble décroître dans le temps et il est très difficile de l'évaluer car les études publiées présentent d'importants biais de sélection des patients constituant de bons candidats pour ce type de chirurgie (Randerath et al., 2011). La chirurgie maxillo-faciale est également indiquée mais seulement chez les patients atteints d'un SAOS en lien avec une déformation crâniofaciale.

Traitement pharmacologique

A ce jour aucun traitement médicamenteux spécifique n'est indiqué dans le traitement du SAOS. La découverte d'un traitement efficace reste une préoccupation des chercheurs et cliniciens. Une requête rapide des essais interventionnels de phase 2, 3 sur la base de déclaration des essais cliniques ClinicalTrials (www.clinicaltrials.gov) retrouve 115 études de traitements pharmacologiques chez le patient apnéique, dont 25 sont actives. Les principales substances pharmacologiques évaluées sont résumées dans le Tableau 5.

Malgré quelques résultats intéressants obtenus au cours des 40 dernières années, aucun traitement n'a véritablement démontré une efficacité suffisante pour aboutir à une commercialisation. De fait, le recours aux traitements pharmacologiques dans la prise en charge du SAOS reste anecdotique. En revanche, d'autres études s'intéressent davantage à la prise en charge des complications du SAOS qu'à celle du SAOS lui-même. C'est le cas avec l'étude « BOSAS », promue par le CHU de Grenoble, qui s'est intéressée à comparer l'effet du bosentan, un antagoniste mixte des récepteurs à l'ET-1, avec l'effet de la PPC sur la pression diastolique des patients atteints de SAOS sévère et d'une hypertension légère (Joyeux-Faure et al., 2016). Chez ces patients le bosentan n'a pas modifié la pression artérielle diastolique ce qui suggère que l'ET-1 ne joue pas un rôle majeur dans le traitement de l'hypertension liée au SAOS. De même, l'étude « MONTSAS », également promue par le CHU de Grenoble, et actuellement en cours s'intéresse à l'effet du montelukast, un inhibiteur de la voie des cystéinyl leucotriènes, sur la fonction endothéliale de patients atteints d'un SAOS.

Tableau 5 : Principales molécules testées dans l'indication de SAOS.

Objectif thérapeutique	Classe pharmacologique	Molécules évaluées	Résultats obtenus	Références
Dilatation du muscle pharyngé	Agonistes 5HT _{2a}	Fluoxétine Paroxétine	Légère diminution de l'IAH	Hanzel; Chest 1991 Kraiczi; Sleep 1999
	Antagoniste 5-HT ₃	Ondansetron	Aucune modification de l'IAH lorsque seul Diminution de l'IAH quand associé à la fluoxétine	Stradling; J Sleep Res 2003 Prasad; Sleep 2010
	Antagoniste α 2A présynaptique et antagoniste mixte 5HT ₂ /5-HT ₃	Mirtazapine	Aucune modification de l'IAH Réduction significative de l'IAH	Marshall; Sleep 2008 Carlery; Sleep 2008
	Agoniste α -adrénergique	Protriptyline	Amélioration de la désaturation et diminution de l'IAH Amélioration de la désaturation et diminution de la durée des apnées Amélioration des symptômes respiratoires	Smith; Am Rev Respir Dis 1983 Brownell; Bull Eur Physiopathol Respir 1983 Conway; Thorax 1982
Élévation du seuil de réveil pendant le sommeil	Hypnotiques	Eszopiclone	Réduction de l'IAH chez les patients présentant un seuil de réveil bas	Eckert; Clin Sci 2011
		Trazodone	Aucun effet	Eckert; Sleep 2014
Modulation du système de rétrocontrôle respiratoire	Oxygène	O ₂	Diminution de l'IAH	Wellman; Respir Physiol Neurobiol 2008
	Inhibiteur de l'anhydrase carbonique	Acétazolamide	Diminution de l'IAH	Edwards ; J Physiol 2012

C. Le SAOS comme facteur de risque du cancer

I. La surmortalité des patients atteints de SAOS par cancer : un indice épidémiologique

En 2012, l'équipe américaine du Pr Farré a publié un article retentissant suite à une étude de cohorte sur la « Wisconsin Sleep Cohort », qui montrait pour la première fois que les patients qui présentent un syndrome d'apnée du sommeil (SAS), obstructif ou non, ont une mortalité par cancer supérieure à la population générale (Nieto et al., 2012). Avec plus de 1500 patients suivis, atteint ou non de SAS, la cohorte de Wisconsin a permis de démontrer que la survie des patients était associée à la présence et surtout à la sévérité du SAS (Figure 14).

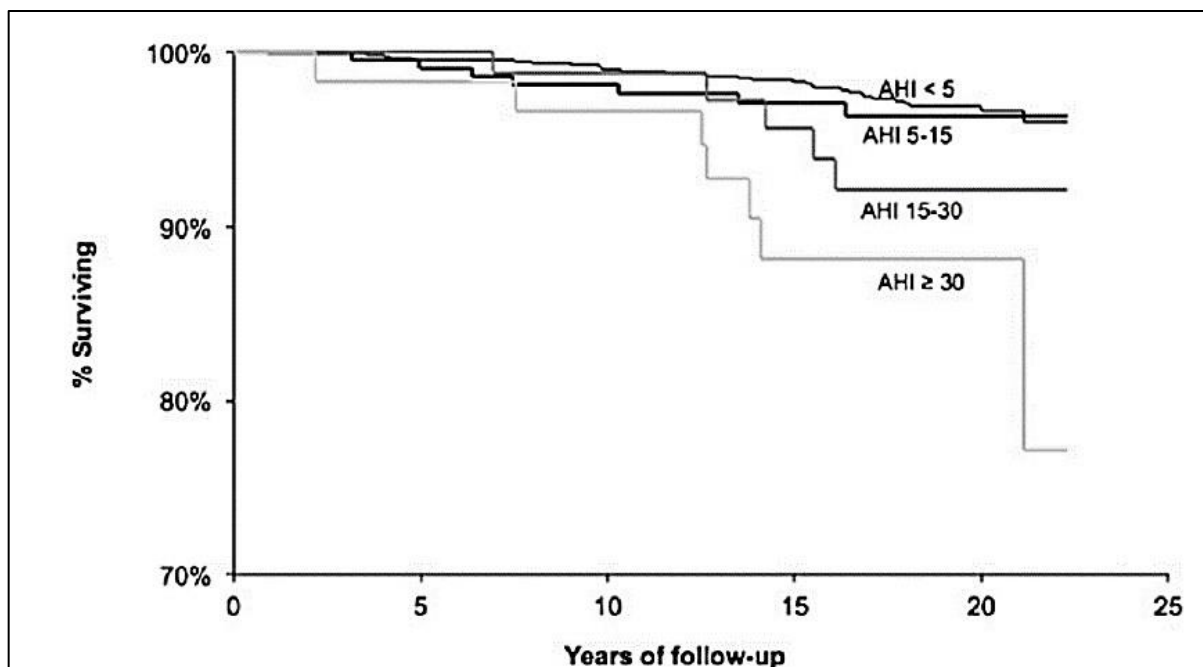


Figure 14 : Taux de survie des patients inclus dans la cohorte Wisconsin entre 1989 et 2011 en fonction de la présence et de la sévérité d'un syndrome d'apnées du sommeil estimé par l'index d'apnées-hypopnées (AHI) ; d'après (Nieto et al. 2012).

Parmi les 1 522 patients inclus dans l'étude, 365 (24%) présentaient un SAS (IAH > 5). Parmi ceux-ci, 84 patients avaient un SAS modéré et 59 patients un SAS sévère. Au cours de l'étude 112 patients sont décédés dont 50 par cancer (8 pulmonaires, 4 colorectaux, 4 ovariens, 4 endométriales, 3 cérébraux, 3 du sein, 3 CHC, et d'autres moins fréquents). La mortalité, qu'elle soit par cancer ou non, était linéairement corrélée à la sévérité du SAS. Le résultat le

plus important de l'étude est que les patients avec un SAS sévère présentaient un risque relatif de décès par cancer estimé à 3.8 par rapport aux patients non apnéiques ($p < 0.001$). Après ajustement sur les différents critères épidémiologiques, les résultats étaient inchangés. En plus de l'index IAH, les auteurs ont également mesuré l'index d'hypoxémie, c'est-à-dire le pourcentage de temps de sommeil passé avec une saturation en oxygène (SaO_2) inférieure à 90% (Tsat 90%). Ici encore, la mortalité par cancer était corrélée à l'index d'hypoxémie, avec un risque relatif ajusté supérieur à 8 chez les patients avec l'index le plus élevé. De manière très intéressante, l'analyse stratifiée a montré que le risque de décéder par cancer était plus élevé chez les patients non obèses par rapport aux patients obèses. Une des principales limites de cette étude est que seule la mortalité par cancer a été observée et non l'incidence de cancers survenus pendant la période de suivi. Enfin d'un point de vue mécanistique, les auteurs évoquent un probable effet de l'hypoxie intermittente pour expliquer les résultats observés, hypothèse que nous allons développer dans la prochaine section de ce manuscrit.

Après avoir étudié les données de la cohorte américaine Wisconsin, l'équipe du Dr Nieto a eu accès aux données d'une seconde cohorte de patients atteints d'apnées obstructives du sommeil (SAOS) recrutés dans le cadre du réseau « Spanish Sleep Network ». Cette cohorte comprend près de 5000 patients ayant réalisé un examen du sommeil entre 2003 et 2007. Cette fois, le protocole prévoyait d'exclure les patients ayant été diagnostiqués pour un cancer avant le diagnostic de SAOS afin de suivre l'incidence du cancer chez les patients inclus. Après screening, 4910 patients ont été inclus et suivis entre 3 et 6 ans. A la fin de l'étude, 261 patients ont reçu un diagnostic de cancer (dont 43 colorectaux, 24 pulmonaires et 20 du sein) soit 5,3% de la population. Le taux d'incidence annuelle des cancers était significativement corrélé à la sévérité du SAOS évaluée tant par l'IAH que par l'index hypoxémique (Tsat 90%)

(Tableau 6). En revanche, après ajustement sur les facteurs confondants, seuls les patients présentant des IAH et des index hypoxémiques élevés continuaient de présenter un risque de cancer augmenté par rapport aux autres patients. Selon les auteurs, l'hypoxie intermittente est la principale composante pathogénique, et à ce titre l'IAH n'est pas un bon indicateur pour évaluer le risque de cancer chez un patient atteint de SAOS. Parmi les limites évoquées de l'étude, les auteurs regrettent qu'il s'agisse encore d'une étude rétrospective et ciblant tous les types de cancers. Ils proposent, en l'occurrence, que les prochaines études soient prospectives et surtout qu'elles se focalisent sur un type, voir un sous-type, de cancer.

Tableau 6 : Incidence et densité d'incidence (nombre de patients divisé par la durée de l'observation) de cancers en fonction de la sévérité du syndrome d'apnées obstructives du sommeil (OSA) : estimée par l'index d'apnéeshypopnées (AHI) et par le pourcentage du temps de sommeil passé avec une saturation artérielle en O₂ inférieure à 90% (TSat₉₀) ; d'après (Campos-Rodriguez et al., 2013).

OSA Categories	Cancer Incidence, n	Person-Years of Follow-up	Cancer Incidence Density Rates*	Incidence Density Ratio (95% CI)
AHI categories				
<18.7	67	7,181.9	9.33	1
18.7-43	89	7,002.7	12.71	1.40 (0.99-1.87)
>43	105	7,155.5	14.67	1.60 (1.16-2.14) [†]
TSat₉₀ categories				
<1.2%	43	7,190.5	5.97	1
1.2-12%	83	7,182.4	11.58	1.90 (1.33-2.83) [‡]
>12%	135	6,967.1	19.36	3.20 (2.28-4.62) [§]

Definition of abbreviations: AHI = apnea-hypopnea index; CI = confidence interval; OSA = obstructive sleep apnea; TSat₉₀ = percent of night time spent with oxygen saturation < 90%.

* Rates per 1,000 person-years.

[†] P = 0.003, compared with the reference group (AHI < 18.7).

[‡] P = 0.0006 compared with the reference group (TSat₉₀ < 1.2%).

[§] P < 0.0005 compared with the reference group (TSat₉₀ < 1.2%).

II. Cancer et hypoxie intermittente

1. Cancer et Hypoxie

Une tumeur cancéreuse se caractérise par la prolifération anarchique et illimitée d'un clone cellulaire associée à une angiogenèse anormale. Pour maintenir leur pouvoir invasif, les cellules tumorales doivent stimuler la production d'un nouveau réseau vasculaire dirigé vers le foyer tumoral dont le développement génère un environnement de plus en plus hypoxique (De Palma et al., 2017). L'hypoxie tumorale entraîne des modifications des processus cellulaires d'adaptation et de survie parmi lesquels on peut citer l'angiogenèse, l'invasion métastatique ou encore la résistance aux thérapies. L'hypoxie chronique tumorale est un marqueur parfaitement décrit dans le processus tumoral (Vaupel et al., 2005). Dans ce contexte, l'hypoxie intermittente, mécanisme pathologique majeur du SAOS, pourrait être à l'origine de fluctuations de l'oxygénation à la fois au niveau tumoral mais aussi et surtout au niveau de l'environnement tumoral participant à l'aggravation du contexte néoplasique. Conceptuellement il existe une nette différence entre l'hypoxie chronique décrite au niveau tumoral et l'hypoxie intermittente décrite dans le SAOS puisque la première est considérée comme continue tandis que la seconde est par définition intermittente. En réalité, l'hypoxie tumorale peut présenter une composante intermittente mais à une échelle de temps beaucoup plus longue que dans le cas du SAOS. En effet, il n'est pas rare qu'une tumeur subisse des cycles d'hypoxie/réoxygénation pouvant durer plusieurs heures et que ces cycles se répètent sur des périodes de l'ordre du jour voire de la semaine. À ce jour, trois types d'hypoxie tumorale ont été identifiés : l'hypoxie continue également appelée hypoxie par diffusion limitée, l'hypoxie par perfusion limitée et l'hypoxie cyclique parfois appelée hypoxie intermittente (Bayer et al., 2012; Michiels et al., 2016).

L'hypoxie dite continue suit un gradient décroissant à partir des vaisseaux sanguins fonctionnels ce qui conduit d'abord à une zone hypoxique puis à une zone distale nécrotique. L'hypoxie par perfusion limitée concerne toutes les cellules tumorales. Elle est la conséquence d'une consommation accrue d'O₂ par les cellules cancéreuses dans un contexte d'apport insuffisant et en oxygène par des vaisseaux sanguins anormaux.

Ces deux formes d'hypoxie contribuent au déséquilibre entre l'apport et le besoin en oxygène au niveau des cellules cancéreuses dans des délais différents, mais qui peuvent se chevaucher, entraînant un phénomène chaotique et complexe dans le temps et l'espace (Bayer et Vaupel, 2012) et qui présente une composante intermittente ou cyclique. Ces cycles d'hypoxie intermittente sont très différents de ceux retrouvés dans le SAOS, il est d'ailleurs important de ne pas les confondre dans la littérature.

Les travaux d'Almendros et al. ont été les premiers à mettre en évidence les effets délétères de l'HI associée au SAOS dans le cancer. Les premières données, publiées au début des années 2010, ont ainsi montré que l'exposition à des cycles d'HI similaires à ceux retrouvés dans le SAOS favorisait la progression tumorale et augmentait le potentiel métastatique des tumeurs ainsi que leur résistance aux traitements (Almendros et al., 2012 a; b, 2013, 2014 a). En 2015, l'équipe du Pr. Farré a proposé un schéma récapitulant les différents mécanismes physiopathologiques susceptibles d'être impliqués dans l'effet délétère de l'HI (Ángel Martínez-García et al., 2015) (Figure **16**).

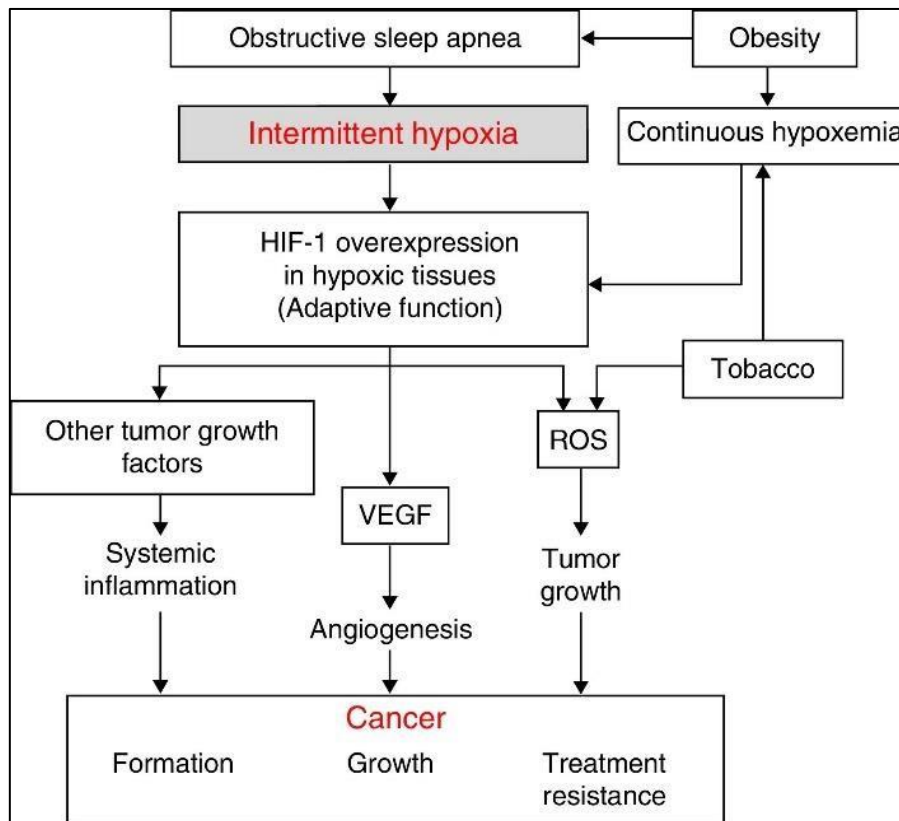


Figure 16 : Hypothèses physiopathologiques sur le lien entre SAOS et cancer. Abréviations : HIF-1, facteur inducible par l'hypoxie; ERO, espèces réactives d'oxygène; VEGF, facteur de croissance endothélial vasculaire; d'après (Ángel Martínez-García et al., 2015).

Ce schéma propose qu'en conditions d'HI chronique liée au SAOS, la conversion d'une cellule saine en cellule cancéreuse, la croissance tumorale et la dissémination métastatique sont majorées par trois facteurs liés à l'activation du facteur de transcription HIF-1 : 1) un stress oxydant ; 2) un niveau élevé d'inflammation systémique ; et 3) une angiogenèse majorée par la transcription de VEGF, gène cible de HIF-1. Les auteurs considèrent que l'activation de divers facteurs de transcription constitue la clé de voute de la réponse adaptative délétère qu'elle génère. Plusieurs facteurs de transcription ont été étudiés dans le cadre de l'HI chronique, les facteurs HIF-1 et NF- κ B ayant été les plus explorés dans le contexte du cancer.

Les séquences de désaturation-réoxygénation caractéristiques de l'HI favorisent directement et indirectement la production d'ERO. En effet, l'HI induit un déséquilibre entre production et dégradation des agents pro- et antioxydants qui conduit à une surproduction d'ERO (Yamauchi

et al., 2005). Ceci provoque des modifications structurales et génomiques directement responsables du développement du cancer tel que démontré par Wang et al. sur des cellules humaines de CHC (Wang et al., 2016). Toutefois, en conditions d'HI, cet effet direct des ERO ne serait pas le mécanisme central. Les ERO agiraient surtout en activant HIF-1 et NF- κ B, connus pour leur rôle dans la tumorigenèse mais également pour leur capacité de majorer la production d'ERO notamment à travers la chaîne de respiration mitochondriale et l'activation de la NADPH oxydase (NOX) (Nanduri et al., 2015).

2. Hypoxie intermittente – Stress Oxydant – Inflammation – HIF-1

Concernant HIF-1, le stress oxydant accroît son activité transcriptionnelle via une augmentation de la synthèse, de la stabilisation et de l'activation de sa sous-unité HIF-1 α . La surproduction d'ERO en réponse à l'activation de la NOX par l'HI active la phospholipase C (PLC) elle-même responsable de l'activation de la protéine kinase C (PKC) et de la protéine kinases Ca²⁺/calmoduline-dépendantes (CAMK). D'une part, la PKC va favoriser la synthèse de HIF-1 α en activant la voie mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) et sa stabilisation en inhibant les prolyl-hydroxylases (PHD). D'autre part, la CAMK favorise l'interaction entre HIF1 α et son cofacteur p300 entraînant sa migration dans le noyau, sa dimérisation avec la sous-unité HIF-1 β et la transcription de gènes cibles (Figure 17). Ainsi, l'augmentation de la synthèse, de la stabilité, de la migration nucléaire et de la dimérisation de la sous-unité HIF1 α vont être à l'origine d'une augmentation de l'activité transcriptionnelle de HIF-1 (Semenza, 2009).

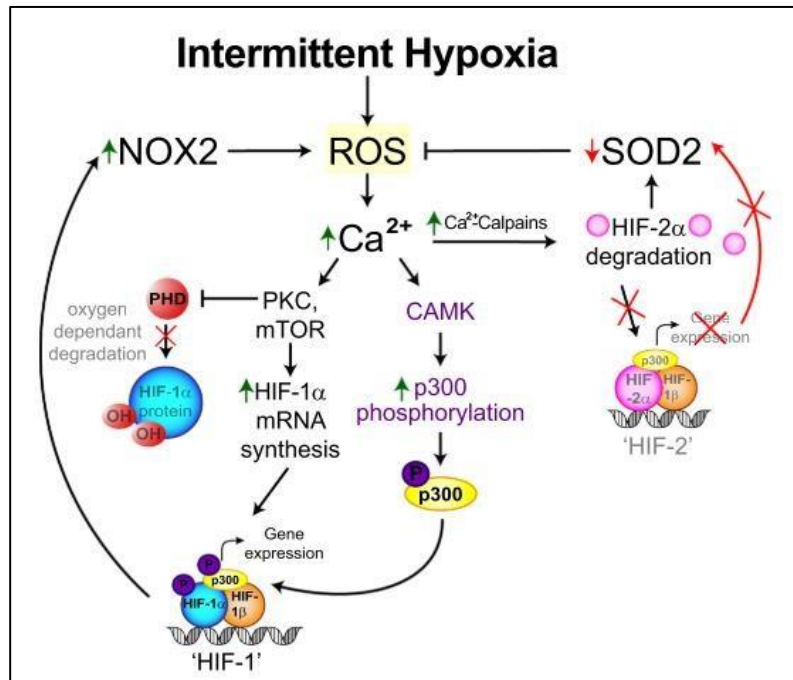


Figure 17 : Figure représentant les différentes voies de signalisation intervenant dans l'expression et l'activité de HIF-1 en réponse à l'HI. ROS : espèces réactives de l'oxygène ; PLC : phospholipase C ; PKC : protéine kinase C ; mTOR : mammalian Target Of Rapamycin ; CAMK : protéine kinase Ca²⁺-calmoduline dépendante; d'après (Hunyor et al., 2018).

Il est également important de préciser que l'HI semble être un stimulus plus puissant que l'hypoxie continue puisqu'elle induit une expression et une activité importantes et prolongées de HIF-1 qui persistent lors du retour à la normoxie, contrairement à l'hypoxie continue (Yuan et al., 2005, 2008; Belaidi et al., 2009) (Figure 18).

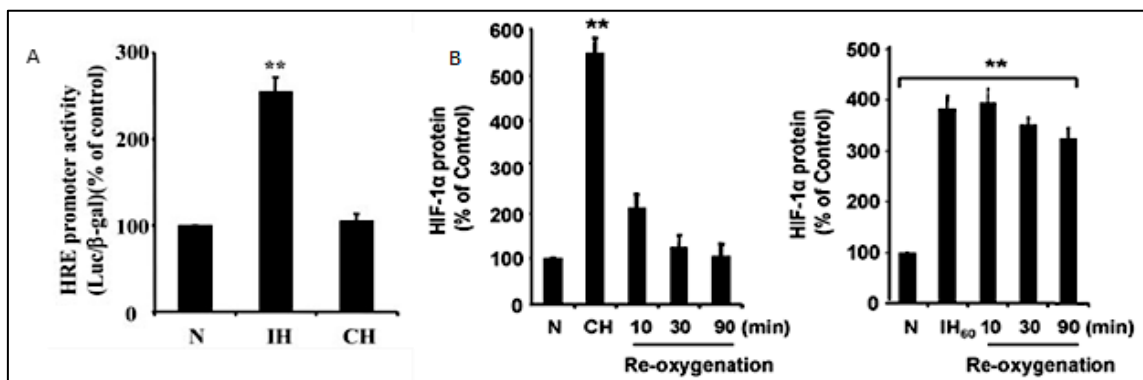


Figure 18 : Activation différentielle de HIF-1 par hypoxie intermittente (IH) et continue (CH) dans les cellules de phéochromocytome PC12. A : niveau d'activation de HIF-1 mesuré par l'activité du promoteur d'après (Yuan et al., 2005); B : effet de la réoxygénation sur les niveaux de protéine HIF-1 ; d'après (Yuan et al., 2008).

En plus d'augmenter l'activité transcriptionnelle de HIF 1, le stress oxydant associé à l'HI favorise la dégradation de HIF-2 (Hunyor et al., 2018). Un déséquilibre dans la balance HIF1/HIF-2 a été impliqué dans les complications hypertensives du SAOS (Semenza et al., 2018) mais a également un rôle potentiel dans la croissance tumorale. En effet, la suppression du gène HIF-1 α ralentit la croissance tumorale, limite le pouvoir métastatique et réduit l'incidence de cancer alors que la délétion du gène codant pour HIF-2 α produit les effets opposés (Keith et al., 2012).

Il a été démontré que le facteur de transcription HIF-1 joue un rôle majeur dans la réponse à l'hypoxie tumorale. HIF-1 joue aussi un rôle central dans la néovascularisation locale en réponse à la raréfaction en oxygène dans l'environnement direct de la tumeur (Hatfield et al., 2019). Lorsqu'une tumeur est exposée à un appauvrissement en oxygène, un processus d'angiogenèse se met en place médié par des facteurs de croissance dont le VEGF-A, le VEGF Receptor 2 (VEGFR-2). Dans les tissus sains, ce mécanisme est bénéfique puisqu'il répond aux besoins en oxygène. Mais dans les tumeurs cancéreuses, cette néovascularisation représente une excellente voie de propagation et de dissémination métastatique. En outre, HIF-1 est connu pour réguler de multiples gènes cibles liés au cancer et impliqués dans la survie des cellules cancéreuses ainsi que leur prolifération comme cela a été déjà largement décrit (Milani et al., 2008; Balamurugan, 2016) ainsi que certains gènes pro-inflammatoires (Balamurugan, 2016), ceci de manière plus importante qu'en hypoxie continue (Gutsche et al., 2016; Liu et al., 2017; Chen et al., 2018)

3. Hypoxie intermittente – Stress Oxydant – Inflammation – NF- κ B

Concernant NF- κ B, les ERO facilitent son activation en le libérant de son complexe inhibiteur I κ B (Figure 19). Une fois activé ce dernier entraîne l'expression de facteurs proinflammatoires, tels que le Tumor necrosis Factor α (TNF α) et des interleukines (IL-6 ou encore IL-8), contribuant à instaurer un terrain inflammatoire local et systémique propice au développement tumoral. De plus, le TNF α est capable de stimuler à son tour l'activité de NF- κ B (Li et al., 2012; Xia et al., 2014) produisant ainsi un état inflammatoire prolongé susceptible d'engendrer une baisse de la réponse immunitaire et des mutations oncogéniques : inhibition de l'apoptose, prolifération cellulaire, métastases et angiogenèse (Xia et al., 2014).

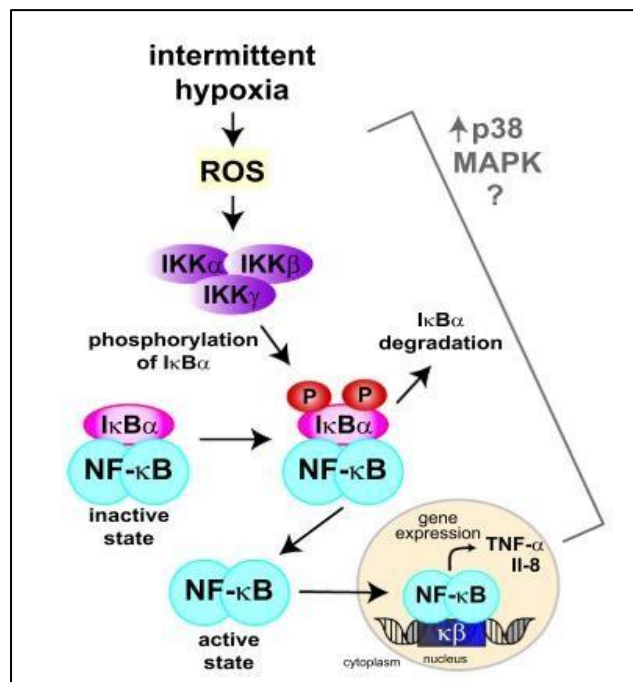


Figure 19 : Représentation de l'activité NF- κ B. NF- κ B existe sous une forme inactive liée à l'inhibiteur I κ B, qui retient le NF- κ B dans le cytoplasme. Après une stimulation appropriée, un complexe appelé IKK est activé, ce qui conduit à la phosphorylation, à l'ubiquitination et à la dégradation de l'I κ B. Cela libère le NF- κ B et permet la translocation vers le noyau, permettant la transcription des gènes cibles du NF- κ B ; d'après (Hunyor et al., 2018).

En résumé, nous avons vu que l'hypoxie intermittente pouvait induire un stress oxydant et une inflammation chronique susceptibles d'activer des mécanismes pro-tumoraux à travers les facteurs HIF-1 et NF- κ B, et que ces mêmes facteurs pouvaient eux-aussi produire du stress oxydant. De plus, HIF-1, NF- κ B et ERO seraient susceptibles de s'activer mutuellement tel que proposé dans le développement des pathologies cardiovasculaires liées au SAOS (Lavie et al., 2009). C'est probablement cette boucle complexe d'auto-activation qui permettrait de majorer les effets respectifs de ces facteurs sur le développement tumoral en entretenant simultanément le stress oxydant et l'inflammation sous-jacents.

III. SAOS, hypoxie intermittente et cancer du sein

De nombreux travaux ont montré que le cancer du sein est sensible à l'hypoxie et que la réponse est orchestrée par le facteur HIF-1. Ainsi, le taux circulant d'HIF-1 augmente au cours de la carcinogénèse du sein et favorise la prolifération et l'évolution tumorale (Bos et al., 2003; Milani et al., 2008; Chen et al., 2010). Une étude longitudinale menée sur données médicales issues du système d'assurance taiwanais (NHIRD) a été réalisée sur 846 femmes présentant un SAOS et 4230 femmes non apnéiques (Chang et al., 2014). L'objectif principal était de comparer le risque relatif de survenue d'un cancer du sein entre ces deux cohortes. Premier constat, l'analyse des caractéristiques démographiques montre une hétérogénéité importante entre les deux populations puisque les femmes avec SAOS présentaient plus de diabète, d'obésité, d'hypertension et d'hyperlipidémie. Second résultat, 12 patientes avec SAOS (1.4%) ont développé un cancer dans les 5 années de suivi comparativement à 32 patientes non apnéiques (0.8%) soit un risque relatif non ajusté de 1.89 et un risque relatif ajusté, entres autres sur les critères de comorbidités, de 2.09. Enfin, la survie sans événement était moins bonne chez la population avec SAOS (log-rank test, $p = 0.056$). Dans leur discussion les auteurs évoquent toutefois un risque de confusion entre l'effet du SAOS et celui de l'obésité sur la survenue du cancer dans les 5 années de suivi.

Une seconde étude, toujours sur les données taiwanaises, s'est intéressée au risque de développer un cancer en fonction de trois pathologies liées au sommeil : l'insomnie, la parasomnie et le SAOS (Fang et al., 2015). Les données d'une population de 36 000 patients atteints d'un cancer, dont 5 000 avec et 31 000 sans pathologie du sommeil et 75 000 patients contrôles non atteints d'un cancer, dont 10 000 avec et 65 000 sans trouble du sommeil ont été analysées. Cette étude a confirmé que les patients ayant une maladie du sommeil ont une incidence plus élevée de cancer que les autres, tous types de cancers confondus (RR ajusté =

1.71, $p < 0.001$). Lorsque l'on regarde l'analyse détaillée en fonction du type de cancer et du type de trouble du sommeil, on constate que le risque relatif ajusté de développer un cancer du sein est particulièrement augmenté dans la population souffrant de SAOS (RR = 2.1, $p < 0.05$). Les auteurs évoquent notamment l'impact des troubles du sommeil sur l'immunité comme mécanisme potentiel pour expliquer cet effet protumoral mais sans toutefois apporter plus de précisions.

En 2017, une équipe chinoise a comparé les effets de l'hypoxie intermittente et de l'hypoxie continue sur le pouvoir invasif d'une lignée de cellules de cancers du sein triple-négatif MDAMB-231 (Figure 20).

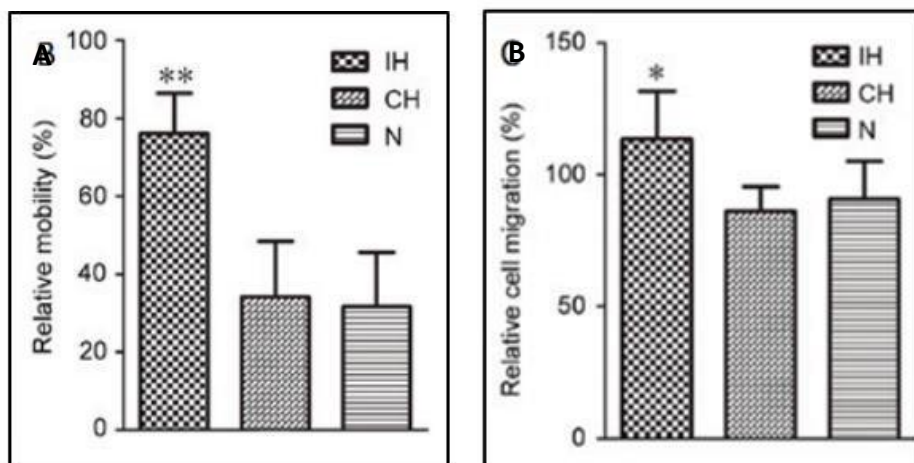


Figure 20 : Effets de l'hypoxie continue (CH) ou de l'hypoxie intermittente (IH) comparée à la normoxie (N) sur la migration et la prolifération des cellules MDA-MB-231. A. La mobilité a été évaluée par wound healing ; la mobilité relative a été calculée comme suit : $Mobilité\ relative = (largeur\ de\ la\ plaie\ à\ 0\ h - largeur\ de\ la\ plaie\ à\ 48\ h) / largeur\ de\ la\ plaie\ à\ 0\ h$. **B.** La migration cellulaire ont été évalué par des tests de Transwell migration ; une quantification de la proportion de cellules qui ont migré sur la partie inférieure de la chambre; d'après (Liu et al., 2017).

A l'aide de siRNA dirigés contre les ARN de HIF-1 α , les auteurs ont montré que HIF-1 contribuerait de façon significative à la potentialisation de la migration par l'HI. Une autre observation intéressante de ces auteurs est que l'effet de l'HI sur la migration disparaissait lorsqu'on augmentait la durée des cycles d'hypoxie, en accord avec l'hypothèse proposée par

Almendros et al. d'une variabilité de la réponse cellulaire selon l'intensité de l'exposition (Almendros et al., 2014 b). Dans leur revue, Almendros et al. soulignent que la réponse de l'organisme dépend de la fréquence, de la durée et de l'intensité des cycles d'HI avec comme conséquence une réponse bénéfique à faible intensité et délétère à haute intensité d'HI (Almendros et al., 2014 b) (Figure 21).

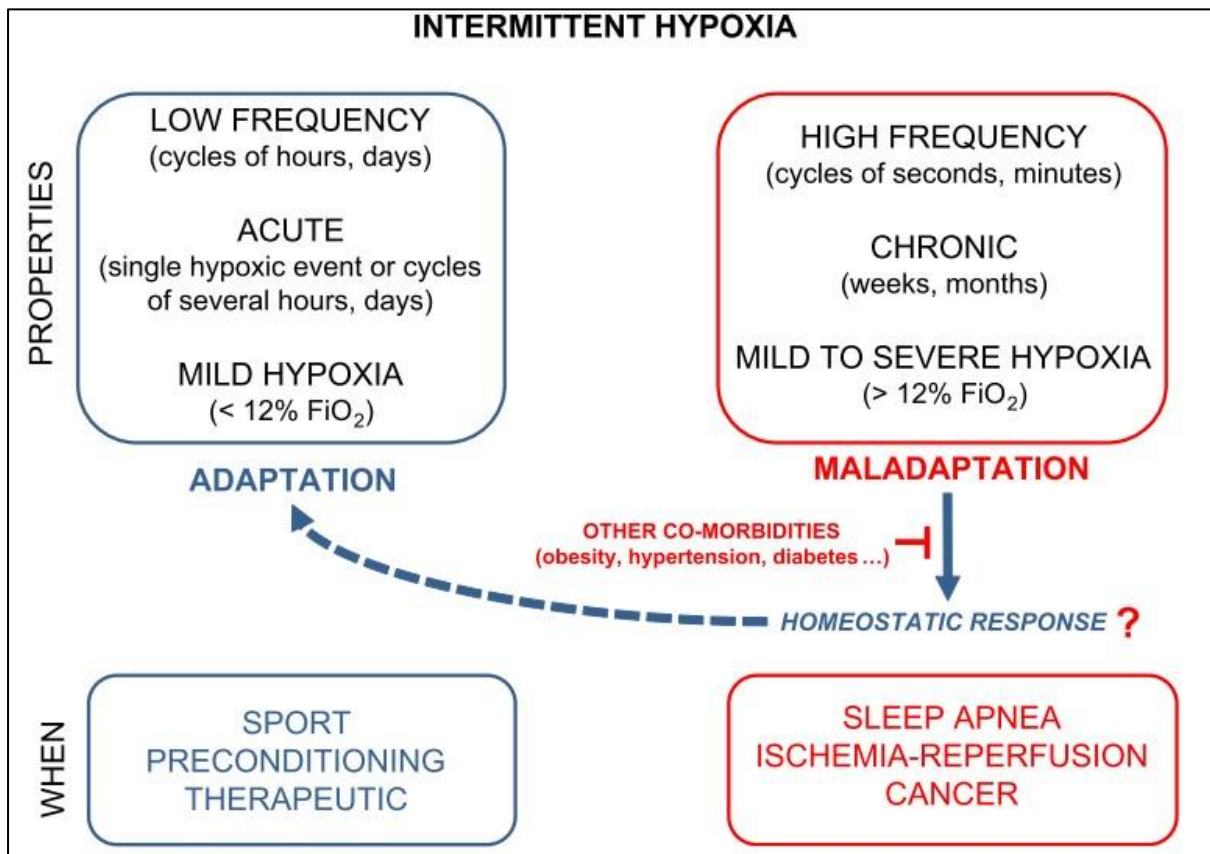


Figure 21: Effets protecteurs et délétères de l'hypoxie intermittente (HI) liés à des mécanismes adaptatifs à l'échelle de l'organisme entier; d'après (Almendros et al., 2014 b)

Ceci est particulièrement net lorsque l'on regarde les conséquences cardiovasculaires de l'HI : une exposition courte avec des cycles de basse fréquence a des effets cardioprotecteurs (réduction de la taille de l'infarctus et des arythmies) alors qu'une exposition plus longue et/ou associée à une fréquence de cycles plus élevée a les effets inverses (augmentation de la taille de l'infarctus, fibrose, hypertrophie ventriculaire, arythmies) (Almendros et al., 2014 b).

Cette observation est confirmée par les travaux de Yoon et al. qui ont montré dans un modèle de mélanome murin implanté en sous cutané chez la souris que l'augmentation de la progression tumorale en conditions d'HI est dépendante de la fréquence des cycles d'HI : une augmentation du poids et de la taille des tumeurs est observée avec des cycles de fréquence élevée, que l'hypoxie ait été introduite avant ou après l'implantation des cellules tumorales chez l'animal (Yoon et al., 2017). Selon les auteurs la réponse à l'HI serait donc susceptible de varier fortement en fonction des conditions du stimulus. A ce jour il n'existe pas à notre connaissance de publications montrant un effet favorable de l'HI à basse fréquence ou du SAOS dans le cancer.

A l'opposé, le lien entre agressivité du cancer du sein et HI est bien mis en évidence par un faisceau d'observations indépendantes mais concordantes :

- 1) Deux études rétrospectives longitudinales ont montré que les femmes avec un SAOS diagnostiqué avaient plus de risque de développer un cancer du sein (Chang et al., 2014; Fang et al., 2015).
- 2) En conditions d'hypoxie intra-tumorale soutenue (< 10 mmHg de pO₂) les tumeurs du sein qui surexpriment le facteur HIF-1 α sont plus agressives avec plus de croissance, de vascularisation, de colonisation et de métastases (Semenza, 2016) ;
- 3) L'exposition ou le préconditionnement de cellules du cancer du sein soumis à des cycles d'hypoxie-réoxygénation de faible fréquence induit une surexpression de HIF1 α (Chen et al., 2018) connue pour avoir un effet favorisant le développement tumoral, tel que mentionné plus haut.

Ces différentes observations renforcent l'hypothèse selon laquelle l'HI a des effets délétères dans la survenue et l'agressivité du cancer du sein. Néanmoins, des données récentes suggèrent que le lien entre SAOS et cancer du sein serait plus complexe qu'il n'y paraît.

En effet, dans une étude récente sur des femmes de moins de 65 ans atteintes d'un cancer du sein, Campos-Rodriguez et al. ont observé, en utilisant le taux de Ki67 comme marqueur de sévérité, que les patientes présentant un cancer prolifératif (Ki67 > 29%) n'avaient pas un IAH plus élevé que celles avec un cancer non prolifératif (Ki67 < 28%). En analyse secondaire ou en analyse de sous-groupe, aucune différence n'a été observée concernant le stade tumoral ou le profil moléculaire tumoral, avec comme critères l'IDO, le temps de sommeil passé avec une SaO₂ < 90% ou encore la valeur minimale de la SaO₂. Dans cette étude, les auteurs concluent à une absence de lien entre la présence ou la sévérité du SAOS et l'agressivité du cancer du sein, soulignant au passage que leurs résultats sont contradictoires avec les études rétrospectives taiwanaises. Dans la discussion, ils évoquent le manque de données précliniques sur l'effet de l'HI en fonction du type de cancer du sein (Campos-Rodriguez et al., 2018).

En effet, à ce jour aucune étude préclinique ou de cohorte n'a pu démontrer objectivement le lien entre HI et cancer du sein ni mettre en évidence les mécanismes susceptibles de majorer la survenue ou le développement du cancer du sein en réponse à l'HI ou chez les patientes apnéiques.

D. Hypothèse et Objectif

Dans ce projet nous avons souhaité explorer les mécanismes physiopathologiques par lesquels l'hypoxie intermittente peut favoriser le développement tumoral dans le contexte du cancer du sein. A partir des données dont nous disposons au début de ce travail, c'est-à-dire en 2014, nous avons élaboré une hypothèse mécanistique basée sur différentes études du laboratoire mettant en évidence une activation spécifique du système HIF-1/ET-1 dans les tissus systémiques des animaux exposés à l'HI (Belaidi et al., 2016; Briançon-Marjollet et al., 2016; Gras et al., 2016).

Nous pouvons brièvement résumer ainsi cette hypothèse :

« L'hypoxie intermittente chronique caractéristique du SAOS favoriserait la prolifération, tumorale et l'invasion métastatique à travers activation de la voie HIF-1/VEGF/ET-1. En conditions d'hypoxie intra-tumorale chronique la sous-unité cytosolique oxygène-dépendante HIF-1 α se retrouve stabilisée notamment du fait de l'inhibition des prolylhydroxylases qui contribuent à sa dégradation (Semenza, 2009). L'augmentation de l'activité de HIF-1 qui en résulte entraîne la transcription d'un certain nombre de gènes cibles et la synthèse de nombreuses protéines dont le VEGF, ET-1, NF-kB, TNF, MMP9, etc. qui vont favoriser localement le développement tumoral, la néo-angiogenèse, l'inhibition du système immunitaire ou encore la résistance au traitement.

Ce processus déclenché par l'hypoxie locale intra-tumorale constitue la « théorie du microenvironnement » (Petrova et al., 2018; Jing et al., 2019). En présence de SAOS nous pensons que l'effet de l'hypoxie continue intra-tumorale est potentialisé par l'hypoxie intermittente chronique liée aux apnées qui, elle, touche tous les tissus. Ainsi la stabilisation de HIF-1 α au niveau tumoral serait accentuée par l'hypoxie intermittente systémique liée au

SAOS. Comme cette HI est systémique, elle ne se cantonne pas au microenvironnement, nous avons donc appelé notre hypothèse la « théorie du macroenvironnement ». Ne pouvant pas explorer l'ensemble des gènes cibles de HIF impliqués dans le cancer, nous avons décidé de nous focaliser sur un acteur qui nous a paru central, à savoir l'endothéline 1. En effet, des travaux ont montré que les taux plasmatiques d'ET-1 sont augmentés chez les patients atteints de cancer et qu'elle favorise de nombreux processus pro-tumoraux tels que la mitogenèse, la croissance tumorale et l'invasion métastatique, en induisant un phénotype invasif dans les cellules cancéreuses notamment via l'activation des MMP (Asham et al., 2001; Bagnato et al., 2004, 2008 a, 2011).

En outre, l'ET-1 contribue, à travers ses récepteurs ETA, à accroître l'activation du facteur HIF1 en favorisant la production d'ERO par la voie de la NADPH oxydase. Rosanò et al. ont montré que l'ET-1 avait la capacité d'inhiber la PHD2 majorant ainsi les effets de l'hypoxie cellulaire, la stabilisation de HIF-1 α et donc sa propre expression (Figure **22**). En agissant localement l'ET1 contribue ainsi à la formation d'une boucle autocrine stabilisant les effets de HIF-1 et produisant un environnement favorable à la croissance tumorale, à l'angiogenèse et à la dissémination métastatique (Rosanò et al., 2013). L'endothéline favorise également l'angiogenèse, de façon directe mais également indirectement par la promotion de la sécrétion de VEGF largement reconnu pour son implication dans la néovascularisation tumorale (Rundqvist et al., 2013).

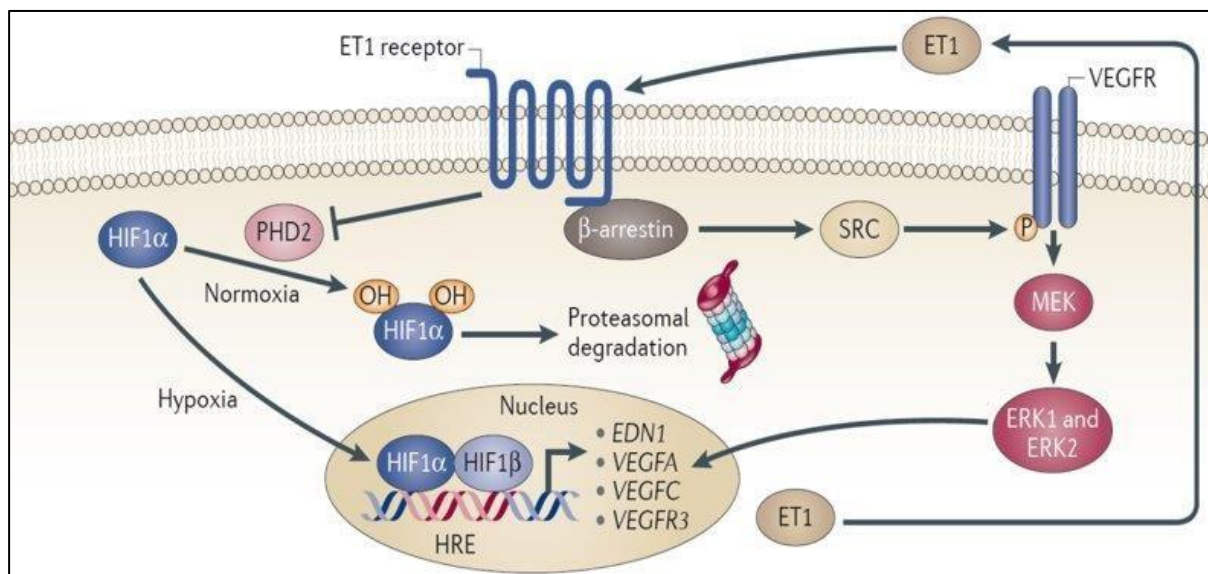


Figure 22 : Interactions entre la signalisation ET1 et la voie de signalisation HIF1 α ; d'après (Rosanò et al., 2013).

En somme, nous pensons qu'en conditions de SAOS, les fluctuations intermittentes et répétées d'oxygénation tissulaire conduisent à une suractivation de HIF-1 aussi bien au niveau tumoral (comme dans la théorie du microenvironnement) qu'au niveau des cellules stromales saines (ce qui n'est pas le cas dans la théorie du microenvironnement). Nous avons résumé notre hypothèse dans un schéma illustratif (Figure 23).

L'objectif principal de ce travail de thèse a donc été d'explorer, à travers une étude de l'axe HIF-1/ET-1/VEGF, les effets de l'hypoxie intermittente sur le développement tumoral dans le cancer du sein. Pour mener à bien ce travail nous avons opté pour un protocole mixte alliant à la fois des études *in vivo* dans un modèle animal de cancer du sein métastatique mais aussi des études *in vitro* avec un modèle cellulaire visant à explorer les mécanismes moléculaires mis en jeu en relation avec l'HI. Pour la partie animale nous avons eu recours au dispositif d'exposition à l'hypoxie intermittente pour rongeur du laboratoire. Il s'agit d'un dispositif unique en Europe utilisé en routine par notre équipe et qui permet d'explorer l'impact de l'hypoxie intermittente dans le développement de différentes pathologies. En revanche nous ne disposons pas d'équivalent pour les protocoles *in vitro* pour l'exploration des mécanismes

cellulaires. Une partie de mon travail de thèse a consisté à mettre au point un dispositif d'exposition cellulaire à l'hypoxie intermittente comme nous le verrons dans la partie suivante.

Nous présentons dans la suite de ce manuscrit à la fois les protocoles *in vivo*, la mise au point du dispositif cellulaire d'hypoxie intermittente et les protocoles *in vitro*. Pour faciliter la compréhension de notre démarche et l'articulation des différentes études menées, nous avons résumé les principales étapes du projet dans un plan expérimental détaillé.

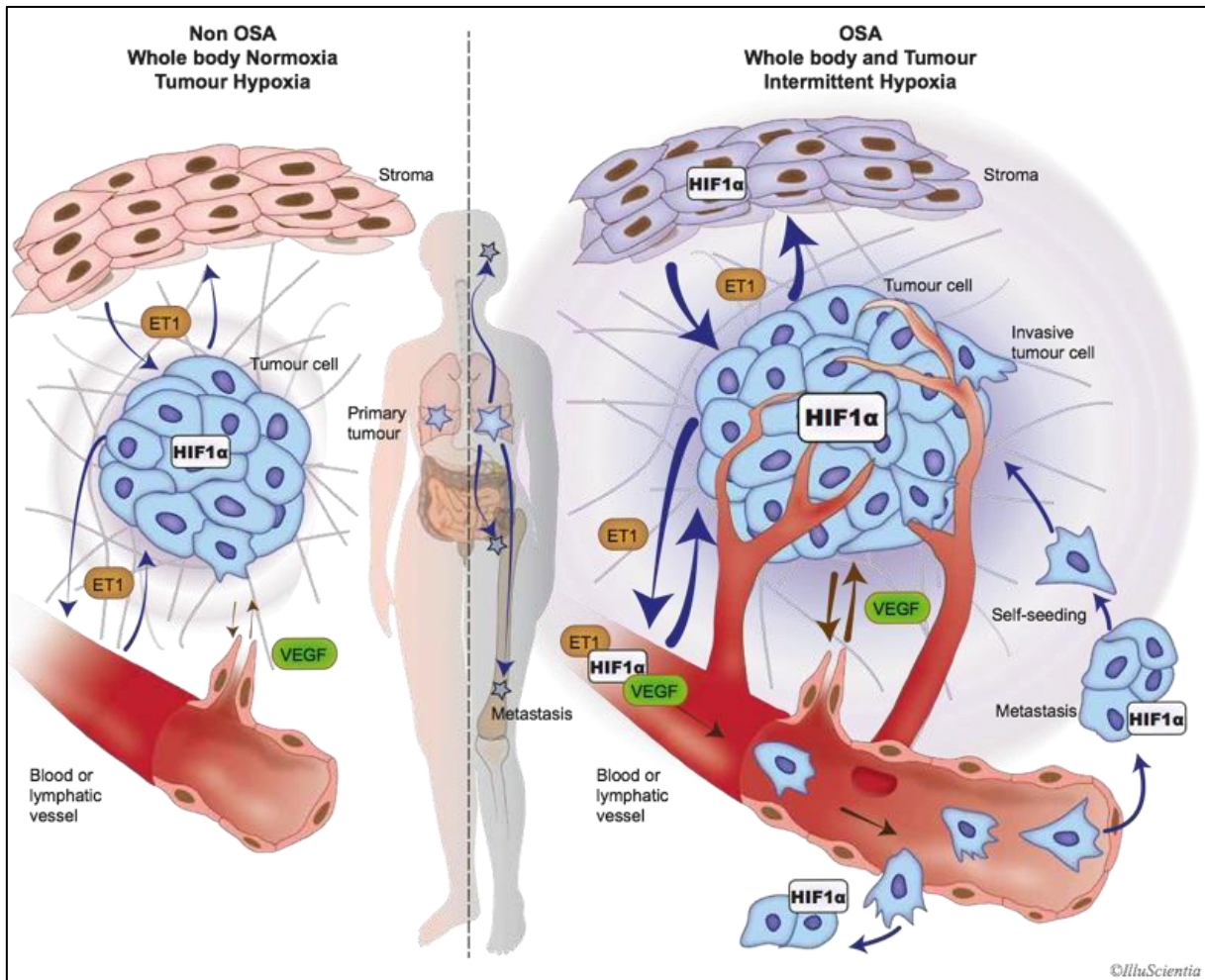


Figure 23 : Hypothèse du macroenvironnement. Chez les patients atteints d'un cancer et ne présentant pas de SAOS (partie gauche), la plupart des tissus, à l'exception de l'environnement de la tumeur, sont bien oxygénés et les cellules tumorales interagissent principalement avec leur microenvironnement hypoxique via la production de gènes cibles de HIF-1 tels que le VEGF et l'ET-1. Chez les patients atteints d'un cancer et d'un SAOS (partie droite), l'HI et le stress oxydant sont systémiques et donc présent dans tout l'organisme dont la tumeur et son microenvironnement. Par conséquent, les interactions tumeur-micro-environnement sont renforcées par un mécanisme de feedback positif avec une activité de HIF-1 forte et soutenue.

Le macroenvironnement participe également, soit par interaction directe (c'est-à-dire par une vascularisation et des échanges paracrines accrus non illustrés ici) avec les cellules du microenvironnement, soit par la production de substances transportées par le sang et délivrées à la tumeur. Le processus métastatique est favorisé par toutes ces altérations mais aussi par l'effet direct de l'HI sur les cellules métastatiques auto-ensemencées ou circulantes.

APPROCHE EXPERIMENTALE

A. Mise au point d'un dispositif de cultures cellulaires exposées à l'Hypoxie

Intermittente

I. Introduction

Pour étudier les mécanismes physiopathologiques du Syndrome d'Apnées Obstructives du Sommeil et leurs répercussions sur certaines maladies chroniques comme l'hypertension artérielle, le diabète, la stéatose hépatique ou encore le cancer, le laboratoire a mis au point depuis plusieurs années un dispositif d'exposition de rongeurs (rat et souris) à des cycles quotidiens d'hypoxie - réoxygénation. Basé sur un système ingénieux de contrôle du taux d'oxygène dans les cages des animaux par injection d'azote à haute pression, ce dispositif a permis d'explorer les conséquences de l'hypoxie intermittente sur des modèles précliniques de maladies. Les animaux peuvent être exposés à des cycles de fréquences et d'intensité variables pendant quelques heures, plusieurs jours voire plusieurs semaines. Cette exposition à l'HI entraîne des fluctuations d'apport en oxygène qui se traduit par des séquences d'hypoxie-réoxygénation systémiques et tissulaires. Il devient alors possible d'étudier et de mieux comprendre les conséquences du SAOS sur des modèles rongeurs *in vivo*. Les animaux ainsi exposés vont développer des réponses complexes, à différentes échelles (cellulaire, tissulaire, organique et systémique) dont les effets pourront être mesurés *in situ* ou sur prélèvements (plasma, tissus, organes entiers) *ex vivo*. Il convient de préciser que malgré une ergonomie du dispositif adaptée à de nombreuses expérimentations, certaines explorations demeurent incompatibles avec une exposition concomitante à l'HI comme par exemple, les mesures par imagerie en temps réelle.

Pour compléter ce dispositif et mieux comprendre les mécanismes mis en jeu au niveau cellulaire il était important de compléter l'approche expérimentale par un dispositif d'HI

adapté aux modèles cellulaires permettant de décliner plus librement les conditions expérimentales sans augmenter à outrance les contraintes techniques.

La cellule tumorale est une cellule qui a perdu ses fonctions physiologiques à la suite de mutations répétées qui ont fini par détourner la cellule de son rôle propre et lui donner de nouvelles capacités d'interactions avec son environnement direct, son microenvironnement.

Pour explorer les répercussions du SAOS et de l'HI sur le développement tumoral il était essentiel de pouvoir combiner des expériences à l'échelle de l'animal pour suivre notamment la croissance et le pouvoir métastatique de la tumeur avec des expériences à l'échelle cellulaire permettant d'observer le comportement des cellules tumorales en réponse au stimulus d'HI. Un dispositif permettant le contrôle du taux d'oxygène dans des boîtes de cultures cellulaires était donc indispensable pour mimer ce stimulus localement.

Nous présentons ici un article publié en 2017 dans le journal Américain « American Journal of Physiology-Cell Physiology » qui présente le dispositif mis au point au laboratoire pour compléter la plateforme d'hypoxie HypE (<https://hp2.univ-grenoble-alpes.fr/plateforme-dhypoxie-hype>).

II. Résumé en Français

Appliquer des cycles d'hypoxie-réoxygénation en culture cellulaire avec une durée de cycle mimant précisément les variations observées chez des patients souffrant d'apnées obstructives du sommeil est un important défi technique mais crucial notamment pour étudier les voies moléculaires affectées par l'hypoxie intermittente liée au SAOS. Les cellules doivent être exposées aux concentrations et aux fluctuations d'oxygène correspondant à celles rencontrées dans les tissus, au niveau cellulaire, chez le patient atteint de SAOS. Les données de la littérature mettent en exergue le fait qu'il n'existe pas de protocoles standardisés pour un schéma d'hypoxie intermittente qui reflète le contexte cellulaire, tissu dépendant, rencontré dans le SAOS.


Notre objectif était de mettre au point un nouveau dispositif permettant d'exposer plusieurs boîtes de culture cellulaire à des cycles d'hypoxie intermittente cohérent avec le SAOS et avec une consommation de gaz limitée. Notre système de support de plaques de culture perméables au gaz est capable de générer des cycles de normoxie-hypoxie rapides en utilisant seulement 200 ml/min de gaz. Des cycles alternant 1 min à 20 % d'O₂, puis 1 min à 2 % d'O₂, ont donné des valeurs de pO₂ allant de 124 à 44 mmHg respectivement. Le prolongement des phases hypoxique et normoxique à 5 min au lieu d'1 min a permis des variations de pO₂ de 120 à 25 mmHg. Le volume du milieu de culture ou la présence de cellules n'ont que modérément influencé les variations de pO₂. En revanche, le nadir de la phase d'hypoxie augmentait lorsqu'il était mesuré à différentes distances au-dessus de la membrane. Nous avons validé la pertinence physiologique de ce modèle en montrant que l'expression du facteur 1 inductible à l'hypoxie (HIF-1) était significativement augmentée par l'exposition à l'IH dans les cellules endothéliales aortiques humaines, les cellules de carcinome mammaire murin

(4T1) ainsi que dans un modèle de barrière hémato-encéphalique (augmentation de 2.5, 1.5 et 6 fois, respectivement). En conclusion, nous avons mis au point un nouveau dispositif permettant d'effectuer des cycles d'hypoxie intermittente rapide dans des cultures cellulaires, avec une consommation de gaz minimale et la possibilité d'exposer plusieurs boîtes de culture simultanément.

Ce dispositif permettra des études fonctionnelles des conséquences de l'HI et le déchiffrement de la biologie moléculaire de l'HI au niveau cellulaire en utilisant les cycles d'oxygène qui semblent cliniquement pertinents pour le SAOS.

METHODS IN CELL PHYSIOLOGY

An innovative intermittent hypoxia model for cell cultures allowing fast Po_2 oscillations with minimal gas consumption

Mélanie Minoves,^{1,2} Jessica Morand,^{1,2} Frédéric Perriot,^{1,2} Morgane Chatard,³ Brigitte Gonthier,^{1,2} Emeline Lemarié,^{1,2} Jean-Baptiste Menut,⁴ Jan Polak,⁵ Jean-Louis Pépin,^{1,2,6}  Diane Godin-Ribuot,^{1,2} and Anne Briançon-Marjollet^{1,2}

¹HP2 Laboratory, Université Grenoble Alpes, Grenoble, France; ²INSERM, U1042, Grenoble, France; ³Université de Lyon and Université Jean Monnet, Saint-Etienne, France; ⁴SMTEC, Chemin des Vignes, Nyon, Switzerland; ⁵Center for Research on Diabetes, Metabolism and Nutrition Third Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic; and ⁶Centre Hospitalier Universitaire, Grenoble, France

Submitted 3 May 2017; accepted in final form 20 July 2017

Minoves M, Morand J, Perriot F, Chatard M, Gonthier B, Lemarié E, Menut JB, Polak J, Pépin JL, Godin-Ribuot D, Briançon-Marjollet A. An innovative intermittent hypoxia model for cell cultures allowing fast Po_2 oscillations with minimal gas consumption. *Am J Physiol Cell Physiol* 313: C460–C468, 2017. First published July 26, 2017; doi:10.1152/ajpcell.00098.2017.—Performing hypoxia-reoxygenation cycles in cell culture with a cycle duration accurately reflecting what occurs in obstructive sleep apnea (OSA) patients is a difficult but crucial technical challenge. Our goal was to develop a novel device to expose multiple cell culture dishes to intermittent hypoxia (IH) cycles relevant to OSA with limited gas consumption. With gas flows as low as 200 ml/min, our combination of plate holders with gas-permeable cultureware generates rapid normoxia-hypoxia cycles. Cycles alternating 1 min at 20% O_2 followed by 1 min at 2% O_2 resulted in Po_2 values ranging from 124 to 44 mmHg. Extending hypoxic and normoxic phases to 10 min allowed Po_2 variations from 120 to 25 mmHg. The volume of culture medium or the presence of cells only modestly affected the Po_2 variations. In contrast, the nadir of the hypoxia phase increased when measured at different heights above the membrane. We validated the physiological relevance of this model by showing that hypoxia inducible factor-1 α expression was significantly increased by IH exposure in human aortic endothelial cells, murine breast carcinoma (4T1) cells as well as in a blood-brain barrier model (2.5-, 1.5-, and 6-fold increases, respectively). In conclusion, we have established a new device to perform rapid intermittent hypoxia cycles in cell cultures, with minimal gas consumption and the possibility to expose several culture dishes simultaneously. This device will allow functional studies of the consequences of IH and deciphering of the molecular biology of IH at the cellular level using oxygen cycles that are clinically relevant to OSA.

cell hypertrophy; diabetic nephropathy; fibrosis; microRNAs; mTOR complex 1

INTERMITTENT HYPOXIA (IH) is the hallmark of obstructive sleep apnea (OSA), a common chronic disease affecting 5–20% of the general population and characterized by recurrent collapses of the upper airway, leading to the repetitive occurrence of oxygen desaturation/reoxygenation sequences (14). OSA is

recognized as an important and independent risk factor for hypertension, coronary heart disease, and stroke and could also be associated with mild cognitive dysfunction (16). Moreover, recent studies suggest that the excess mortality in OSA could be at least partly due to an increased risk of cancer (5, 19). The molecular pathways underlying the deleterious consequences of OSA are under investigation (8, 10, 26) but cellular and molecular mechanisms remain poorly understood. Moreover, clinical research is limited by confounding factors that make it difficult to distinguish between the respective effects of intermittent hypoxia and comorbidities. Since stroke and coronary heart disease are common OSA-associated comorbidities, increased knowledge of the effects of IH exposure of endothelial cells and blood brain barrier appears to be crucial. Finally, IH is also observed in tumors and exposure of tumor microenvironment to IH might promote tumor growth and metastatic activity (1).

In this context, significant efforts were recently made in several leading laboratories in the field to obtain relevant models of IH in cell cultures. The achievement of rapid oxygen cycles in standard culture dishes is flawed by the very slow oxygen diffusion in culture medium in the absence of mixing (2). Moreover, thermally induced convective mixing of the media is not sufficient to ensure rapid oxygen equilibration across the height of medium (2, 17, 20) thus limiting the development of relevant IH systems. For instance, one of the first cellular IH models, based on air flushing in a Lucite chamber, generated cycles alternating 15 s of 1% O_2 and 3 min of 21% O_2 that allowed only limited (between 50 and 70 mmHg) fluctuations in Po_2 in the culture medium (12). This highlights the challenge of oxygen diffusion for effective cell exposure to IH. Longer cycles have allowed cycling between 2% O_2 and 15% O_2 , but with cycle durations of 1 h (11) and 1.5 h (28), that are not clinically relevant in the context of OSA-related IH. Another strategy has consisted in using pre-equilibrated culture medium (2, 24, 27). In these systems, the use of preconditioned medium does ensure instantaneous oxygen changes at the cell level. However, repeated changes in medium complicate the measurement of soluble factor secretion and can induce an important shear stress that could impact cell activity and metabolism. More recently, a team has proposed a system in which gas was

Address for reprint requests and other correspondence: A. Briançon-Marjollet, Laboratoire HP2, Institut Jean Roget, Faculté de Médecine de Grenoble, BP 170, 38042 Grenoble Cedex 9, France (e-mail: anne.briancon@univ-grenoble-alpes.fr).

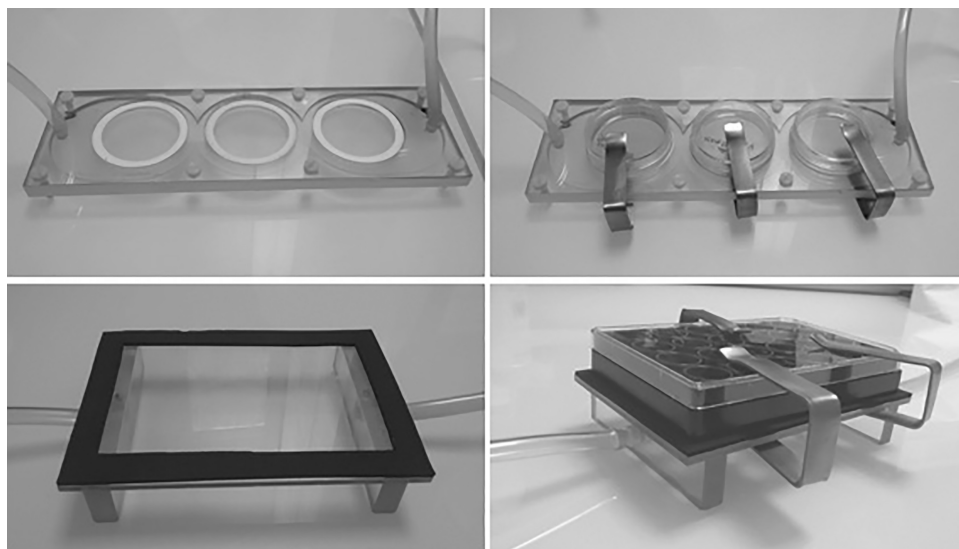


Fig. 1. Pictures showing the holders for 55-mm dishes (top) and for 24-well and 96-well plates (bottom). The dishes or plates were maintained with forceps to avoid air leakage.

directly injected in the culture flask (23). They alternated 5 min of 16% O₂ and 5 min with 0% O₂, resulting in six cycles per hour, which was the best compromise to achieve sufficient oxygen variation amplitude.

Finally, the last type of system described in the literature uses gas-permeable dishes to obtain rapid and accurate cycles at the cell level (18, 22). In this system, variations between 16% and 1% O₂ lead to similar oxygen variations in the culture medium within minutes, allowing a frequency of six cycles per hour without any change in medium or bubbling. The major disadvantage of this elegant setting is the high gas consumption necessary to replace the air volume of the cabinet incubator hosting the dishes. Achievement of the control normoxic exposure also relies on expensive premixed gas bottles (16% O₂, 5% CO₂, and 79% N₂). Recently, a variant of this system, based on air circulation underneath highly-permeable polydimethylsiloxane (PDMS) membranes for cell culture, achieved very fast oxygen cycles at the cell level in a system adapted for direct microscopy imaging (4). The major limitation of this model relies on its small size (4-mm-diameter dishes) and thus in the low number of exposed cells, preventing large-scale studies or the collection of cells for biochemical or molecular biology studies.

Therefore, our objective was to set up a cost-effective and rapid-cycling model producing IH cycles able to mimic the tissue oxygenation characteristics of OSA. We aimed at developing and characterizing a device that would allow rapid oxygen cycling and, minimal gas consumption, avoiding the use of expensive premixed gas bottles, and allowing exposure of multiwell plates and larger culture plates. The originality of this system is that it generates rapid cycles in culture media while minimizing gas consumption by using gas-permeable cell cultureware and custom-made holders in which the air is renewed only below the dishes.

MATERIALS AND METHODS

Gas-permeable dishes and plate holders. Gas-permeable dishes were either from Sarstedt (Lumox 55-mm dishes, 24- and 96-well plates, Sarstedt, Germany) or from Zell-Kontakt (Fluorocarbon Imaging plates, 24- and 96-well plates, Zell-Kontakt, Germany). The

thickness of the membrane is 25 μm for Zell-Kontakt plates and Sarstedt dishes and 50 μm for Sarstedt plates. Since poor cell adhesion was observed with both types of membranes, they were coated with type I collagen (0.2 mg/ml for 1 h at 37°C) before cells were seeded.

Transwells with either 0.4-μm or 8-μm pores (Corning) were placed in 24-well Zell-Kontakt plates. Transwells and plate wells were filled with 200 μl and 600 μl of culture medium, respectively.

The plate holders were custom-made (SMTEC, Nyon, Switzerland) to accommodate either 55-mm dishes or 24- or 96-well plates (Fig. 1). The dishes or plates are attached to the holders with clips to minimize air leakage. The air volume under the plate or dish is as low as 15–20 ml thus allowing very rapid flushing, even with flows as low as 200 ml/min, and very low gas consumption.

Gas supply. Compressed air and >98% nitrogen are provided by a nitrogen extractor and a gas compressor, and carbon dioxide is supplied by a gas bottle. The three gas inputs are connected to a gas blender (Gas Blender 100, MCQ Instruments, Rome, Italy) that can mix gases in any desired fraction with a maximum output flow of 250 ml/minute. The gas mixture is heated in a water bath set a 37°C and travels through a 5-m-long plastic tube to allow temperature equilibration before being transmitted to culture plate holders hosted in a standard cell culture incubator. Pressure equilibration is possible with air above the culture medium, thus the system operates under normobaric conditions

Table 1. Gas settings and duration (in minutes) of the normoxic and hypoxic phases of the various protocols tested

Protocol	20%	16%	3%	5%	2%
2% 30''–30''	0.5				0.5
2% 1'–1'	1				1
2% 2'–2'	1	1			2
2% 3'–3'	1	2			3
2% 3'–5'	1	2			5
2% 5'–5'	1	4			5
5% 2'–2'	1	1	1	1	
5% 3'–3'	1	2	1	2	

In all the protocols except 2% 30''–30'' and 2% 1'–1', a 20% O₂ normoxic burst was used before stabilization at 16% O₂ to decrease the duration of the ascending phase. Similarly, in 5% O₂ protocols, a 3% O₂ hypoxic burst was used before stabilization at 5% O₂ to decrease the duration of the descending phase.

Oxygen measurements. Oxygen in air was measured with a gas analyzer (ADIstruments, Oxford, UK). Dissolved oxygen in culture medium was measured with precalibrated fluorescent oxygen sensors (PO₂ E-Series Sensor) coupled to an Oxylite device (Oxford Optronix, Oxford, UK). The sensors have a 90% response time of 20 s and a precision of 0.1 mmHg. The PO₂ sensors were maintained by a holder equipped with a micrometer screw and a binocular microscope, allowing the direct observation of the contact between the probe and the membrane, and the vertical movement of the sensor by 60-μm steps from the membrane level (pericellular environment) up to the top of the culture medium. In sealed dishes, the probe was inserted through a needle hole in the lid before sealing. Data were recorded using an acquisition system (Powerlab, ADIstruments, Oxford, UK).

Experimental intermittent hypoxia protocols. Different PO₂ cycling protocols were programmed to characterize the behavior of the model (Table 1). The IH protocols alternated a 20% or 16% normoxic phase

and a 5% or 2% hypoxic phase. The 16% oxygen value of normoxic phase was chosen according to the mean arterial PO₂ value of healthy humans, as in other IH models (22, 23). We programmed IH protocols with 5% (5% 2'-2' and 3'-3') and 2% (2% 30"-30", 1'-1', 2'-2', 3'-3', 3'-5' and 5'-5') hypoxic phases named according to the duration (in seconds or minutes) of the normoxic and hypoxic phases, respectively. Following hypoxia, a brief 20% O₂ phase was used to accelerate the return towards the normoxic 16% plateau. Similarly, a 1-min burst of 3% PO₂ was added to rapidly attain a stable 5% hypoxic plateau. No burst was used to attain the 2% hypoxic plateau, since 2% is the minimum oxygen contain of our gas supply (98% pure nitrogen). Carbon dioxide was always set at 5% in the gas mixture.

Cell culture and hypoxia-inducible factor-1α quantification. Human aortic endothelial cells (HAoEC, Cascade Biologics) were cultured in M200 medium, supplemented with large vessel endothelial

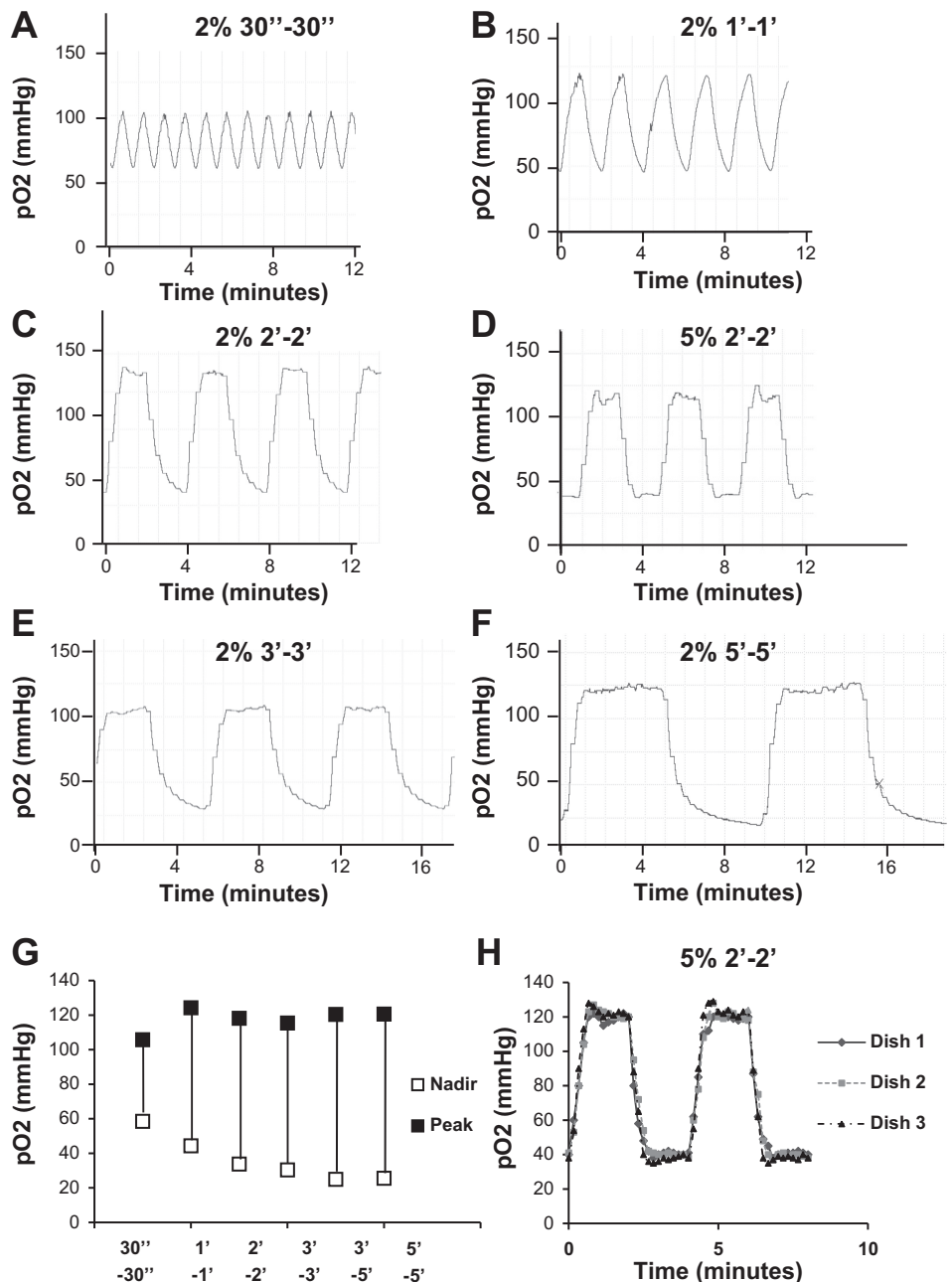


Fig. 2. Characterization of PO₂ cycles at the membrane level in 55-mm dishes containing 5 ml of culture medium without cells. A–F: typical cycles measured with the following intermittent hypoxia protocols: 2% 30"-30" (A), 2% 1'-1' (B), 2% 2'-2' (C), 5% 2'-2' (D), 2% 3'-3' (E), and 2% 5'-5' (F). G: peak and nadir PO₂ values and amplitude of PO₂ variation for each protocol. Data are from at least 3 independent measurements and for over 10 independent experiments for protocol 2% 5'-5'. H: cycles measured in three 55-mm dishes exposed simultaneously in holder to protocol 5% 2'-2'.

supplement (LVES) as recommended by the manufacturer, and used after 6–8 population doubling. Human breast carcinoma cells (4T1, graciously provided by V. Jossierand, IAB, Grenoble, France) were cultured in RPMI medium supplemented with 10% fetal bovine serum and antibiotics. The blood-brain barrier (BBB) model is composed of bEnd.3 endothelial cells (ATCC) combined with C6 astrocytes (ATCC) cultured in transwells with 0.4- μ m pores, as previously described (6).

HAoEC and 4T1 cells were exposed to 6 h of IH (protocol 2% 5'–5'). BBB model was exposed to 2 h of IH (protocol 2% 5'–5') followed by 6 h of normoxia (16% O₂), repeated 3 times for a total of 24 h.

At the end of IH exposure, supernatants were collected and frozen (–80°C), while the cells were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) for 10 min and kept at 4°C until use. Hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) expression was measured with a cell-based Elisa assay (R&D Systems) on PFA-fixed cells.

Statistical analysis. Data were analyzed using GraphPad Prism 6 software (San Diego, CA). The various statistical tests performed are detailed in figure legends. Normality was determined using D'Agostino-Pearson normality tests as recommended by the GraphPad Prism software. Normal data are expressed as means \pm SE. Statistical significance was set at $P < 0.05$.

RESULTS

Rapid intermittent hypoxia cycles with appropriate amplitude were achieved with the model. Figure 2 and Table 2 depict typical oxygen cycles observed in 55-mm dishes, filled with 5 ml of PBS, with the various protocols tested (see Table 1 for details of gas settings).

Short cycles composed of 30 s at 20% followed by 30 s at 2% resulted in oxygen cycling between 105.8 \pm 1.3 and 58.5 \pm 2.2 mmHg in the culture medium (Fig. 2A). Increasing the duration of the normoxic and hypoxic phases enhanced the nadir-to-peak amplitude, with cycles between 124.3 \pm 2.4 and 44.3 \pm 1.5 mmHg (nadir-to-peak amplitude: 79.9 \pm 3.6 mmHg) with protocol 2% 1'–1' (Fig. 2B), and between 118.8 \pm 2.4 and 33.8 \pm 0.3 mmHg (nadir-to-peak amplitude: 84.4 \pm 1.9 mmHg) with protocol 2% 2'–2' (Fig. 2C). Protocols with a 2-min normoxic phase resulted in a Po₂ plateau around 120 mmHg and Po₂ values >110 mmHg were achieved within a mean time of 52.1 \pm 2.2 s. Protocols with 5% O₂ generated a hypoxic plateau around 40 mmHg (Fig. 2D and Table 2). For protocols with 2% O₂, a hypoxic plateau was more difficult to achieve, even with a 5-min hypoxia duration (Fig. 2, E and F) and time to reach Po₂ values < 50 mmHg and < 40 mmHg was 47.2 \pm 4.5 and

89.0 \pm 9.1 s, respectively. Po₂ values < 30 mmHg were reached after 3 min of hypoxia with protocols 2% 3'–3' and 2% 5'–5', while the minimum value of 25 mmHg could only be attained after 5 min of hypoxia (Fig. 2, F and G and Table 2). On the other hand, decreasing the duration of normoxia from 5 to 3 min resulted in identical peak and nadir Po₂ values (Fig. 2F and Table 2).

Since our 55-mm dish holder is designed for three dishes, we measured the cycles in the three dishes and did not observe any difference in cycle pattern or Po₂ range (Fig. 2H).

Effects of cultureware type and membrane thickness on intermittent hypoxia cycles. We compared the impact of support type and membrane thickness on the nadir-to-peak amplitude of the cycles generated by protocols 2% 3'–3' and 2% 5'–5'. Whatever the protocol, we did not observe any difference on nadir-to-peak cycle amplitude between 25- μ m-thick 24-well or 96-well plates and 55-mm dishes. Hence, typical cycles generated by protocol 2% 5'–5' in 24-well plates were between 26 and 113 mmHg (Fig. 3A), similar to those observed in 96-well plates and 55-mm dishes. We serially connected three 96-well plates to compare the typical aspect of the Po₂ cycles. We did not observe a difference in Po₂ cycles between the three plates (Fig. 3B).

However, there was a significant difference in nadir values and nadir-to-peak amplitude of the cycles measured in 25- μ m-thick and 50- μ m-thick 24-well plates (Fig. 3C). Hence, nadir values were significantly lower in 25- μ m-thick plates compared with 50- μ m-thick plates (27.0 \pm 1.9 vs. 55.4 \pm 2.3 mmHg, respectively; $P = 0.008$) while peak Po₂ values were not affected (118.6 and 114.6 mmHg, respectively). Therefore, nadir-to-peak amplitude was 91.8 \pm 2.9 mmHg in 25- μ m-thick plates but only 59.2 \pm 2.9 mmHg in 50- μ m-thick plates ($P = 0.008$).

Culture medium volume modestly alters the intermittent hypoxia cycles. Overall, culture medium volume had a significant impact on the cycles ($P = 0.037$) (Table 3). In particular, the lowest nadir value was obtained with a volume of 5 ml (27.2 \pm 2.4 mmHg vs. 36.7 \pm 2.9 mmHg with a 3 ml volume, $P = 0.019$). However, the nadir-to-peak amplitude was not significantly affected by culture medium volume (101.3 \pm 2.9, 103.2 \pm 1.6, and 104.7 \pm 0.3 mmHg for 3, 5, and 7 ml, respectively).

Presence of cells decreases the amplitude of intermittent hypoxia cycles. The presence of cells induced a significant decrease in the nadir-to-peak amplitude of the IH cycles (from 95.6 \pm 3.0 to 86.5 \pm 1.5 mmHg, $P = 0.004$; Table 4). More precisely, the presence of cells decreased the maximum Po₂ value (from 124.4 \pm 0.9 to 113.1 \pm 3.5 mmHg, $P < 0.01$) without affecting the minimum value.

Amplitude of intermittent hypoxia cycles decreases from bottom to top of culture medium. To test the homogeneity of the cycles throughout the culture medium, we recorded oxygen cycles from the membrane up to the top of the liquid layer using protocols 2% 3'–3' and 2% 5'–5'. To estimate the effect of gas exchange with ambient air we also measured Po₂ gradient with protocol 2% 5'–5' in dishes sealed with tape. Whatever the distance from the membrane and the IH protocol, the maximum Po₂ value remained stable. However, as expected, the minimum Po₂ value linearly increased when the O₂ probe was moved away from the membrane and the nadir-to-peak amplitude therefore concomitantly decreased (Fig.

Table 2. Nadir and peak Po₂ values and cycle amplitude (calculated delta value) measured in 55-mm dishes submitted to the intermittent hypoxia protocols depicted in Table 1

Protocol	Nadir	Peak	Delta
2% 30''–30''	58.5 \pm 2.2**	105.8 \pm 1.3**	47.3 \pm 3.0**
2% 1'–1'	44.3 \pm 1.5**	124.3 \pm 2.4	79.9 \pm 3.6*
2% 2'–2'	33.8 \pm 0.3	118.2 \pm 2.4	84.4 \pm 1.9
2% 3'–3'	30.3 \pm 1.4	115.4 \pm 4.4	85.1 \pm 3.7
2% 3'–5'	24.9 \pm 2.0	120.4 \pm 4.5	95.5 \pm 3.3
2% 5'–5'	25.5 \pm 1.2	120.6 \pm 1.9	95.1 \pm 1.6
5% 2'–2'	38.0 \pm 3.1*	123.3 \pm 3.3	85.3 \pm 6.4
5% 3'–3'	39.7 \pm 5.5*	126.0 \pm 8.0	86.3 \pm 4.5

Data (in mmHg) are means \pm SE. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ vs. 2% 5'–5' protocol (two-way ANOVA). $P = 0.08$ for delta 2% 2'–2' vs. 2% 5'–5'.

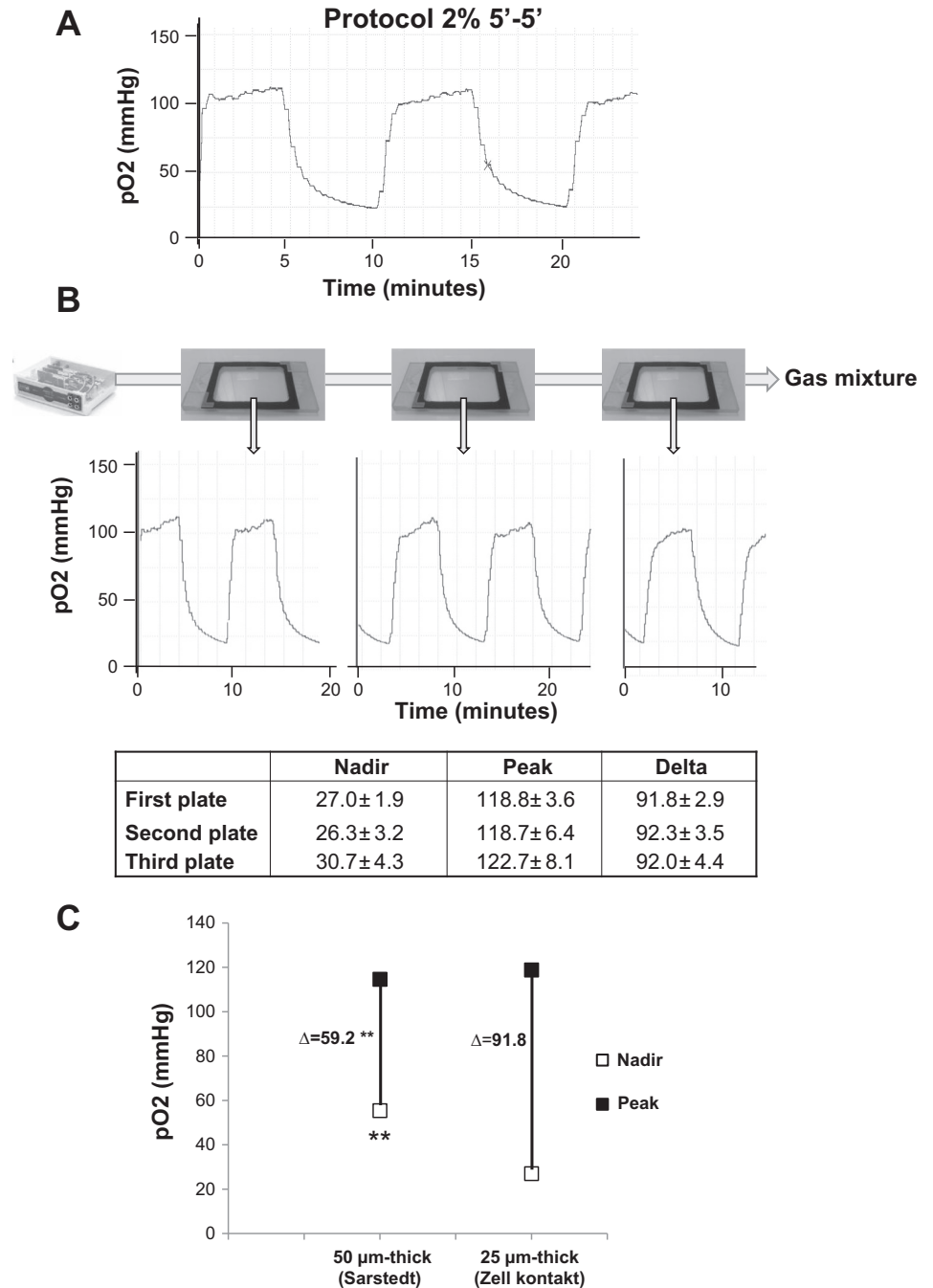


Fig. 3. Characterization of Po₂ cycles in 24-well plates. **A:** typical cycles measured at the membrane level in 24-well plates (filled with 500 µl PBS) with protocol 2% 5'-5'. Cycles measured in 96-well plates were similar. **B:** typical measurements in 3 plate holders serially connected (protocol 2% 5'-5'), nadir and peak Po₂ values and cycle amplitude (calculated delta value) for the 3 consecutive plate holders. Cycles were only very slightly attenuated, with no significant difference. **C:** nadir and peak Po₂ values and cycle amplitude (calculated delta value) in gas-permeable 24-well plates with 50-µm-thick (Sarstedt) or 25-µm-thick (Zell-Kontakt) membranes using protocol 2% 5'-5'. n = at least 5 independent measurements. **P < 0.01 for nadir and cycle amplitude vs. 25-µm-thick membranes (Mann-Whitney rank-sum tests).

4A). Moreover, AUC obtained with sealed-plates was significantly higher than that recorded in unsealed plates (P = 0.012; Fig. 4B).

Finally, to evaluate the possibility of using transwells for cocultures or for permeability or migration assays under IH, we measured cycles in transwell inserts placed in 24-well permeable plates. The nadir-to-peak amplitude of IH cycles measured in transwells increased with pore diameter. Indeed, amplitudes of 49 mmHg (nadir and peak Po₂ values of 78 and 127 mmHg) and 59 mmHg (nadir and peak Po₂ values of 66 and 125 mmHg values; Fig. 4C) were measured in transwells with 0.4-µm and 8-µm pores, respectively.

Gas-permeable dishes allow optimal cell oxygenation under normoxic conditions. Baseline culture medium Po₂ values measured in plastic dishes with 4T1 cells were significantly lower than those measured in permeable dishes independently of cell confluence (Fig. 5). At 70% confluence, median Po₂ values of 120 and 137 mmHg were measured in plastic and permeable dishes, respectively (P = 0.016). At 100% confluence, median Po₂ values of 115 and 150 mmHg were measured in plastic and permeable dishes, respectively (P = 0.008). Interestingly, no difference between plastic and permeable dishes was observed with 100% confluent HAoEC cells.

Table 3. Impact of culture medium volume on intermittent hypoxia cycles

Volume	Nadir	Peak	Delta
3ml	36.7 ± 2.9*	138.0 ± 0.1	101.3 ± 2.9
5ml	27.2 ± 2.4	130.3 ± 0.9	103.2 ± 1.6
7ml	29.3 ± 3.0	134.0 ± 3.1	104.7 ± 0.3

Nadir and peak P_{O_2} values and cycle amplitude (calculated delta value) measured in 55-mm dishes filled with different volumes of culture medium and submitted to protocol 2% 5'-5'. Data (in mmHg) are means ± SE; $n = 3$ independent experiments. Medium volume significantly alters the cycles ($P = 0.037$, two-way ANOVA). * $P = 0.019$ vs. nadir at 5 ml (two-way ANOVA). $P = 0.07$ for nadir 3 ml vs. 7 ml, $P = 0.06$ for peak 3 ml vs. 5 ml.

Intermittent hypoxia exposure increases HIF-1 α expression in cells. Six hours of cell exposure to IH with protocol 2% 5'-5' resulted in a significant increase in HIF-1 α expression compared with normoxia (2.4- and 1.4-fold increase in HAoEC and 4T1 cells, respectively, $P < 0.05$; Fig. 6A).

Moreover, repeated IH exposure over 24 h of a cell BBB model resulted in a very significant increase in HIF-1 α expression compared with normoxia (6.1-fold increase, $P < 0.01$; Fig. 6B).

DISCUSSION

In this paper, we describe an innovative system aiming to perform exposure of cells cultures to intermittent hypoxia with a pattern accurately mimicking that occurring in sleep apnea patients. This system is adapted from commercial gas-permeable dishes and uses custom-made plate holders. The small volume of air in the holders is easily renewed even with low gas flow, thus allowing low gas consumption and fast cycling. Our system is working with gas sources (air, CO_2 , and N_2) either from commercial bottles (CO_2) or produced by gas extractor and compressor, thus avoiding expensive premixed gas bottles described elsewhere (22). We were able to connect up to three holders in series, thus allowing the simultaneous exposure of three multiwell plates (24-well or 96-well) or up to nine 55-mm dishes, or combinations of multiwell plates and 55-mm dishes. This low-cost system effectively produced short IH cycles in culture medium and allowed the exposure of a large number of cells. This should help the field to address the molecular biology of IH exposure with a relevant physiological model.

We characterized the oxygen cycles obtained with various settings, with normoxic phases between 20% and 12% oxygen and hypoxic phases between 5% and 2%. With 16–2% cycling at a frequency of 6 to 8 cycles per hour, we obtained nadir-to-

Table 4. Impact of the presence of cells on intermittent hypoxia cycles

	Nadir	Peak	Delta
Without cells	28.8 ± 2.4	124.4 ± 0.9	95.6 ± 2.9
With cells	26.7 ± 2.7	113.1 ± 3.5**	86.5 ± 1.5**

Nadir and peak P_{O_2} values and cycle amplitude (calculated delta value) measured in 55-mm dishes filled with 4 ml of culture medium, with or without a confluent layer of 4T1 cells, and exposed to protocol 2% 5'-5'. The presence of cells does not change nadir values but lowers peak and delta values. Data (in mmHg) are means ± SE; $n = 3$ independent experiments performed in duplicate. ** $P < 0.01$ vs. corresponding values without cells (two-way ANOVA).

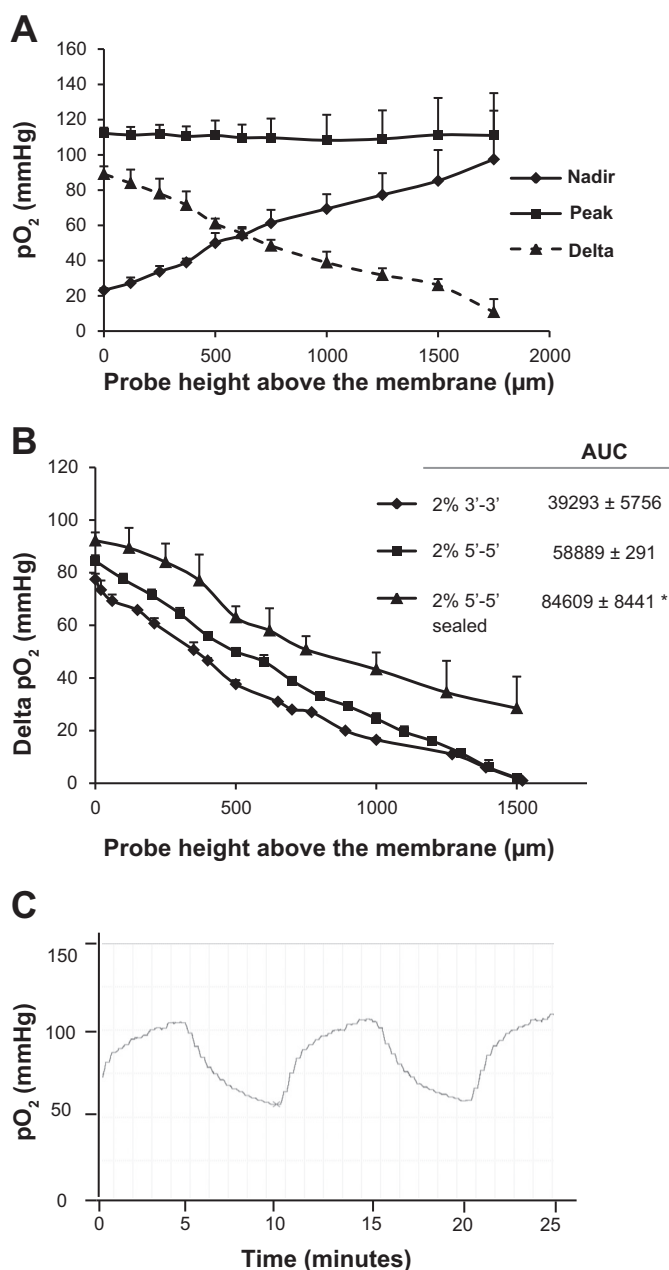


Fig. 4. Evolution of the cycles throughout the culture medium and in transwells. **A**: typical nadir and peak P_{O_2} values and cycle amplitude (calculated delta value) at different heights above the membrane. Measurements were performed with protocol 2% 5'-5' in 55-mm dishes. Similar results were observed in 96-well dishes. Data (in mmHg) are means ± SE; $n =$ at least 3 independent experiments. **B**: cycle amplitude (calculated delta value) at different heights above the membrane in unsealed and sealed 55-mm dishes, and corresponding calculated area under the curve (AUC). Measurements were performed with protocols 2% 3'-3' (◆) and 2% 5'-5' (■) in unsealed dishes and with protocol 2% 5'-5' (▲) in dishes sealed with tape to limit gas exchange with incubator air. Data are means ± SE; $n =$ at least 3 independent experiments. *AUC vs. protocol 2% 3'-3' in unsealed dishes, $P = 0.012$ (one-way ANOVA). There was no significant difference in cycle amplitude between unsealed and sealed plates at membrane level (probe height = 0). **C**: cycles measured with protocol 2% 5'-5' inside an 8- μ m-pore transwell with 100 μ l of medium placed in a 24-well plate (Zell-Kontakt) filled with 600 μ l of culture medium.

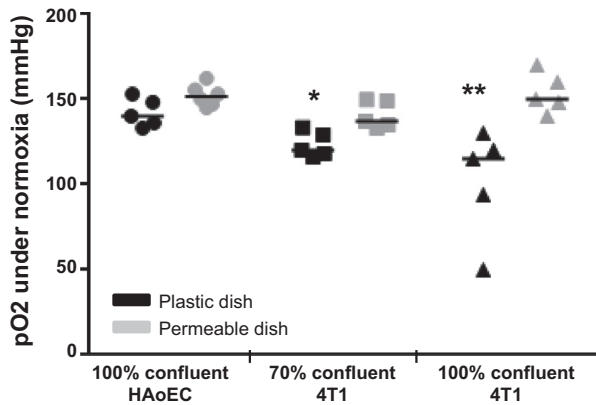


Fig. 5. Comparison of PO_2 values in standard and permeable dishes under normoxia. PO_2 values were measured at the level of the cell layer in standard plastic or gas-permeable 55-mm dishes plated with human aortic endothelial cells (HAoEC) or 4T1 cells at different cell confluences and incubated under normoxia. Cultures were preequilibrated at 21% O_2 in a standard incubator, placed under normoxia (21% O_2 + 5% CO_2) in the intermittent hypoxia device, and allowed to equilibrate for at least 30 min before PO_2 measurements. Individual data and median are plotted; $n = 5$ measurements from 3 independent experiments. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ vs. gas-permeable plates (Mann-Whitney rank-sum test). $P = 0.09$ for HAoEC cells, permeable vs. plastic dish.

peak amplitudes of ~ 95 mmHg, cycling between 25 and 30 mmHg and 120 mmHg. Although a nadir value of 25–30 mmHg is not as low as those attained with other systems (4, 23), it is relevant to OSA physiopathology since 30 mmHg roughly corresponds to the lowest arterial blood saturation level (60% oxygen saturation) recorded in severe sleep apnea patients during hypoxic episodes (15). Similarly, the peak can be chosen at any value up to 125 mmHg, which was chosen to be slightly higher than the mean value of arterial PO_2 in healthy humans, as done in other IH models (22, 23). Therefore, our system can reproduce patterns of hypoxia-reoxygenation relevant to severe human OSA by cycling between 30 and 100–120 mmHg or to moderate OSA by cycling between 40 and 45 mmHg and 100–120 mmHg. This is a major advantage to appropriately assess the dose-response relationship between the amount of IH and its deleterious or preconditioning outcomes (13, 14).

Although similar cycles were observed in Lumox dishes and in fluorocarbon plates which have 25- μm -thick membranes, cycles measured in plates with 50- μm -thick Lumox membranes presented high nadir values and decreased nadir-to-peak amplitudes. This suggests that Lumox membrane thickness can

affect gas diffusion. In contrast, similar cycles were recorded with 10- μm - and 37.5- μm -thick PDMS membranes in another IH system (4). This discrepancy could be due to different chemical composition and/or thickness of the membranes.

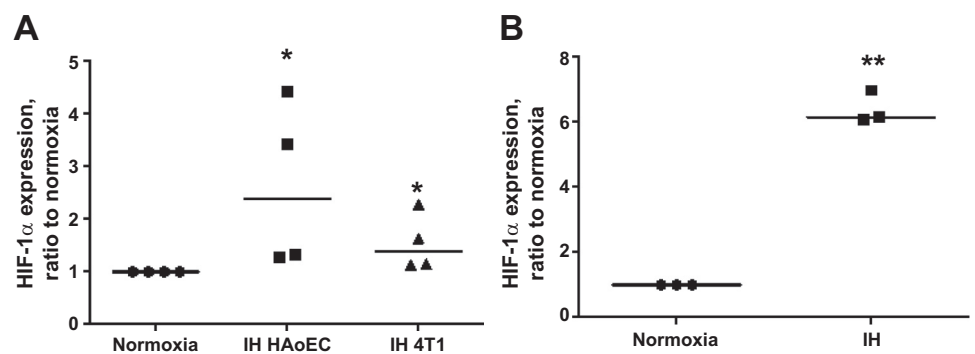
Uncoated gas-permeable membranes result in poor cell adhesion and were recently shown to profoundly affect cell morphology and function (21). We thus established that fibronectin, collagen, or Matrigel coating did not significantly alter the cycles measured in the culture medium (data not shown). We also observed that the presence of cells modestly decreased peak values and amplitude of the cycles, whereas nadir values were unchanged. The difference in cycles in the presence of cells could be due to oxygen consumption and/or to impaired gas diffusion through the cell layer. Nevertheless, since the impact of the presence of cells was modest (<10% decrease in cycle amplitude), we can conclude that the membrane maintains good gas permeability even in the presence of a confluent cell monolayer.

Variations in culture medium volume also modestly affected the IH cycles. While peak values and nadir-to-peak amplitude were not significantly altered, nadir values measured in 55-mm dishes were lower at high (5 ml) compared with low (3 ml) medium volume. This could be explained by oxygen retrodiffusion from air above the medium since low volumes result in thin thickness (~ 1 mm with 3 ml vs. 2 mm with 5 ml in 55-mm dishes). Thus, it appears mandatory to always use the same amount of culture medium to ensure reproducibility of the IH cycles.

A drawback of some IH systems is the limited number of dishes or plates that can be exposed simultaneously, resulting in insufficient amount of cells for biochemical or molecular biology analysis. To minimize gas consumption, we did not choose to perform IH cycles directly in the cell incubator as in other systems (22), but we wanted to be able to expose at least several 55-mm dishes or multiwell plates. Our use of custom-designed plate holders branched in series enabled us to obtain similar cycles in up to three multiwell plates or nine 55-mm dishes (or combinations of multiwell plates and 55-mm dishes) simultaneously exposed to IH. This setup ensures that several experiments can be performed simultaneously and that a sufficient quantity of cells can be collected for biochemical analysis or molecular biology.

However, since gases are diffusing from below the plate, we expected that the cycles would perform well at the membrane level only. This is perfectly suitable for adherent cells but represents a limitation for nonadherent cell cultures, such as monocytes or peripheral blood mononuclear cells, or for co-

Fig. 6. Intermittent hypoxia (IH) increases hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) expression. A: expression of HIF-1 α in HAoEC and 4T1 cells after 6 h of exposure to protocol 2% 5'–5', expressed as a ratio of HIF-1 α expression in cells exposed to 6 h of normoxia (16% O_2). * $P < 0.05$ vs. normoxia (Mann-Whitney rank-sum test). B: expression of HIF-1 α in a blood-brain barrier model composed of bEnd.3 endothelial cells and C6 astrocytes after 24 h of IH (2 h of 2% 5'–5' and 6 h of normoxia, repeated 3 times). Individual data and median are plotted. $n = 3$ independent experiments; ** $P < 0.01$ vs. normoxia (Mann-Whitney rank-sum test).



culture systems such as transwell inserts. Indeed, while the peak value was unchanged, we observed that the nadir of the IH cycles gradually increased when measured away from the membrane so that the cycles almost disappeared at the top of the liquid layer. However, adequate IH cycles oscillating between 50 and 110 mmHg were still measured 500 μm above the membrane. Moreover, cycles measured inside 8- μm -pore transwells, commonly used for cell migration or permeability assays, oscillated between 65 and 125 mmHg, suggesting that our system can be used to study the effects of moderate IH on cell migration. Furthermore, our system was successfully used to induce a clear increase of HIF-1 expression in cells cultured in 0.4- μm -pore transwell.

Indeed, HIF-1 α expression was increased by more than sixfold in a BBB model composed of endothelial cells and astrocytes cultured in transwells and exposed to IH. In addition to transwells, we observed that HIF-1 α expression was increased by 2.6- and 1.5-fold, in primary endothelial and in tumor cells, respectively, after 6 h of IH exposure. It should be stressed that HIF-1 α expression might have been underestimated in our experimental conditions since it was assessed in PFA-fixed samples, in which PFA could have interfered with antigen reactivity. In accordance with various other studies, we chose to use HIF-1 α expression as a marker of hypoxia sensing to validate IH exposure of our cells. Hence, Yuan et al. (31) reported an increase in HIF-1 protein level in nuclear extracts together with an increase in HIF-1 reporter genes in PC12 cells after 60 cycles of IH (4 min–30 s, 20–1.5%), and more recently Campillo et al. (4) observed a 1.5-fold increase in HIF-1 α nuclear translocation in mesenchymal stem cells exposed to 4 h of IH (30 s–30 s, 20–1%). In a very different system, exposure of endothelial cells to long IH cycles (1 h–30 min, 20–1%) did not increase HIF-1 gene expression but increased its nuclear translocation and DNA binding activity (29). Nevertheless, other studies have failed to observe changes in HIF-1 expression or transcriptional activity with different paradigms of IH exposure (22–24). Thus, despite numerous studies in animal models showing that HIF-1 is activated by intermittent hypoxia in various organs (3, 7, 30), the determinants of HIF-1 activation in cells exposed to IH remain to be assessed, with particular emphasis on the characteristics of the IH cycles (minimal and maximal PO_2 , duration of normoxic and hypoxic phases, total duration of exposure, or number of cycles) and on the metabolic activity of the cells exposed.

Finally, we compared standard plastic dishes and permeable dishes under normoxic conditions. We measured a difference of up to 50 mmHg between standard plastic and semipermeable dishes, depending on cell type and confluence rate. Indeed, the biggest difference was observed for metabolically active cancer cells. These results are consistent with previous data showing different levels of culture medium hypoxia with more or less metabolically active cells (17, 22). In particular, Polak et al. (22) showed that HIF-1 activity was much higher in standard than in permeable plates, probably because of poor oxygenation of culture medium in plastic plates along with O_2 consumption by cells. Despite the fact that oxygen tension during standard cell culture is often a neglected factor, these results suggest that it could be of interest to use gas-permeable plates even in routine use under normoxic conditions, to ensure real and reproducible normoxia at different stages of cell culture and confluence levels.

It should be pointed out that the PO_2 measurements performed in the present study were recorded with probes having a 90% response time of 20 s (data provided by the manufacturer and experimentally verified in our laboratory, data not shown), which is not negligible compared with the rise and decay duration of our IH cycles. Therefore, one can assume that the oxygen cycles performed by our system are actually faster than those measured and that the rise and decay durations are overestimated. Moreover, PO_2 values measured for short cycles that did not reach plateau values might be inaccurate so that the nadir-to-peak amplitude might actually be larger than reported. Nevertheless, we can suggest that the peak and nadir PO_2 values measured for longer IH cycles (3'–3' or 5'–5') were estimated with a good accuracy since we were able to attain plateau phases at in both cases. Carbon dioxide was set at 5% in all gas mixtures, and since CO_2 has a very high diffusion coefficient it was theoretically stable in the culture medium throughout intermittent hypoxia exposure.

In summary, we have developed a new low-cost device to perform rapid intermittent hypoxia cycles at the cellular level characterized by very low gas consumption and good cell throughput for biochemistry or molecular biology analysis. This device can be used to mimic the cellular impact of OSA but also that of other pathological conditions in which rapid hypoxia-reoxygenation cycles are observed, such as ischemia-reperfusion events in heart, brain, or other organs, or tumor development where oxygen variations can be observed independently of OSA, due to structural abnormalities of the vascular network (9, 25). This device thus presents a new alternative to existing techniques for laboratories that plan to perform cellular IH or simply want to precisely control oxygen tension in their cell cultures.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Emmanuel Barbier and Benjamin Lemasson (Grenoble Institute of Neurosciences) for sharing the Oxylite device and to Véronique Josserand (Institute for Advanced Biosciences, Grenoble) for kindly providing the 4T1 cells. We also thank Mathis Soubeyrand and Alexandre Frémont for technical assistance.

GRANTS

This work was funded by INSERM, University Grenoble Alpes, and Agir pour les Maladies Chroniques (APMC) foundation. It was also partly supported by the French National Research Agency in the framework of the "Investissements d'avenir" program (ANR-15-IDEX-02).

DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the authors.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

J.P., J.-L.P., D.G.-R., and A.B.-M. conceived and designed research; M.M., J.M., F.P., M.C., B.G., E.L., J.-B.M., and A.B.-M. performed experiments; M.M., J.M., F.P., M.C., B.G., E.L., J.-B.M., and A.B.-M. analyzed data; M.M., J.M., F.P., M.C., B.G., E.L., J.-B.M., and A.B.-M. interpreted results of experiments; M.M. and A.B.-M. prepared figures; M.M., J.M., and A.B.-M. drafted manuscript; J.P., J.-L.P., D.G.-R., and A.B.-M. edited and revised manuscript; M.M., J.M., F.P., M.C., B.G., E.L., J.-B.M., J.P., J.-L.P., D.G.-R., and A.B.-M. approved final version of manuscript.

REFERENCES

1. Almendros I, Montserrat JM, Torres M, Dalmases M, Cabañas ML, Campos-Rodríguez F, Navajas D, Farré R. Intermittent hypoxia increases melanoma metastasis to the lung in a mouse model of sleep apnea.

- Respir Physiol Neurobiol* 186: 303–307, 2013. doi:10.1016/j.resp.2013.03.001.
2. Baumgardner JE, Otto CM. In vitro intermittent hypoxia: challenges for creating hypoxia in cell culture. *Respir Physiol Neurobiol* 136: 131–139, 2003. doi:10.1016/S1569-9048(03)00077-6.
 3. Belaidi E, Joyeux-Faure M, Ribouot C, Launois SH, Levy P, Godin-Ribuot D. Major role for hypoxia inducible factor-1 and the endothelin system in promoting myocardial infarction and hypertension in an animal model of obstructive sleep apnea. *J Am Coll Cardiol* 53: 1309–1317, 2009. doi:10.1016/j.jacc.2008.12.050.
 4. Campillo N, Jorba I, Schaedel L, Casals B, Gozal D, Farré R, Almendros I, Navajas D. A novel chip for cyclic stretch and intermittent hypoxia cell exposures mimicking obstructive sleep apnea. *Front Physiol* 7: 319, 2016. doi:10.3389/fphys.2016.00319.
 5. Campos-Rodriguez F, Martinez-Garcia MA, Martinez M, Duran-Cantolla J, Peña ML, Masdeu MJ, Gonzalez M, Campo F, Gallego I, Marin JM, Barbe F, Montserrat JM, Farre R; Spanish Sleep Network. Association between obstructive sleep apnea and cancer incidence in a large multicenter Spanish cohort. *Am J Respir Crit Care Med* 187: 99–105, 2013. doi:10.1164/rccm.201209-1671OC.
 6. Chatard M, Puech C, Roche F, Perek N. Hypoxic stress induced by hydralazine leads to a loss of blood-brain barrier integrity and an increase in efflux transporter activity. *PLoS One* 11: e0158010, 2016. doi:10.1371/journal.pone.0158010.
 7. da Rosa DP, Forgiarini LF, Baronio D, Feijó CA, Martínez D, Marroni NP. Simulating sleep apnea by exposure to intermittent hypoxia induces inflammation in the lung and liver. *Mediators Inflamm* 2012: 879419, 2012. doi:10.1155/2012/879419.
 8. Dematteis M, Godin-Ribuot D, Arnaud C, Ribouot C, Stanke-Labesque F, Pépin JL, Lévy P. Cardiovascular consequences of sleep-disordered breathing: contribution of animal models to understanding the human disease. *ILAR J* 50: 262–281, 2009. doi:10.1093/ilar.50.3.262.
 9. Dewhirst MW, Braun RD, Lanzen JL. Temporal changes in PO₂ of R3230AC tumors in Fischer-344 rats. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 42: 723–726, 1998. doi:10.1016/S0360-3016(98)00304-6.
 10. Drager LF, Jun JC, Polotsky VY. Metabolic consequences of intermittent hypoxia: relevance to obstructive sleep apnea. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 24: 843–851, 2010. doi:10.1016/j.beem.2010.08.011.
 11. Dyugovskaya L, Polyakov A, Lavie P, Lavie L. Delayed neutrophil apoptosis in patients with sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 177: 544–554, 2008. doi:10.1164/rccm.200705-675OC.
 12. Kumar GK, Kim DK, Lee MS, Ramachandran R, Prabhakar NR. Activation of tyrosine hydroxylase by intermittent hypoxia: involvement of serine phosphorylation. *J Appl Physiol* (1985) 95: 536–544, 2003. doi:10.1152/jappphysiol.00186.2003.
 13. 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* 20: 27–45, 2015. doi:10.1016/j.smrv.2014.07.003.
 14. Lévy P, Kohler M, McNicholas WT, Barbé F, McEvoy RD, Somers VK, Lavie L, Pépin JL. Obstructive sleep apnoea syndrome. *Nat Rev Dis Primers* 1: 15015, 2015. doi:10.1038/nrdp.2015.15.
 15. Lévy P, Pépin JL, Deschaux-Blanc C, Paramelle B, Brambilla C. Accuracy of oximetry for detection of respiratory disturbances in sleep apnea syndrome. *Chest* 109: 395–399, 1996. doi:10.1378/chest.109.2.395.
 16. Martín MS, Sforza E, Roche F, Barthélémy JC, Thomas-Anterion C; PROOF study group. Sleep breathing disorders and cognitive function in the elderly: an 8-year follow-up study. The proof-synapse cohort. *Sleep* 38: 179–187, 2015. doi:10.5665/sleep.4392.
 17. Metzen E, Wolff M, Fandrey J, Jelkmann W. Pericellular PO₂ and O₂ consumption in monolayer cell cultures. *Respir Physiol* 100: 101–106, 1995. doi:10.1016/0034-5687(94)00125-J.
 18. Murphy AM, Thomas A, Crinion SJ, Kent BD, Tambuwala MM, Fabre A, Pepin JL, Roche HM, Arnaud C, Ryan S. Intermittent hypoxia in obstructive sleep apnoea mediates insulin resistance through adipose tissue inflammation. *Eur Respir J* 49: 1601731, 2017. doi:10.1183/13993003.01731-2016.
 19. Nieto FJ, Peppard PE, Young T, Finn L, Hla KM, Farré R. Sleep-disordered breathing and cancer mortality: results from the Wisconsin Sleep Cohort Study. *Am J Respir Crit Care Med* 186: 190–194, 2012. doi:10.1164/rccm.201201-0130OC.
 20. Otto CM, Baumgardner JE. Effect of culture PO₂ on macrophage (RAW 264.7) nitric oxide production. *Am J Physiol Cell Physiol* 280: C280–C287, 2001.
 21. Pavlikova N, Weissenstein M, Pala J, Halada P, Seda O, Elkalaf M, Trnka J, Kovar J, Polak J. The effect of cultureware surfaces on functional and structural components of differentiated 3T3-L1 preadipocytes. *Cell Mol Biol Lett* 20: 919–936, 2015. doi:10.1515/cmbl-2015-0054.
 22. Polak J, Studer-Rabeler K, McHugh H, Hussain MA, Shimoda LA. System for exposing cultured cells to intermittent hypoxia utilizing gas permeable cultureware. *Gen Physiol Biophys* 34: 235–247, 2015. doi:10.4149/gpb_2014043.
 23. Polotsky VY, Savransky V, Bevans-Fonti S, Reinke C, Li J, Grigoryev DN, Shimoda LA. Intermittent and sustained hypoxia induce a similar gene expression profile in human aortic endothelial cells. *Physiol Genomics* 41: 306–314, 2010. doi:10.1152/physiolgenomics.00091.2009.
 24. Ryan S, Taylor CT, McNicholas WT. Selective activation of inflammatory pathways by intermittent hypoxia in obstructive sleep apnea syndrome. *Circulation* 112: 2660–2667, 2005. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.556746.
 25. Sorg BS, Hardee ME, Agarwal N, Moeller BJ, Dewhirst MW. Spectral imaging facilitates visualization and measurements of unstable and abnormal microvascular oxygen transport in tumors. *J Biomed Opt* 13: 014026, 2008. doi:10.1117/1.2837439.
 26. Tamisier R, Briançon-Marjollet A, Levy P, Pepin JL. Animal and physiological settings of IH exposure. In: *Obstructive Sleep Apnoea*, edited by Barbé F, Pépin JL. Lausanne, Switzerland: European Respiratory Society, 2015, p. 1–8. doi:10.1183/2312508X.erm6715.
 27. Taylor CT, Kent BD, Crinion SJ, McNicholas WT, Ryan S. Human adipocytes are highly sensitive to intermittent hypoxia induced NF-kappaB activity and subsequent inflammatory gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 447: 660–665, 2014. doi:10.1016/j.bbrc.2014.04.062.
 28. Toffoli S, Delaive E, Dieu M, Feron O, Raes M, Michiels C. NDRG1 and CRK-I/II are regulators of endothelial cell migration under intermittent hypoxia. *Angiogenesis* 12: 339–354, 2009. doi:10.1007/s10456-009-9156-2.
 29. Toffoli S, Roegiers A, Feron O, Van Steenbrugge M, Ninane N, Raes M, Michiels C. Intermittent hypoxia is an angiogenic inducer for endothelial cells: role of HIF-1. *Angiogenesis* 12: 47–67, 2009. doi:10.1007/s10456-009-9131-y.
 30. Wang ZF, Kang J, Dai B. [Expression and activation of hypoxia inducible factor-1alpha and iNOS in the brain of rats with chronic intermittent hypoxia]. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi* 32: 739–743, 2009.
 31. Yuan G, Nanduri J, Bhasker CR, Semenza GL, Prabhakar NR. Ca²⁺/calmodulin kinase-dependent activation of hypoxia inducible factor 1 transcriptional activity in cells subjected to intermittent hypoxia. *J Biol Chem* 280: 4321–4328, 2005. doi:10.1074/jbc.M407706200.

IV. Discussion

Pour conduire notre projet d'exploration des effets de l'hypoxie intermittente sur le développement tumoral mammaire il nous est apparu très vite nécessaire de disposer d'un dispositif d'exposition cellulaire en complément du dispositif déjà disponible permettant d'exposer les animaux. En effet, tandis que les modèles dits *in vivo* permettent de capturer la complexité des processus dans un environnement vivant, la compréhension des étapes mécanistiques individuelles reste difficilement accessible par ce type d'approche. Les modèles dit *in vitro* ont ainsi été développés pour étudier certains mécanismes tumoraux comme la prolifération, la croissance, la migration, l'invasion, le remodelage matriciel, l'angiogenèse, etc. (Katt et al., 2016). Dans notre contexte, il était indispensable de mettre au point un système qui puisse nous apporter les moyens d'observer le comportement des cellules tumorales soumises à l'hypoxie intermittente et d'étudier les voies cellulaires impliquées dans la réponse à l'HI.

Dans cet article nous avons décrit un dispositif capable d'exposer des cellules en culture à un stimulus d'hypoxie qui mime avec une grande précision le phénomène d'hypoxie intermittente induit par le SAOS. Ce dispositif présente le double intérêt de générer des cycles d'hypoxie-réoxygénation très rapides tout en consommant un minimum de gaz (air, CO₂, N₂), ce qui en fait un dispositif peu coûteux en termes de ressources. Par ailleurs, ce dispositif a été calibré pour accueillir plusieurs plaques de 6, 24 ou 96 puits, ce qui offre la possibilité de mener les principaux types d'expériences cellulaires comme les tests de prolifération et de migration, mais aussi de prélever les cellules ayant été soumises à l'HI ainsi que des échantillons du milieu de culture ou au niveau des culots cellulaires pour réaliser des analyses biochimiques et moléculaires.

Concernant les caractéristiques techniques du dispositif, nous avons validé une large gamme de concentrations d'oxygène allant de 120 à 25 mmHg avec des cycles d'hypoxie/oxygénation de 30s à 5min. Sans surprise, l'amplitude entre les pics et les nadirs de pression en O₂ (pO₂) était étroitement lié à la durée des cycles. Il est important de préciser à ce stade que l'objectif principal du dispositif était de fournir des conditions d'oxygénation physiologique cohérente vis-à-vis des différents tissus humains. Avec une telle amplitude d'exposition nous avons atteints cet objectif. En effet, la pO₂ moyenne dans les tissus périphériques est approximativement de 38 mmHg avec pour la majeure partie des organes internes à l'état sain une pO₂ comprise entre 25 et 55 mmHg (McKeown, 2014). Cette amplitude est également adaptée aux conditions de pO₂ retrouvées dans les cas les plus sévères de SAOS où l'on peut mesurer une diminution jusqu'à 30 mmHg dans le sang artériel (Lévy et al., 1996).

En 2018, une revue de la littérature s'est intéressée à l'apport des différents modèles cellulaires d'exposition à l'hypoxie intermittente publiés (Hunyor et al., 2018). Selon Hunyor, il est en effet indispensable de pouvoir exposer des cellules cancéreuses à des cycles d'hypoxieréoxygénation qui correspondent aux concentrations d'oxygène retrouvés au niveau tissulaire chez les patients atteints de SAOS. En reprenant l'ensemble des études *in vitro* l'auteur a constaté que la majorité n'utilisait pas de protocole reproduisant les désaturations rapides et prononcées en O₂ propres au SAOS (parfois jusqu'à 60 épisodes par heure). En regardant dans le détail les dispositifs utilisés dans ces études, Hunyor a constaté que ces modèles n'ont souvent pas la capacité technique d'atteindre des niveaux d'hypoxie suffisante pour être comparables à l'hypoxie tissulaire. En revanche, lorsque l'auteur évoque notre modèle, il estime qu'il est à la fois le plus robuste et le plus précis pour mimer à l'échelle

cellulaire les conditions d'oxygénation potentiellement présentes chez les patients touchés par le SAOS.

Il convient toutefois de reconnaître que, même si notre dispositif est le plus efficace pour mimer les conditions du SAOS dans un modèle cellulaire, nous manquons cruellement de connaissances précises sur le degré d'oxygénation mesuré dans des tissus tumoraux et leur microenvironnement chez les patients SAOS. A ce jour, les principales données dont nous disposons concernent la pO_2 médiane intra-tumorale mesurée pour différents cancers chez des patients non-SAOS. Nous présentons dans le tableau suivant les principales mesures publiées de pO_2 par cancer. Nous constatons qu'en ce qui concerne le cancer du sein les données de pO_2 tumorales vont de 10 à 28 mmHg soit un écart d'un facteur 1 à 3. Une variabilité est également retrouvée pour le cancer du cerveau ou du poumon. Dans ces conditions il semble important de disposer de valeurs plus précises de pO_2 pour améliorer notre modèle. Mais il est surtout indispensable de distinguer l'oxygénation au cœur de la tumeur qui correspond à l'hypoxie continue tumorale de l'oxygénation au niveau du microenvironnement qui dépend simultanément de l'architecture du réseau vasculaire locale et des répercussions de l'HI dans sur ce réseau. Nous verrons qu'il existe des solutions pour suivre l'oxygénation tumorale dans la dernière partie de ce manuscrit.

Tableau 7 : Niveaux d'oxygénation retrouvés dans les tissus en conditions physiologiques et dans certaines tumeurs. Données compilées à partir de (McKeown, 2014; Hunyor et al., 2018).

	Valeur médiane de pO ₂ mmHg (% O ₂) (Hunyor & Cook, 2018)		Valeur médiane de pO ₂ mmHg (% O ₂) (McKeown, 2014)	
	Tissus sains	Tumeurs	Tissus sains	Tumeurs
Air extérieur	155 (20.9)	-	160 (21)	-
Air alvéolaire	110 (14.8)	-	100 (13.5)	-
Sang artériel	80-100 (10.8 – 13.5)	-	70 (9.5)	-
Sang veineux	40 (5.4)	-	50 (6.5)	-
Tissus périphériques		-	38 (5)	-
Cerveau	33.8 (4.6)	4.9 – 5.6 (0.7 – 0.8)	26 (3.4)	13 (1.7)
Peau	8 – 35 (1.1 – 4.7)	11.6 (1.5)	40.5 (5.3)	11.6 (1.5)
Sein	65 (8.8)	10 – 28 (1.3 – 3.8)	52 (6.8)	10 (1.3)
Pancréas	57 (7.7)	2 – 2.7 (0.3 – 0.4)	51.6 (6.8)	2.7 (0.4)
Foie	40.6 (5.5)	6 (0.8)	30 (3.9)	6 (0.8)
Poumons	42.8 (5.8)	7.5 (1)	42.8 (5.6)	14.3 (1.9)

B. Exploration des effets de l'hypoxie intermittente sur le développement tumoral mammaire : étude préclinique sur modèles cellulaire et animal

I. Introduction

Dans ce projet de recherche nous avons choisi une approche transversale qui combine des expériences sur cultures de lignées cellulaires tumorales avec des expériences sur un modèle murin de cancer du sein orthotopique. Évidemment, la même lignée de cellules de carcinome mammaire humain a été utilisée pour les deux types d'expériences. Trois objectifs ont été identifiés dans ce travail.

L'objectif principal de ce protocole était de démontrer l'effet de l'hypoxie intermittente sur le développement tumoral *in vivo* selon plusieurs méthodes. Nous avons utilisé la méthode de référence dans le domaine qu'est la mesure du volume tumoral *in situ* au pied à coulisse et nous avons complété cette mesure par une méthode d'imagerie non invasive de bioluminescence qui permet de suivre, dans l'organisme de l'animal, la présence des cellules préalablement modifiées génétiquement pour exprimer stablement la luciférase. Pour répondre avec assurance à notre hypothèse et écarter certains biais expérimentaux nous avons décidé de répéter plusieurs fois le protocole. Chaque expérience a été ensuite considérée comme une étude indépendante et les résultats de chaque étude ont été utilisés indépendamment dans un modèle statistique de méta-analyses qui présente l'avantage de fournir une interprétation globale avec un niveau de preuve élevé.

Le second objectif était de regarder si ce stimulus d'HI était susceptible d'augmenter le pouvoir de dissémination métastatique des cellules tumorales mammaires. Dans le protocole animal nous avons à nouveau choisi la méthode par imagerie de bioluminescence qui a l'avantage de présenter une très haute sensibilité (quelques dizaines à centaines de cellules détectables in

vivo de façon non invasive) et permet ainsi de quantifier non seulement le développement tumoral primaire mais également l'apparition de foyers secondaires. En parallèle de ces expériences animales nous avons exposé cette même lignée cellulaire à des cycles d'hypoxie intermittente dans le dispositif décrit plus haut. Pour cette partie *in vitro*, nous avons évalué la capacité de prolifération par des tests « MTT » et « wound healing », et de migration par « wound healing » des cellules en fonction du stimulus d'exposition. Ces méthodes sont intéressantes pour suivre les cellules dans notre système en deux dimensions, en revanche elles n'apportent aucune information sur le développement tridimensionnel. Ainsi, pour compléter notre étude nous avons également évalué le processus d'expansion cellulaire de cellules cultivées en 3D sous forme de sphéroïdes en fonction du stimulus d'exposition.

Enfin, dans l'objectif de mieux comprendre les mécanismes moléculaires qui interviennent dans la réponse à l'hypoxie intermittente nous avons sélectionné trois inhibiteurs pharmacologiques de l'axe HIF-1/ET-1/VEGF puis nous avons exposées les cellules à ces inhibiteurs. Pour bloquer le facteur HIF-1 nous avons utilisé l'acriflavine, un inhibiteur de la dimérisation du facteur HIF-1 qui a déjà été exploré dans le contexte du cancer (Lee et al., 2009). Pour évaluer l'implication de l'endothéline 1 nous avons sélectionné le macitentan, un inhibiteur non sélectif des récepteurs ET1 (Sidharta et al., 2011). Enfin la voie du VEGF a été testée par administration de pazopanib, un inhibiteur de tyrosine kinase dirigé contre le récepteur du VEGF (Drabkin, 2010). En cas de confirmation de l'implication d'un ou plusieurs de ces facteurs dans le développement tumoral nous avons prévu un protocole de confirmation chez l'animal, ce qui a pu être le cas avec le macitentan.

L'ensemble de ces travaux a fait l'objet d'un manuscrit unique dans lequel les trois objectifs précédemment décrits ont été traités.

II. Manuscrit

Intermittent hypoxia exposure, similar to that observed in obstructive sleep apnea, promotes the development of breast cancer through an activation of the endothelin system.

M. Minovés^{1,2,3*}, S. Kotzki^{1,2}, F. Puch³, E. Lemarié^{1,2}, S. Bouyon^{1,2}, J. Voltaire⁴, B. Gonthier^{1,2}, J. Pépin^{1,2}, V. Josserand^{4,¥}, A. Briançon-Marjollet^{1,2,¥}, D. Godin-Ribuot^{1,2,¥}

1 Grenoble Alpes University, 38000, Grenoble, France

2 INSERM, U1042, HP2 laboratory, 38000, Grenoble, France.

3 CHU Grenoble Alpes, CS 10217, 38000, Grenoble, France 4

INSERM U1209, Institut Albert Bonniot, Grenoble, France

¥ Co-last authors

* Corresponding author at:

Laboratoire HP2, Inserm U1042, Université Grenoble Alpes

UFR de pharmacie de Grenoble, BP 170,

38042 Grenoble Cedex 9, France.

Tel: +33 476 63 75 63 Fax: +33 476 63 71 78

e-mail address: mminoves@chu-grenoble.fr

ABBREVIATIONS AND ACRONYMS

ET-1: Endothelin-1

HIF-1: Hypoxia inducible factor 1

FiO₂: Oxygen inspired fraction

IH: Intermittent hypoxia

IL-6: Interleukine 6

N: normoxia

NF-κB: Nuclear factor-kappa B

OSA: Obstructive sleep apnoea

pO₂: partial pressure of oxygen ROS:

Reactive oxygen species

SMD: Standard mean difference

TNF α: Tumor necrosis factor alpha

VEGF: Vascular endothelial growth factor

INTRODUCTION

According to the French National Cancer Institute, breast cancer represented one-third of the 177 400 newly-diagnosed cancers in women in 2018 and around 18% of the 12 146 cancer-related deaths (Binder-foucard et al., 2019). Breast cancer thus appears to be both the most prevalent cancer in women in France as well as worldwide (Bray et al., 2018). Demographic analysis reveals that the incidence of post-menopausal breast cancer has the most rapid increase (Bray et al., 2018). Cancer etiologies are multifactorial and the evolution of prevalence is probably due to the diversification of the risk factors.

While obesity, diabetes, cigarette smoking, sedentary lifestyle or alcohol consumption have been regularly described as “modifiable risk factors” for breast cancer onset and recurrence (McKenzie et al., 2015; Tamimi et al., 2016; Picon-Ruiz et al., 2017; Arthur et al., 2018; Godinho-Mota et al., 2018, 2019), an increasing number of studies have explored the role of obstructive sleep apnea (OSA) as a potential new risk factor for breast cancer. OSA is a common chronic disorder, affecting nearly 1 billion people worldwide (Benjafield et al., 2019), accompanied by neurocognitive impairment and cardiovascular or metabolic complications (Dempsey et al., 2010; Lévy et al., 2015). OSA is characterized by repetitive partial (hypopnea) or complete (apnea) upper airway obstructions during sleep, resulting in cyclic nocturnal hypoxia/reoxygenation sequences characteristic of intermittent hypoxia (IH). OSA severity tends to increase the odds of associated disorders such as stroke, coronary disease, hypertension (Lévy et al., 2015) and interestingly, cancer mortality (Nieto et al., 2012). Association between OSA and cancer was first explored by Nieto et al. using the Wisconsin Sleep Cohort data (Nieto et al., 2012). In this pioneer work, authors demonstrated that patients with OSA had an increased risk of mortality for all types of cancers. Moreover,

mortality was strongly correlated with OSA severity assessed by the apnea-hypopnea index even after adjusting for confounding variables such as age, sex, smoking, body mass index, physical activity, diabetes, waist circumference and sleep duration.

Regarding breast cancer, two recent cohort studies have explored the impact of OSA in Taiwanese women (Chang et al., 2014; Fang et al., 2015). From the Taiwanese National Health Insurance Research Database, Chang et al. found that women previously diagnosed with OSA tended to have an increased risk of developing a breast cancer in comparison with women without OSA (Chang et al., 2014) and further confirmed that patients with OSA had a higher cancer incidence than did non-OSA patients (Fang et al., 2015). OSA-associated intermittent hypoxia is believed to be the main pathophysiological mechanism behind the cardiovascular and metabolic (Lévy et al., 2015; Gileles-Hillel et al., 2016; Arnaud et al., 2020) consequences of the disease. Indeed, IH induces a set of maladaptive responses at the cell level by an oxidative stress-related expression of transcription factors such as Hypoxia Inducible Factor 1 (HIF-1) and Nuclear Factor kappa B (NF- κ B) (Belaidi et al., 2016). In particular, Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Endothelin-1 (ET-1) are HIF-1 target genes known to be highly expressed in OSA patients or IH models (Briçon-Marjollet et al., 2014; Gras et al., 2016). This leads to inflammation (Arnaud et al., 2011; Gautier-Veyret et al., 2013) and endothelial (Bironneau et al., 2020) and cardiac (Belaidi et al., 2009; Morand et al., 2018) dysfunctions responsible for the majority of the cardiovascular morbidities associated with OSA (Dematteis et al., 2009).

Activation of HIF-1 pathway induced by IH in OSA-patients has the ability to potentiate the mechanisms of tumour development induced by continuous hypoxia in the tumour microenvironment (Harris, 2002; Semenza, 2016; Petrova et al., 2018). Indeed, sustained

hypoxic conditions induced locally by tumour growth have been shown for nearly three decades to promote angiogenesis, cell proliferation and migration, metastasis and chemoresistance through the post transcriptional effects of HIF-1 and NF- κ B and the increased expression of VEGF and ET-1 (Nelson et al., 2003; Rofstad et al., 2010; Rosanò et al., 2013). Regarding the specific effect of IH on tumour development, some studies have demonstrated that IH per se could promote angiogenesis through endothelial cell migration mediated by the HIF-1 pathway (Toffoli et al., 2008, 2009). Thereafter, Almendros et al., using a mouse melanoma model, have shown that IH-exposed mice exhibited larger tumours (Almendros et al., 2012 a), enhanced lung metastasis (Almendros et al., 2013) and increased circulating levels of VEGF (Almendros et al., 2012 b). The effects of IH on melanoma lung metastasis was recently confirmed by Li et al. who showed that oxidative stress and inflammation, through reactive oxygen species generation and TNF, NF- κ B and IL-6 expression, play an important pathogenetic role (Li et al., 2018). Regarding breast cancer, while the effects of sleep duration have been explored (Kakizaki et al., 2008), no preclinical or cohort studies have been able to objectively demonstrate a link between IH and breast cancer nor to identify mechanisms that might enhance the occurrence or development of breast cancer in apneic patients. Our hypothesis assumes that female OSA-patients might have an increased risk of developing breast cancer through synergetic mechanisms between microenvironmental continuous hypoxia and systemic intermittent hypoxia potentiating the activation of HIF-1 and its target genes, ET-1, and VEGF. For this, we investigated the effects of IH on *in vitro* and *in vivo* models of breast cancer growth and invasiveness.

MATERIAL & METHODS

Breast cancer cell line

The study was performed on 4T1 murine breast cancer cells, commonly used to model stage IV human breast cancer because their growth and metastatic spread in mice closely resemble those of human breast cancer (Gilson, 2019).

4T1rvluc2 cells stably expressing Luc2 firefly luciferase (provided by V. Josserand, OPTIMAL, Grenoble, France) were derived from 4T1 cells and were produced by transduction using a HIV-derived lentiviral vector containing the firefly luc2 gene.

Selection of stable transduced cells was performed by adding G418 (Invivogen, France) at 200 µg/mL to the culture medium and monoclonal cell populations were isolated by limiting dilution sub-cloning.

Luciferase-expressing clones were then identified by addition of 150 µg/mL of D-luciferin (Promega, France) followed by *in vitro* bioluminescence imaging using the IVIS Kinetic imaging system (PerkinElmer). The clones with the highest luciferase activities were amplified and bioluminescence imaging was repeated over several division cycles to check the stability of luciferase expression. 4T1rvluc2 cells were then cultured in RPMI medium supplemented with 10% fetal bovine serum and antibiotics.

Cell exposure to intermittent hypoxia

4T1rvluc2 were exposed to an IH protocol consisting of 10-min hypoxia-reoxygenation cycles alternating 5 min at 16% PO₂ followed by 5 min at 2% PO₂, as previously described (Minoves et al., 2017). This resulted in oxygen pressures in culture medium of 125 mmHg during normoxia and 25mmHg during hypoxia. Control normoxic (N) 4T1rvluc2 cells were subjected

to the same cycles with a gas mixture allowing stable oxygenation at 16% PO₂. Carbon dioxide composition of the various gas mixtures was maintained constant at 5%.

Normoxia or IH exposure was performed daily for 8 hours followed by 16 hours of normoxia.

This pattern was chosen to reproduce that of OSA patients with repetitive arterial oxygen desaturations during the night and normal daytime oxygen saturation.

4T1 cell proliferation assay

MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium bromide) assay was used to explore 4T1rvluc2 cell viability and proliferation (CellTiter 96[®] Aqueous; Promega lab, USA).

Cells were seeded at 3000 cells/well 24 hours before N or IH exposure. Cells were incubated with medium supplemented or not with 5 μM macitentan and exposed to N or IH for 2 days.

At day 2, cells were incubated with MTT during the last two hours of exposure before OD measurement.

Wound healing experiments

4T1rvluc2 cells were cultured in RPMI 1640 medium containing 10% fetal calf serum (FCS) supplemented with penicillin (100 IU/mL), streptomycin (100 μg/mL, PS) and L-Glutamine (2mM) (LifeTechnologies, USA). Cells were seeded at 7500/well in 24-well semi-permeable plates (Zell Kontakt; Germany) pre-coated with 1/10 type 1 collagen in sterile water (Collagen, Type I solution from rat tail, Sigma Aldrich, USA) and allowed to reach 100% confluence. Third day after seeding, wound healings were performed by scratching the wells from top to bottom of the well with a sterile 100-μl cone (TipOne; Starlab, France). Detached cells were removed by changing the culture medium. At confluent state, cells were then incubated with medium supplemented or not with either 5 μM macitentan, 0.1μM pazopanib or 0.2 μM acriflavine

and exposed to N or IH cycles for 4 days. Wound repair was assessed daily during 5 consecutive days using a camera-coupled optical microscope ($\times 10$ magnification; Olympus CK2; Olympus, USA). Repaired areas were determined by subtracting cell-free areas at various timepoints from initial cell-free areas (Image J software, NIH, USA). Values of filled areas were normalized relative to control areas.

Spheroid proliferation and invasiveness

4T1rluc2 cells were cultured in 96-well-tissue plate uncoated U-bottom (#650185; Greiner Cellstar) to allow the formation of one spheroid/well. 2000 cells/well were loaded in their medium but enriched with 10% of methylcellulose (Methocell[®]MC, Sigma Aldrich, USA) and the plate was centrifuged at 500 g, 5min, RT to initiate the process of spheroid formation.

Three days later, the spheroids formation was assessed by microscopic visualization.

Spheroids were isolated to be replaced in a 24-well semi-permeable bottom plates (Zell Kontakt; Germany) pre-coated with type 1 collagen (Sigma Aldrich, USA; dilution 1/10 in sterile water) with 1ml of their medium without serum. Serum was replaced by adding 20 ng/mL of epidermal growth factor and 20ng/mL basic fibroblast growth factor and 1X NeuroBrew-21 all from Miltenyi Biotec Germany. Spheroids were exposed to N or IH for an additional 3 days. Their diameter was measured using a graduated scale placed into the microscope objective and pictures were taken twice daily using a camera-coupled optical microscope (Axiovert 25; Carl Zeiss, Switzerland).

Animal breast cancer model

All experiments were conducted in accordance with the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for experimental and other scientific purposes (Council of Europe, European Treaties ETS 123, Strasbourg, 18 March 1986), as well as with the Guide

for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publication No. 85-23, revised 1996) and were approved by the Institutional Ethics Committee for Animal Research (agreement number 2016012818193391).

The study was conducted on fifty-seven 5-week-old female immunodeficient NMRI nude mice (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France) weighing 20 to 25 g. Animals were housed in controlled light and temperature conditions with food and tap water ad libitum and were acclimated for 1 week prior to the beginning of the experiments.

On day 0, mice were anesthetized (4% isoflurane/air for induction and 1.5% thereafter) and injected into the mammary fat pad with 5×10^5 exponentially dividing 4T1rvLuc2 cells (injection volume: 50 μ L in 1X PBS), as described by Paschall and Liu (Paschall et al., 2016).

Seven days after orthotopic implantation, tumours were palpable and measurable in all mice. Tumor length and width were measured three times a week using a caliper and tumour volumes were calculated according to the formula: volume (mm^3) = $0.5 \times \text{length} \times (\text{width})^2$. On day 14, primary tumours were surgically resected under 1–2% isoflurane anesthesia, and weighted.

Exposure to intermittent hypoxia

The different experimental groups and the experimental design of the study are summarized in Figure **S.1**.

Mice were randomly divided into groups exposed to normoxia or intermittent hypoxia as previously described (Dematteis et al., 2009). Briefly, mice were exposed daily, during their daytime sleeping period, to 8 consecutive hours of 1-min IH cycles consisting of 30 seconds at 21% FiO_2 and 30 seconds at 5% FiO_2 . Control normoxic (N) mice were exposed to similar air cycles to undergo the same experimental conditions. FiO_2 level in housing cages was monitored throughout the experiments (ML206 gas analyzer; ADInstruments, UK).

All animals were exposed during 14 consecutive days before tumour cell implantation followed by 14 additional days until primary tumour resection.

Pharmacological inhibition of endothelin pathway

To explore the role of the ET1 system on tumour growth, two additional groups of 7 mice were treated with macitentan, a dual endothelin receptor antagonist (graciously provided by Actelion Pharmaceuticals, Switzerland), from days 0 to 14 of N or IH exposure. Macitentan (about 30 mg/kg/day) was taken orally by incorporating the drug into the food.

Bioluminescence imaging

In all groups, 4T1rvLuc2 cell proliferation and metastasis were monitored by *in vivo* bioluminescence imaging (BLI) at days 7, 14 and 21 following tumor cell implantations. Five minutes before imaging, vigil mice received an intraperitoneal injection of 150 µg/g of Dluciferin (Promega, France). They were then anesthetized (isoflurane 4 % for induction and 1.5% thereafter) and placed in the BLI system (IVIS Kinetic, PerkinElmer, USA), in supine position. Signal quantifications were carried out by drawing regions of interest on the primary tumor and thorax areas (LivingImage software; PerkinElmer, USA). Results were expressed as photons per second (ph/s).

Statistical analysis

Continuous data are expressed as the mean \pm S.D. Time series data were analyzed by repeated-measures analysis of variance (ANOVA). Effects of independent variables such as exposure stimulus or treatment were analyzed by one-way ANOVA. As inequality of variance could not be excluded a Greenhouse-Geisser adjustment was used. Discrete data are expressed as frequency of occurrence and were analyzed by Chi-squared test. We tested the effect of time, of exposure protocols, of treatment as well as interactions between these factors. Two-sided

significance tests were used throughout. We considered p -values < 0.05 as significant, corrected by Bonferroni's method for multiple comparison. Statistical analysis was performed with SPSS statistics 20.0 for Windows (IBM corp., Chicago IL, USA).

The effect of intermittent hypoxia on tumour size, weight, growth and on thoracic dissemination were globally assessed by a meta-analytical method. Briefly, Hedges' g measure of effect size was calculated from means, standard deviations, and sample sizes of a minimum of three independent repeated experiments for each outcome. Meta-analysis was performed from dedicated packages available in R Studio software (Version 1.2.1335, 2009-2019 RStudio, Inc.). For a detailed description of the meta-analytical technique see supplementary method.

RESULTS

***In vitro* proliferation and migration of 4T1 tumour cells is increased by intermittent hypoxia exposure.**

MTT proliferation assay conducted over a 2-days IH exposure induced a significant 14% increase ($p = 0.03$, one-way ANOVA) in cell proliferation compared to normoxia (Figure **1.A**).

In wound-healing assays, a significant increase in 2D wound repair kinetic was observed ($p = 0.041$, repeated measures ANOVA) in cells exposed to IH compared to normoxia (Figure **1.C**).

Significant differences between both conditions were observed on days 1, 2 and 3 ($p = 0.044$, $p = 0.004$ and $p = 0.048$, respectively; post-hoc analysis), 2 days of HI exposure leading to a 18% increase in wound repair (Figure **1.B** and **D**).

These results were further confirmed in a tumour spheroid model (Figure **1.E**). Indeed, IH significantly enhanced spheroid expansion ($p = 0.0043$, repeated measures ANOVA) up to 20%

compared with normoxia (Figure **1.F**). Post-hoc analysis showed a significant difference on days 2, 2.5 and 3 of IH exposure ($p < 0.05$ each; Figure **1.E and F**).

Increased wound healing induced by intermittent hypoxia is reversed by non-selective endothelin-1 receptor antagonism.

The mechanisms involved in the enhancing effect of IH on wound healing were investigated using alternatively a HIF-1 inhibitor (acriflavine), an inhibitor of VEGF receptor tyrosine kinase activity (pazopanib) or a non-selective endothelin-1 receptor antagonist (macitentan).

Neither acriflavine nor pazopanib significantly modified wound healing, whether in intermittent hypoxia or in normoxic conditions (Figures **2.A and B**). By contrast, while macitentan treatment did not affect wound healing in normoxic conditions, it significantly reduced 4T1 cell wound repair under IH exposure ($p = 0.007$, repeated measures ANOVA) (Figure **2.C**) with main effects on day 2 (24.5% decrease; $p < 0.01$ post-hoc analysis) and day 3 of exposure (15%; $p < 0.05$; post-hoc analysis) (Figure **2.D**). Macitentan also significantly reduced the proliferation induced by 2 days of IH exposure ($p < 0.01$, one-way ANOVA) (Figure **2.E**).

Intermittent hypoxia exposure accelerates tumour growth in an orthotopic rodent model of breast cancer.

In our experimental conditions, among the 57 mice from the 4 experiments, no mice died from IH exposure or cancer development. Intermittent hypoxia induced a significant acceleration of tumour growth, as estimated by caliper measurement, compared to normoxia (Figure **3.A, B, C and D**). Overall pooled effects size was estimated by SMD with Hedges' method and was significantly in favour of a large effect of IH on tumour growth on day 7 (effect size = 0.81; $n = 4$; 95%-CI 0.27-1.36; $p = 0.0034$) (Figure **3.A**), day 11 (effect size = 0.93; $n = 3$; 95%-CI 0.301.57;

p = 0.0039) (Figure 3.B) and day 14 (effect size = 1.0; n = 4; 95%-CI 0.45-1.55; p = 0.0004) (Figure 3.C) of exposure. Individual results for each experiment are presented in Figure S.2. Moreover, overall pooled effects size highlighted a significantly large effect of IH on tumour weight (effect size = 0.86; n = 4; 95%-CI 0.31-1.41; p = 0.0022) on day 14 (Figure 3.E). Figures 3.D, 3.F, 4.C, and 4.D present the results of the experiment which is the most representative of the combined results from all 4 experiments. Individual results of each experiment are presented in Figure S.2, S.3 and S.4.

Tumour cell proliferation, evaluated by *in vivo* bioluminescence imaging in three independent experiments, was also significantly enhanced after 14 days of IH exposure compared to normoxia (Figure 4.C and 4.D). Overall pooled effects size estimated by SMD with Hedges' method did not indicate a significant effect of IH on tumour growth on day 7 (Figure 4.A) but showed a large effect (effect size = 1.57; n = 3; 95%-CI 0.81-2.34; p = 0.0023) on day 14 of exposure (Figure 4.B).

IH-induced increase in tumour development is reversed by non-selective endothelin receptor antagonism.

No effects of endothelin receptor blockade were observed in animals exposed to normoxia (Figure 5.A).

In contrast, tumour size was significantly reduced on days 7 and 11 (decrease by 42.7%; p = 0.0014 and 41.2%; p=0.0032, respectively; pots-hoc analysis) in macitentan-treated animals exposed to IH compared to untreated animals exposed to similar IH conditions (Figure 5.B).

Intermittent hypoxia exposure promotes *in vivo* breast cancer metastasis.

Metastatic thoracic invasion was estimated by *in vivo* bioluminescence imaging in three independent experiments. At day 14, metastasis development was enhanced in mice exposed

to IH compared to normoxic controls (Figure **6.C** and **D**). Overall pooled effects size estimated by SMD with Hedges' method did not indicate a significant effect of IH exposure on tumour growth on day 7 (Figure **6.A**) but showed a moderate effect (effect size = 0.77; n = 3; 95%-CI 0.12-1.42; p = 0.01) on day 14 (Figure **6.B**). Figure 6C present the results of the experiment which is the most representative of the combined results from all 3 experiments. Individual results for each experiment are presented in Figure **S.5**.

Moreover, the proportion of animals with thoracic invasion was not different in groups exposed to IH (80% at day 7 and 100% at day 14) and normoxia (65% at day 7 and 90% at day 14, data not shown). Overall pooled effects size estimated by SMD with Hedges' method did not show a significant effect at day 7 nor at day 14 of exposure (data not shown).

DISCUSSION

To the best of our knowledge, this is the first study to combine complementary animal and cell experiments to explore the consequences of IH on breast cancer development. The results of our study, using IH devices specifically designed to mimic the IH pattern of OSA, show that IH exposure increased breast tumour growth as well as its invasiveness in both animal and cell experiments. In addition, we also showed that the deleterious effect of IH on breast cancer development could be reversed by blocking the endothelin pathway with macitentan.

Intermittent hypoxia exposure enhances breast cancer growth.

IH effect on primary tumor growth was evaluated by 3 distinct methods: primary tumour volume measured by caliper, tumour cell proliferation estimated by *in vivo* bioluminescence imaging and *ex vivo* tumor weight. Regardless of the method used, we showed that mice exposed to IH presented an increased tumour growth, with a maximal effect observed on day 14 following implantation. The non-invasive methods, namely manual caliper measurement and bioluminescence imaging, enabled us to assess the kinetics of tumour growth enhancement by IH exposure while tumour weight after excision confirmed the difference between IH- and normoxia-exposed groups.

These results are consistent with previously published *in vivo* data in lung cancer (Chao et al., 2020; Kang et al., 2020) or melanoma (Almendros et al., 2012 b; a; Yoon et al., 2017) models using slightly different IH protocols. However, the studies mostly used *ex vivo* tumour weight as an endpoint.

Our results have been confirmed *in vitro* since both proliferation, migration and expansion were higher in tumour cells incubated in IH compared to normoxic conditions. The present study is thus the first to show that *in vivo* orthotopic breast tumour growth is accelerated by

IH and to demonstrate that expansion by IH could be explained by both enhanced proliferation capacity and increased migration rate as demonstrated *in vitro*.

Intermittent hypoxia exposure increases breast cancer metastasis.

Non-invasive bioluminescence imaging demonstrated that thoracic metastasis was enhanced in mice exposed to IH compared to normoxia. Moreover, our *in vitro* studies support these *in vivo* results since breast cancer cells exposed to IH have shown increased proliferation/migration in wound healing assay. Although we have not used a specific Transwell migration assay (Justus et al., 2014) to evaluate the migration ability of tumour cell through an extracellular matrix, the increase of proliferation/migration observed with wound healing assay would indicate a role of IH in tumour spread. This is consistent with the hypothesis proposed by Chen et al. that IH exposure could induce a metastatic phenotype in breast cancer (Chen et al., 2018). Indeed, they have shown that *in vitro* IH exposure induces a number of genetic, molecular, biochemical, and cellular alterations that facilitate tumor cell survival/colonization and create a permissive microenvironment, thus enhancing metastatic growth (Chen et al., 2018). Our results are also in accordance with the *in vivo* studies of Almendros et al. and Li et al. showing an enhanced lung metastasis of melanoma in rodents exposed to IH (Almendros et al., 2013; Li et al., 2018).

Inhibition of endothelin pathway reversed the tumour growth induced by IH.

To explore the underlying mechanisms involved in the cell response to IH, we focused on the HIF-1 transcription factor and its target genes encoding for VEGF and ET-1. 4T1 cells were treated with three different inhibitors directed against HIF-1, VEGF, and endothelin 1: acriflavine, pazopanib and macitentan, respectively. Only dual endothelin receptor inhibition with macitentan reversed the deleterious effect of IH on cell proliferation and migration *in*

vitro. Moreover, this effect was also translated *in vivo* as illustrated by a decreased tumor growth in IH-exposed mice treated with macitentan. These results are in line with our mechanistic hypothesis involving the ET-1 pathway in the deleterious effect of IH regarding tumour growth. Indeed, ET-1 has been previously shown to promote tumour development. Under the pressure of tumour hypoxia and the resulting HIF-1 activation, ET-1 overexpression contributes to autocrine and paracrine tumour cells proliferation, migration, and neovascularization (Rosanò et al., 2013).

Nevertheless, we observed that ET-1 receptors blockade did not reduce tumour growth under normoxic conditions and that it was effective only in the context of IH. This is in accordance with previous data from our group showing that while ET-1 receptor antagonism is devoid of effects in rodents exposed to normoxia, it has the ability to prevent the deleterious effects of IH on various organs such as the heart (Belaidi et al., 2009), blood vessels (Gras et al., 2016) and adipose tissue (Briançon-Marjollet et al., 2016). This can be explained by the sustained activation of the HIF-1/target gene axis by the hypoxia-reoxygenation pattern of IH conditions compared to normoxia or chronic hypoxia (Yuan et al., 2008).

In the present study, we investigated small, early-stage and thus presumably mildly hypoxic tumours. The differential response to ET-1 receptor blockade in animals exposed to normoxia and IH could thus be due to the above-mentioned specific effect of IH on tissue endothelin expression but also to the systemic nature of IH, which activate the HIF-1/ET-1 pathway in the tumour macroenvironment. According to this approach, macitentan would only be effective under IH conditions and could then have an impact on tumour development at an early stage. These results emphasize the importance of investigating the contribution of healthy peripheral tissues to tumour development under IH conditions, at early stages of the disease.

This was addressed in a recent review by Hunyor et al. highlighting the difficulty to distinguish between the contribution of the systemic IH associated with OSA from that of the local chronic hypoxia associated with tumour growth (Hunyor et al., 2018).

Our results could be advantageously enriched by further information on oxygen levels in the tumour, its microenvironment and neighbouring healthy tissues. Monitoring oxygen levels changes related to IH exposure could indeed provide valuable information on individual tissue responses. As proposed recently by Brown et al., photoacoustic imaging appears to be a promising tool to probe tissue vascularization and oxygen in our animal model of breast cancer (Brown et al., 2019). Additional advances in the *in vitro* HI set up could be provided by performing 3D-co-culture of 4T1 cells with other cell types, such as endothelial cells (Oh et al., 2020) and fibroblasts in order to mimic tumour microenvironment (Bhattacharya et al., 2020). As a conclusion, by using *in vitro* and *in vivo* models, the present study is the first to show that intermittent hypoxia exposure, such as that encountered in obstructive sleep apnea, promotes breast cancer development and metastasis. Meta-analysis of three independent animal studies enabled to demonstrate that IH enhances tumour growth and lung metastasis by a mixed enhanced cell proliferation and migration as demonstrated by *in vitro* experiments. Moreover, prevention of both *in vitro* and *in vivo* effects of IH by macitentan is in favour of a major involvement of the endothelin system in the cancer-promoting effects of IH. The lack of response to endothelin receptor blockade in normoxic conditions is in accordance with previous observations from our group and suggests that the endothelin system involvement is specifically linked to IH. Additional studies are required to explore the dynamic relationship between endothelin expression and oxygen level in both, tumour, microenvironment and

healthy tissues to assess their respective contribution to breast cancer expansion in the context of systemic intermittent hypoxia.

ACKNOWLEDGEMENTS

The Optimal imaging platform is supported by France Life Imaging (French program “Investissement d'Avenir” grant; “Infrastructure d'avenir en Biologie Santé”, ANR-11-INBS0006) and the IBISA French consortium “Infrastructures en Biologie Santé et Agronomie”. Imaging systems used in this study were purchased thanks to France Life Imaging (French program “Investissement d'Avenir” grant; “Infrastructure d'avenir en Biologie Sante”, ANR11-INBS-0006) and the Contrat Plan Etat-Région Auvergne-Rhone-Alpes.

Macitentan treatment was graciously provided by Actelion Pharmaceuticals, Switzerland. We would like to thank Gisèle Froment, Didier Nègre and Caroline Costa from the lentivectors production facility/SFR BioSciences Gerland – Lyon Sud (UMS3444-US8) for providing viral particles for luciferase transfection.

FUNDING

This project was supported by INSERM, University of Grenoble Alpes, Agir pour les Maladies Chroniques (APMC) foundation and the national league against cancer.

REFERENCES

Almendros, I.; Montserrat, J. M.; Ramirez, J.; Torres, M.; Duran-Cantolla, J.; Navajas, D.; Farre, R., 2012a: Intermittent hypoxia enhances cancer progression in a mouse model of sleep apnoea. *European Respiratory Journal.*, 39, 215–217.

Almendros, I.; Montserrat, J. M.; Torres, M.; Bonsignore, M. R.; Chimenti, L.; Navajas, D.; Farré, R., 2012b: Obesity and intermittent hypoxia increase tumor growth in a mouse model of sleep apnea. *Sleep Medicine.*, 13, 1254–1260.

Almendros, I.; Montserrat, J. M.; Torres, M.; Dalmases, M.; Cabañas, M. L.; Campos-Rodríguez, F.; Navajas, D.; Farré, R., 2013: Intermittent hypoxia increases melanoma metastasis to the lung in a mouse model of sleep apnea. *Respiratory Physiology & Neurobiology.*, 186, 303–307.

Arnaud, C.; Poulain, L.; Lévy, P.; Dematteis, M., 2011: Inflammation contributes to the atherogenic role of intermittent hypoxia in apolipoprotein-E knock out mice. *Atherosclerosis.*, 219, 425–431.

Arnaud, C.; Bochaton, T.; Pépin, J. L.; Belaidi, E., 2020: Obstructive sleep apnoea and cardiovascular consequences: Pathophysiological mechanisms. *Archives of cardiovascular diseases.*, 113, 350–358.

Arthur, R.; Wassertheil-Smoller, S.; Manson, J. A. E.; Luo, J.; Snetselaar, L.; Hastert, T.; Caan, B.; Qi, L.; Rohan, T., 2018: The combined association of modifiable risk factors with breast cancer risk in the women's health initiative. *Cancer Prevention Research.*, 11, 317–326.

Belaidi, E.; Joyeux-Faure, M.; Ribuot, C.; Launois, S. H.; Levy, P.; Godin-Ribuot, D., 2009: Major role for hypoxia inducible factor-1 and the endothelin system in promoting myocardial infarction and hypertension in an animal model of obstructive sleep apnea. *Journal of the American College of Cardiology.*, 53, 1309–1317.

Belaidi, E.; Morand, J.; Gras, E.; Pépin, J. L.; Godin-Ribuot, D., 2016: Targeting the ROS-HIF-1-endothelin axis as a therapeutic approach for the treatment of obstructive sleep apnea-related cardiovascular complications. *Pharmacology & therapeutics.*, 168, 1–11.

Benjafield, A. V.; Ayas, N. T.; Eastwood, P. R.; Heinzer, R.; Ip, M. S. M.; Morrell, M. J.; Nunez, C. M.; Patel, S. R.; Penzel, T.; Pépin, J. L.; Peppard, P. E.; Sinha, S.; Tufik, S.; Valentine, K.; Malhotra, A., 2019: Estimation of the global prevalence and burden of obstructive sleep apnoea: a literature-based analysis. *The Lancet Respiratory Medicine.*, 7, 687–698.

Bhattacharya, S.; Calar, K.; de la Puente, P., 2020: Mimicking tumor hypoxia and tumor-immune interactions employing three-dimensional in vitro models. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR.*, 39, 75.

Binder-foucard, F.; Belot, A.; Delafosse, P.; Remontet, L.; Woronoff, A. S.; Bossard, N., 2019: Estimation nationale de l' incidence et de la mortalité par cancer en France: synthese 2018. Institut de veille sanitaire.

Bironneau, V.; Tamisier, R.; Trzepizur, W.; Andriantsitohaina, R.; Berger, M.; Goupil, F.; Joyeux-Faure, M.; Jullian-Desayes, I.; Launois, S.; Le Vaillant, M.; Martinez, M. C.; Roche, F.; Pépin, J. L.; Gagnadoux, F., 2020: Sleep apnoea and endothelial dysfunction: An individual patient data meta-analysis. *Sleep medicine reviews.*, 52, 101309.

Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R. L.; Torre, L. A.; Jemal, A., 2018: Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians.*, 68, 394–424.

Briançon-Marjollet, A.; Pépin, J. L.; Weiss, J. W.; Lévy, P.; Tamisier, R., 2014: Intermittent hypoxia upregulates serum VEGF. *Sleep medicine.*, 15, 1425–1426.

Briançon-Marjollet, A.; Monneret, D.; Henri, M.; Hazane-Puch, F.; Pepin, J. L.; Faure, P.; Godin-Ribuot, D., 2016: Endothelin regulates intermittent hypoxia-induced lipolytic remodelling of adipose tissue and phosphorylation of hormone-sensitive lipase. *The Journal of physiology.*, 594, 1727–1740.

Brown, E.; Brunker, J.; Bohndiek, S. E., 2019: Photoacoustic imaging as a tool to probe the tumour microenvironment. *Disease models & mechanisms.*, 12.

Chang, W. P.; Liu, M. E.; Chang, W. C.; Yang, A. C.; Ku, Y. C.; Pai, J. T.; Lin, Y. W.; Tsai, S. J., 2014: Sleep apnea and the subsequent risk of breast cancer in women: a nationwide population-based cohort study. *Sleep medicine.*, 15, 1016–1020.

- Chao, Y.; Shang, J.; Ji, W., 2020: ALKBH5-m6A-FOXO1 signaling axis promotes proliferation and invasion of lung adenocarcinoma cells under intermittent hypoxia. *Biochemical and Biophysical Research Communications.*, 521, 499–506.
- Chen, A.; Sceneay, J.; Gödde, N.; Kinwel, T.; Ham, S.; Thompson, E. W.; Humbert, P. O.; Möller, A., 2018: Intermittent hypoxia induces a metastatic phenotype in breast cancer. *Oncogene.*, 37, 4214–4225.
- Dematteis, M.; Godin-Ribuot, D.; Arnaud, C.; Ribuot, C.; Stanke-Labesque, F.; Pépin, J. L.; Lévy, P., 2009: Cardiovascular consequences of sleep-disordered breathing: contribution of animal models to understanding the human disease. *ILAR journal.*, 50, 262–281.
- Dempsey, J. A.; Veasey, S. C.; Morgan, B. J.; O'Donnell, C. P., 2010: Pathophysiology of sleep apnea. *Physiological reviews.*, 90, 47–112.
- Fang, H. F.; Miao, N. F.; Chen, C. D.; Sithole, T.; Chung, M. H., 2015: Risk of Cancer in Patients with Insomnia, Parasomnia, and Obstructive Sleep Apnea: A Nationwide Nested Case-Control Study. *Journal of Cancer.*, 6, 1140–1147.
- Gautier-Veyret, E.; Arnaud, C.; Bäck, M.; Pépin, J. L.; Petri, M. H.; Baguet, J. P.; Tamisier, R.; Lévy, P.; Stanke-Labesque, F., 2013: Intermittent hypoxia-activated cyclooxygenase pathway: role in atherosclerosis. *The European respiratory journal.*, 42, 404–413.
- Gileles-Hillel, A.; Kheirandish-Gozal, L.; Gozal, D., 2016: Biological plausibility linking sleep apnoea and metabolic dysfunction. *Nature reviews. Endocrinology.*, 12, 290–298.
- Gilson, P., 2019: The pyrrolopyrimidine colchicine-binding site agent PP-13 reduces the metastatic dissemination of invasive cancer cells in vitro and in vivo. *Biochem Pharmacol.*
- Godinho-Mota, J. C. M.; Martins, K. A.; Vaz-Gonçalves, L.; Mota, J. F.; Soares, L. R.; Freitas-Junior, R., 2018: Visceral adiposity increases the risk of breast cancer: a case-control study. *Nutricion hospitalaria.*, 35, 576–581.
- Godinho-Mota, J. C. M.; Gonçalves, L. V.; Mota, J. F.; Soares, L. R.; Schincaglia, R. M.; Martins, K. A.; Freitas-Junior, R., 2019: Sedentary behavior and alcohol consumption increase breast cancer risk regardless of menopausal status: A case-control study. *Nutrients.*, 11.
- Gras, E.; Belaidi, E.; Briançon-Marjollet, A.; Pépin, J. L. L.; Arnaud, C.; Godin-Ribuot, D.; Ribuot, D. G., 2016: Endothelin-1 mediates intermittent hypoxia-induced inflammatory vascular remodeling through HIF-1 activation. *Journal of Applied Physiology.*, 120, 437–443.
- Harris, A. L., 2002: Hypoxia — a key regulatory factor in tumour growth. *Nature Reviews Cancer.*, 2, 38–47.
- Hunyor, I.; Cook, K. M., 2018: Models of intermittent hypoxia and obstructive sleep apnea: Molecular pathways and their contribution to cancer. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology.*, 315, R669–R687.
- Justus, C. R.; Leffler, N.; Ruiz-Echevarria, M.; Yang, L. V., 2014: In vitro Cell Migration and Invasion Assays. *Journal of Visualized Experiments.*

Kakizaki, M.; Kuriyama, S.; Sone, T.; Ohmori-Matsuda, K.; Hozawa, A.; Nakaya, N.; Fukudo, S.; Tsuji, I., 2008: Sleep duration and the risk of breast cancer: the Ohsaki Cohort Study. *British journal of cancer.*, 99, 1502–1505.

Kang, H. S.; Kwon, H. Y.; Kim, I. K.; Ban, W. H.; Kim, S. W.; Kang, H. H.; Yeo, C. D.; Lee, S. H., 2020: Intermittent hypoxia exacerbates tumor progression in a mouse model of lung cancer. *Scientific Reports.*, 10, 1854.

Lévy, P.; Kohler, M.; McNicholas, W. T.; Barbé, F.; McEvoy, R. D.; Somers, V. K.; Lavie, L.; Pépin, J. L., 2015: Obstructive sleep apnoea syndrome. *Nature Reviews Disease Primers.*, 1, 15015.

Li, L.; Ren, F.; Qi, C.; Xu, L.; Fang, Y.; Liang, M.; Feng, J.; Chen, B.; Ning, W.; Cao, J., 2018: Intermittent hypoxia promotes melanoma lung metastasis via oxidative stress and inflammation responses in a mouse model of obstructive sleep apnea. *Respiratory Research.*, 19, 1–9.

Lipsey, M. W.; Wilson, D. B., 2001: Practical meta-analysis. *Practical meta-analysis.*, Applied social research methods series; vol 49. Sage Publications, Inc, Thousand Oaks, CA, US, CA, US.

McKenzie, F.; Ferrari, P.; Freisling, H.; Chajès, V.; Rinaldi, S.; de Batlle, J.; Dahm, C. C.; Overvad, K.; Baglietto, L.; Dartois, L.; Dossus, L.; Lagiou, P.; Trichopoulos, D.; Trichopoulou, A.; Krogh, V.; Panico, S.; Tumino, R.; Rosso, S.; Bueno-de-Mesquita, H. B. A. et al., 2015: Healthy lifestyle and risk of breast cancer among postmenopausal women in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition cohort study. *International journal of cancer.*, 136, 2640–2648.

Minoves, M.; Morand, J.; Perriot, F.; Chatard, M.; Gonthier, B.; Lemarié, E.; Menut, J. B.; Polak, J.; Pépin, J. L.; Godin-Ribuot, D.; Briançon-Marjollet, A., 2017: An innovative intermittent hypoxia model for cell cultures allowing fast PO₂ oscillations with minimal gas consumption. *American Journal of Physiology - Cell Physiology.*, 313, C460–C468.

Morand, J.; Arnaud, C.; Pepin, J. L.; Godin-Ribuot, D., 2018: Chronic intermittent hypoxia promotes myocardial ischemia-related ventricular arrhythmias and sudden cardiac death. *Scientific reports.*, 8, 2997.

Nelson, J.; Bagnato, A.; Battistini, B.; Nisen, P., 2003: The endothelin axis: emerging role in cancer. *Nature reviews. Cancer.*, 3, 110–116.

Nieto, F. J.; Peppard, P. E.; Young, T.; Finn, L.; Hla, K. M.; Farré, R., 2012: Sleep-disordered breathing and cancer mortality: Results from the Wisconsin Sleep Cohort Study. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.*, 186, 190–194.

Oh, Y. S.; Choi, M. H.; Shin, J. I.; Maza, P. A. M. A.; Kwak, J. Y., 2020: Co-Culturing of Endothelial and Cancer Cells in a Nanofibrous Scaffold-Based Two-Layer System. *International journal of molecular sciences.*, 21.

Paschall, A. V.; Liu, K., 2016: An Orthotopic mouse model of spontaneous breast cancer metastasis. *Journal of Visualized Experiments.*, 2016, 1–7.

Petrova, V.; Annicchiarico-Petruzzelli, M.; Melino, G.; Amelio, I., 2018: The hypoxic tumour microenvironment. *Oncogenesis.*, 7.

Picon-Ruiz, M.; Morata-Tarifa, C.; Valle-Goffin, J. J.; Friedman, E. R.; Slingerland, J. M., 2017: Obesity and adverse breast cancer risk and outcome: Mechanistic insights and strategies for intervention. *CA: A Cancer Journal for Clinicians.*, 67, 378–397.

Rofstad, E. K.; Gaustad, J. V.; Egeland, T. A. M.; Mathiesen, B.; Galappathi, K., 2010: Tumors exposed to acute cyclic hypoxic stress show enhanced angiogenesis, perfusion and metastatic dissemination. *International journal of cancer.*, 127, 1535–1546.

Rosanò, L.; Spinella, F.; Bagnato, A., 2013: Endothelin 1 in cancer: Biological implications and therapeutic opportunities. *Nature Reviews Cancer.*, 13, 637–651.

Semenza, G. L., 2016: The hypoxic tumor microenvironment: A driving force for breast cancer progression. *Biochimica et biophysica acta.*, 1863, 382–391.

Tamimi, R. M.; Spiegelman, D.; Smith-Warner, S. A.; Wang, M.; Pazaris, M.; Willett, W. C.; Eliassen, A. H.; Hunter, D. J., 2016: Population Attributable Risk of Modifiable and Nonmodifiable Breast Cancer Risk Factors in Postmenopausal Breast Cancer. *American journal of epidemiology.*, 184, 884–893.

Toffoli, S.; Michiels, C., 2008: Intermittent hypoxia is a key regulator of cancer cell and endothelial cell interplay in tumours. *The FEBS journal.*, 275, 2991–3002.

Toffoli, S.; Roegiers, A.; Feron, O.; Van Steenbrugge, M.; Ninane, N.; Raes, M.; Michiels, C., 2009: Intermittent hypoxia is an angiogenic inducer for endothelial cells: role of HIF-1. *Angiogenesis.*, 12, 47–67.

Yoon, D. W.; So, D.; Min, S.; Kim, J.; Lee, M.; Khalmuratova, R.; Cho, C. H.; Park, J. W.; Shin, H. W., 2017: Accelerated tumor growth under intermittent hypoxia is associated with hypoxia-inducible factor-1dependent adaptive responses to hypoxia. *Oncotarget.*, 8, 61592–61603.

Yuan, G.; Nanduri, J.; Khan, S.; Semenza, G. L.; Prabhakar, N. R., 2008: Induction of HIF-1 α expression by intermittent hypoxia: involvement of NADPH oxidase, Ca²⁺ signaling, prolyl hydroxylases, and mTOR. *Journal of cellular physiology.*, 217, 674–685.

FIGURES

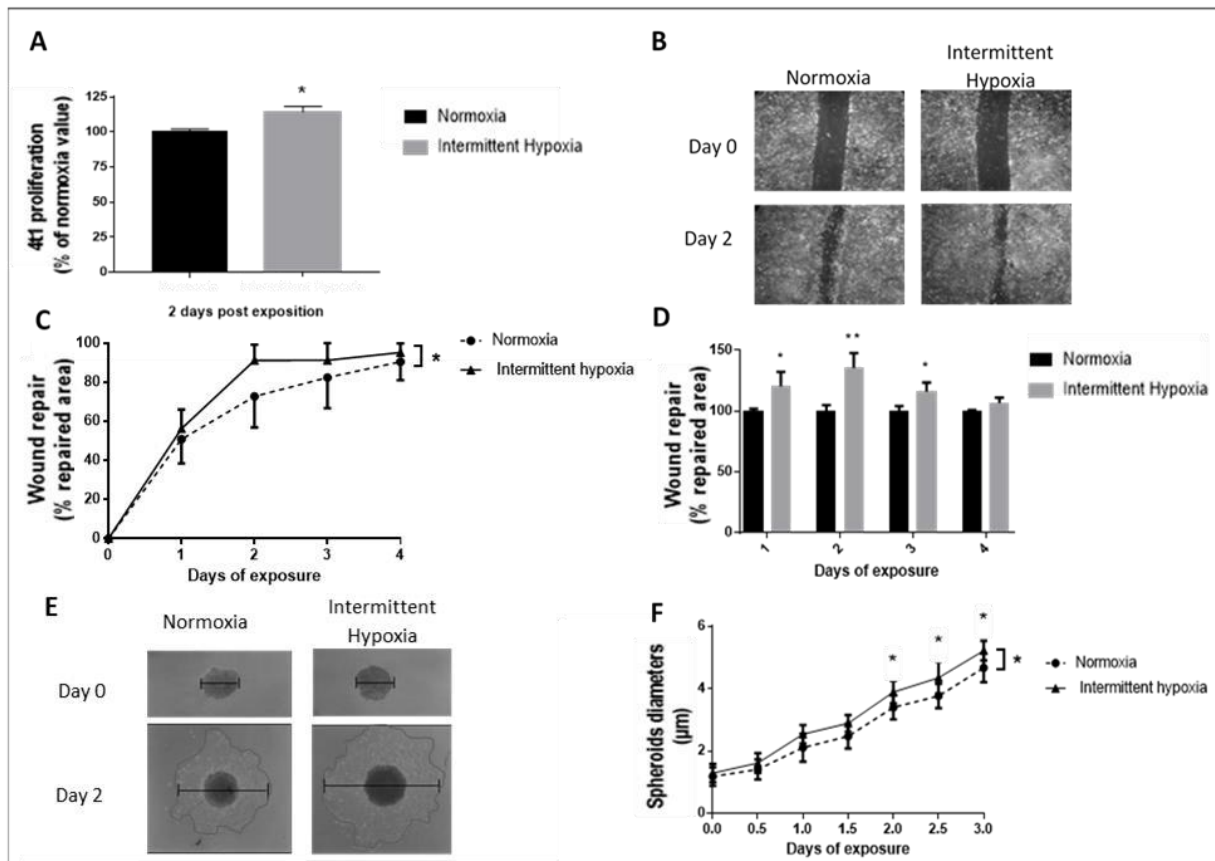


Figure 1. Intermittent hypoxia increases breast cancer cell proliferation and migration in vitro.

A. Quantification of viable proliferating 4T1 cells was performed by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) staining after 2 days of normoxia or intermittent hypoxia exposure; $n=4$ experiments per group with at least 3 wells/experiment. 4T1 proliferation was expressed as a % of normoxia values. $*p=0.03$, one-way ANOVA.

B. Representative illustrations of 4T1 cell migration, assessed by wound healing repair, before and after 2 days of normoxia or intermittent hypoxia exposure.

C. Wound healing repair, expressed as a % of repaired area, of 4T1 cells exposed to 4 days of normoxia or intermittent hypoxia. $n=4$ experiments per group with at least 3 wells/experiment. $*p=0.041$, one-way repeated measures ANOVA.

D. Wound healing repair, expressed as a % of normoxia values, of 4T1 cells exposed to 4 days of normoxia or intermittent hypoxia; $n=4$ experiments per group with at least 3 wells/experiment. $*p=0.05$ and $**p=0.01$, oneway ANOVA.

E. Representative illustrations of 4T1 spheroid expansion before and after 2 days of normoxia or intermittent hypoxia exposure.

F. 4T1 spheroid expansion in response to 3 days of normoxia or intermittent hypoxia; $n=3$ experiments per group with 6 to 12 wells/experiment. $*p<0.05$, repeated measures ANOVA. Post-hoc analysis showed significant differences ($*p<0.05$) at days 2, 2.5 and 3 of exposure.

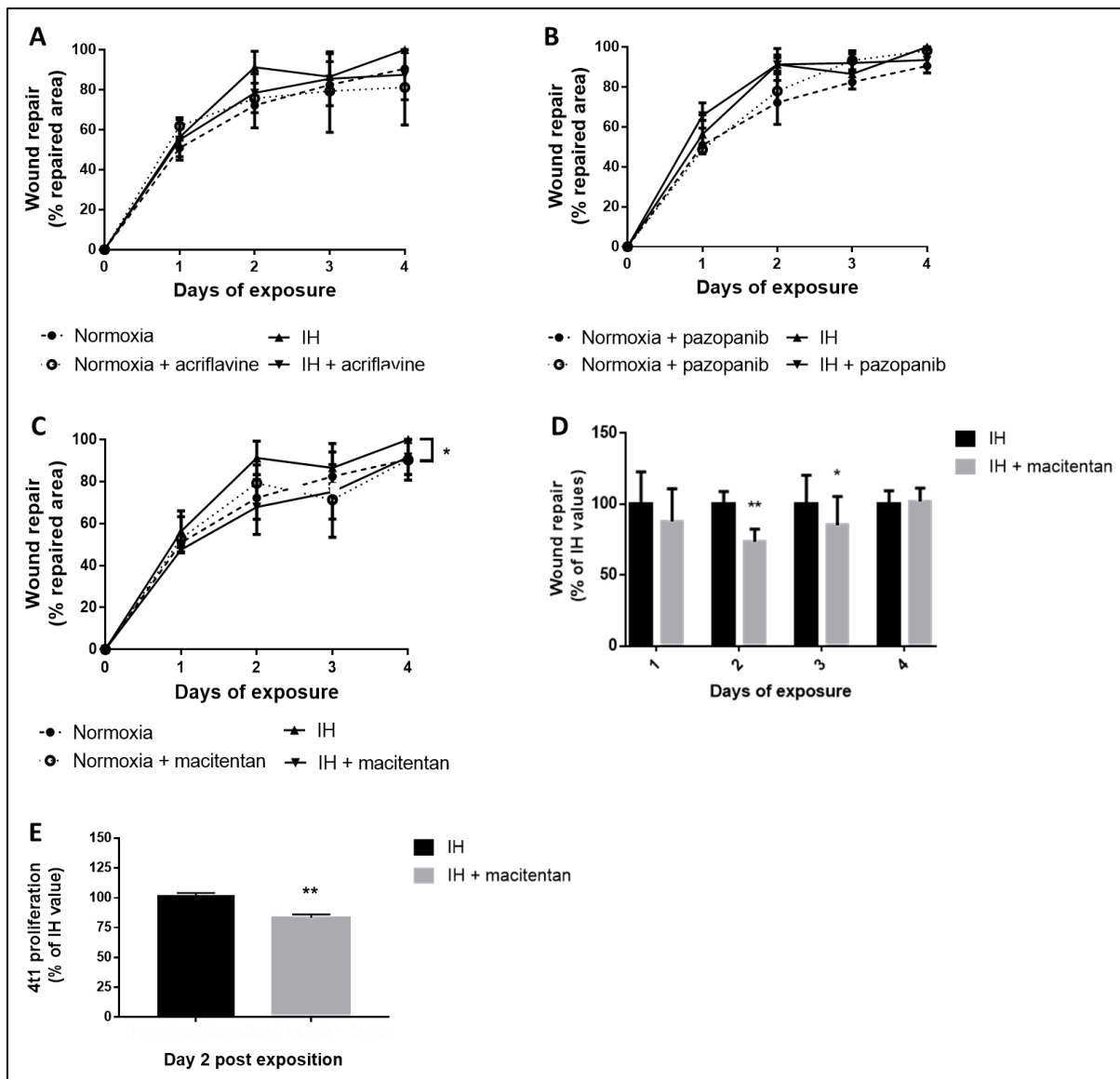


Figure 2. Non-selective endothelin receptor blockade prevents the increase in proliferation and migration induced by intermittent hypoxia in vitro.

4T1 cell wound healing was evaluated during 4 days of normoxia or intermittent hypoxia (IH) in the presence or absence of acriflavine (0.2 μ M), pazopanib (0.1 μ M) and macitentan (5 μ M). Wound repair was expressed as a % of repaired area; n=3 experiments per group with at least 3 wells per experiment.

The wound healing-promoting effect of intermittent hypoxia was not affected by acriflavine (A) or pazopanib (B) but was significantly reduced (**p=0.01, repeated measures ANOVA) by macitentan treatment (C).

D. Effects of intermittent hypoxia on wound healing of untreated and macitentan-treated 4T1 cells. Post-hoc analysis showed significant differences at days 2 and 3 of IH exposure. *p = 0.012 and **p = 0.001.

E. Effects of macitentan on proliferation, assessed by MTT staining and expressed as a % of IH values, of 4T1 cells exposed to 2 days of intermittent hypoxia; n=4 experiments, at least 3 wells/experiment. The proliferation-promoting effect of intermittent hypoxia was significantly reduced by macitentan treatment. **p<0.001, oneway ANOVA.

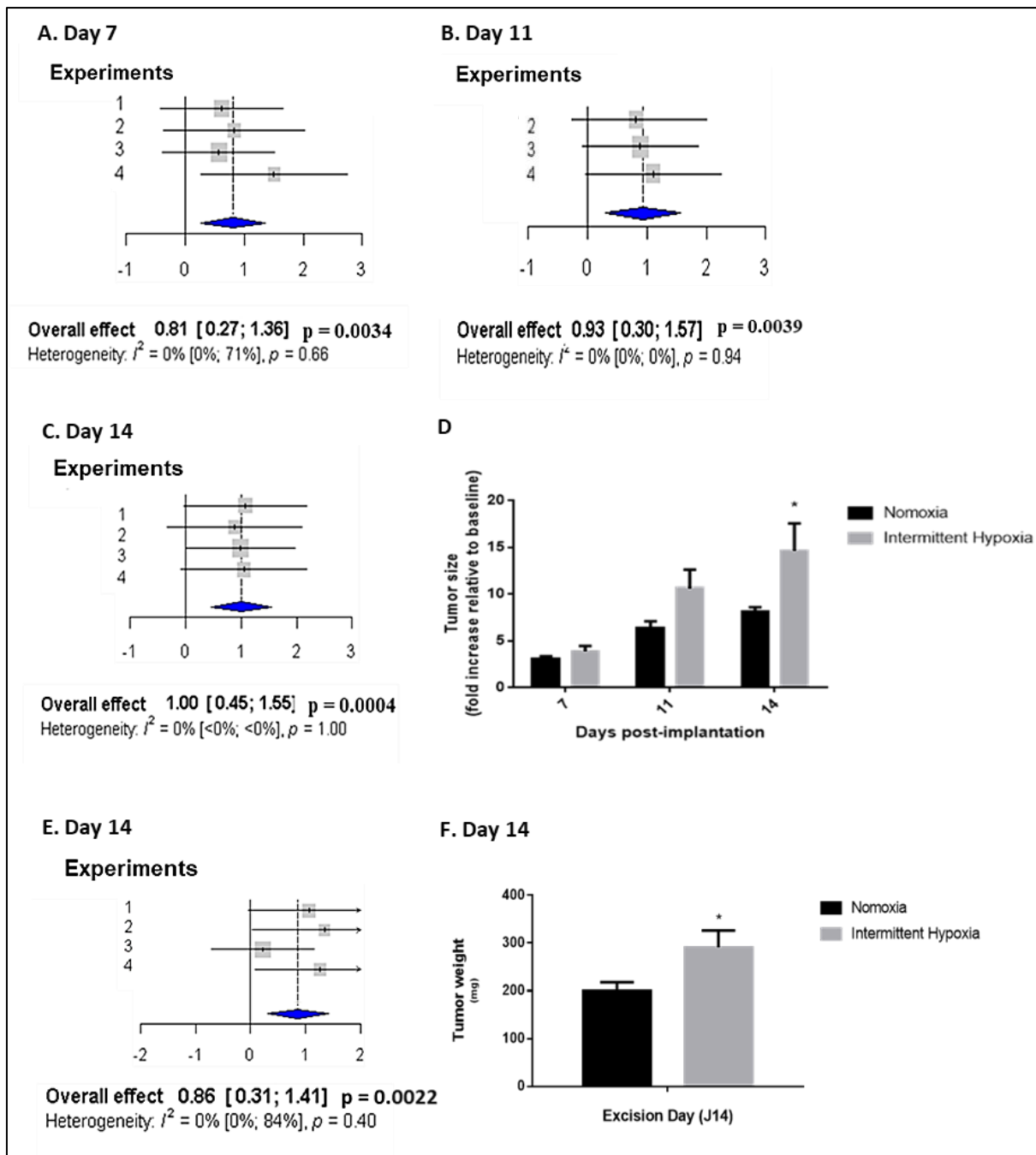


Figure 3. Intermittent hypoxia exposure enhances in vivo breast tumour growth.

Forest plots presenting weighted standard mean differences in the effects of normoxia (N) and intermittent hypoxia (IH) exposure on 4T1 cell tumour growth at days 7 (A), 11 (B) and 14 (C) following orthotopic mammary implantation and on tumour weight upon resection on day 14 (E). Based on four independent experiments ($n=57$ mice overall including 28 mice exposed to N and 29 mice exposed to IH). Tumour growth, estimated by caliper measurement, was significantly increased by IH exposure at days 7, 11, and 14 ($p=0.0034$, $p=0.0039$ and $p=0.0004$, respectively) and tumour weight was significantly increased at day 14 ($p=0.0022$).

D. Representative results from Experiment 3 showing the kinetics of 4T1 orthotopic breast tumour growth, expressed relative to baseline (3 days following implantation), in 18 mice (9 N and 9 IH; $p<0.05$).

F. Representative results from Experiment 2 showing 4T1 breast tumour weight after 14 days of N or IH exposure in 13 mice (6 N and 7 IH; $*p<0.05$).

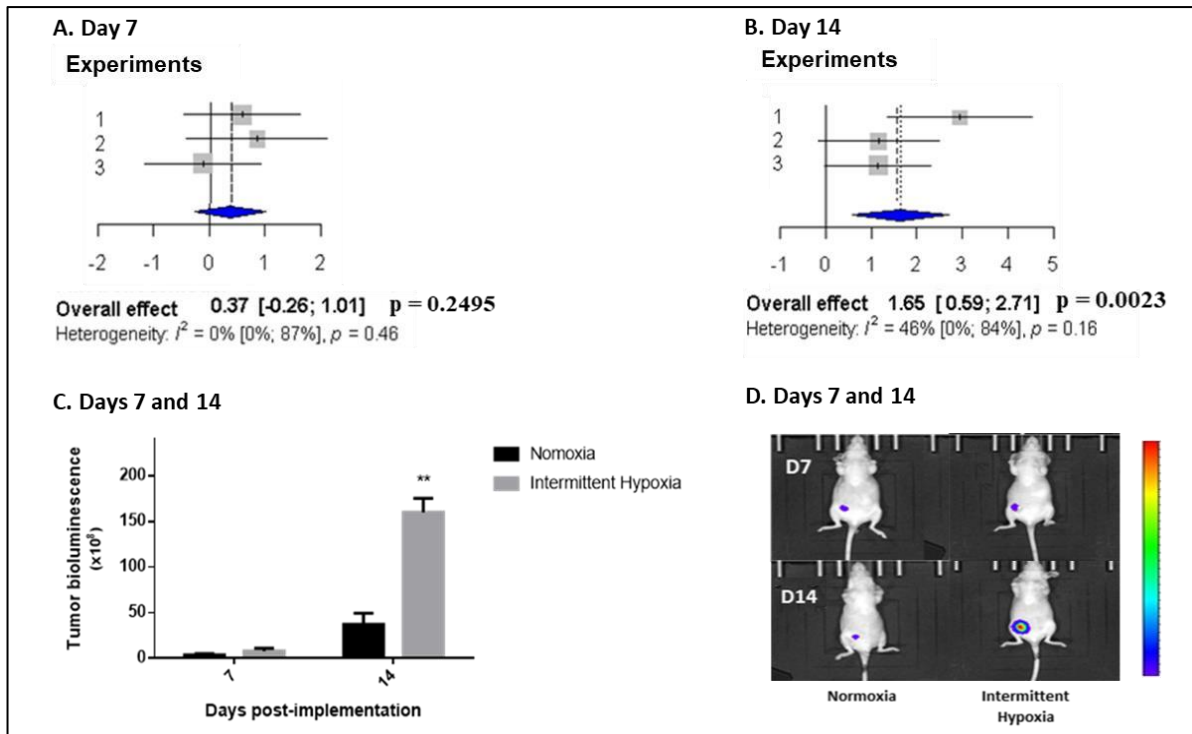


Figure 4: Intermittent hypoxia exposure increases breast tumour growth estimated by in vivo bioluminescence imaging.

Forest plots presenting weighted standard mean differences (SMD) in the effects of normoxia (N) or intermittent hypoxia (IH) on tumour growth, estimated by in vivo bioluminescence imaging at days 7 (A) and 14 (B) of exposure. Based on three independent experiments (39 mice overall including 19 mice exposed to N and 20 mice exposed to IH). Tumour growth was significantly increased by IH exposure at day 14 ($p = 0.0023$).

C. Representative results from Experiment 1 showing enhanced tumour bioluminescence after 14 days of IH exposure (** $p < 0.001$).

D. Representative bioluminescence images showing the enhancing effect of intermittent hypoxia exposure 7 and 14 days after concomitant orthotopic implantation.

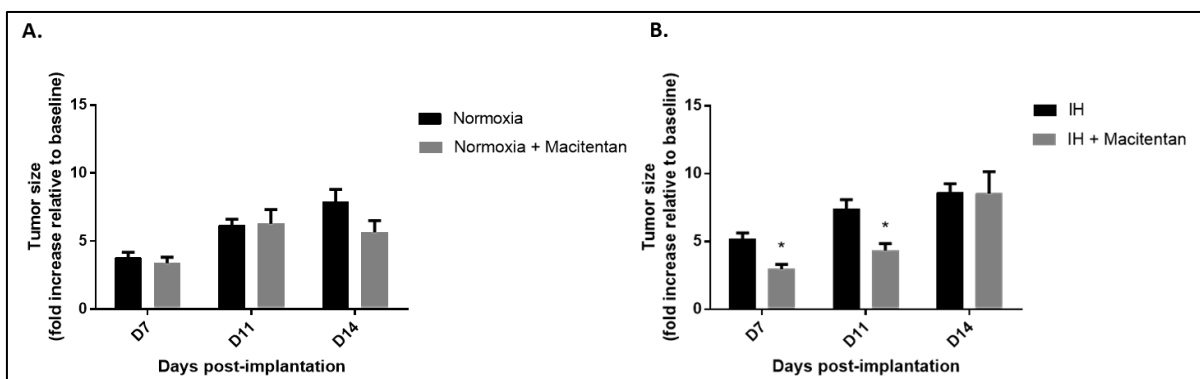


Figure 5. Effect of macitentan on in vivo tumour growth kinetics in response to 14 days of normoxia and intermittent hypoxia exposure.

The effects of macitentan on 4T1 orthotopic breast tumour growth, evaluated by caliper measurement and expressed as tumour volume relative to baseline (3 days following implantation), were evaluated at days 7, 11 and 14 of normoxia (N) or intermittent hypoxia (IH) exposure. Experiments were carried out on 4 groups (N, N + macitentan, IH, IH + macitentan) of mice ($n = 7$ /group). Macitentan treatment throughout exposure did not have

any significant effects in mice exposed to normoxia (A) while it significantly reduced tumour size on days 7 and 11 in IH-exposed mice (B). * $p < 0.01$, post-hoc analysis.

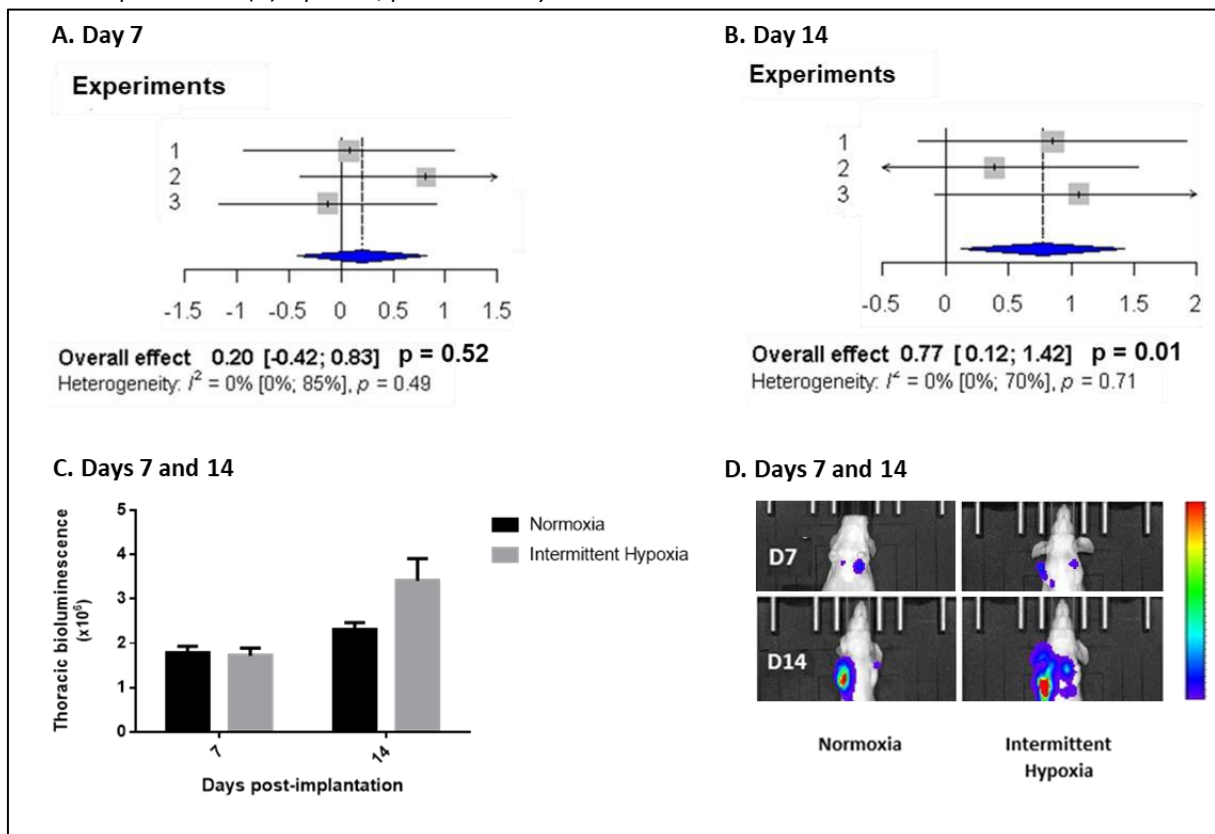


Figure 6: Intermittent hypoxia exposure increases metastatic thoracic invasion estimated by in vivo bioluminescence imaging.

Forest plots presenting weighted standard mean differences in the effects of normoxia (N) and intermittent hypoxia (IH) on thoracic invasion, estimated by bioluminescence imaging, at days 7 (A) and 14 (B) of exposure. Based on three independent experiments (39 mice overall including 19 mice exposed to N and 20 mice exposed to IH). Metastatic thoracic invasion was significantly increased by IH exposure at day 14 ($p = 0.01$).

C. Representative results from Experiment 3 showing that exposure to intermittent hypoxia strongly tended to increase ($p = 0.054$; post hoc analysis) thoracic bioluminescence at day 14.

D. Representative bioluminescence images showing the enhancing effect of intermittent hypoxia exposure 7 and 14 days after concomitant orthotopic implantation.

SUPPLEMENTARY METHODS AND DATA

Meta-analysis statistical method

We opted for meta-analysis method to avoid having to combine the results of independent studies in a single group or retain only certain results. Tumour size and tumour weight metaanalysis were performed from four independent experiments and were assessed respectively on days 7, 11 and 14 after tumour cell implantation. Tumour growth and thoracic

dissemination were performed from three independent experiments and differences were assessed at day 7 and day 14 after tumor cell implantation.

Continuous outcome data were analyzed with *metacont* function from the *meta* package (version 4.13-0), using standardized mean difference (SMD) to express the effect size in each experiment relative to variability observed:

$$SMD = \frac{(Mc - Me)}{SD}$$

Mc is the mean of the outcome measure in the control group, Me is the mean of the outcome measure in the experimental groups, and SD is the pooled standard deviation of the two groups. We used the Hedges' method to estimate the summary measure *g* (overall effect).

When data were expressed as effective (number of mice with positive thoracic invasion in IH and normoxia groups) we used the *escalc* function from the *metafor* package (version 2.4-0), using the (log) relative risk as outcome measures of effect size in each experiment. By convention, effect size of 0.2, 0.5, and 0.8 standard deviations are considered "small", "medium", and large" effect sizes respectively (Lipsey et al., 2001).

Homogeneous data were analyzed using fixed-effect models and heterogeneous data were analyzed using random effect size models. We considered data as heterogeneous when I^2 value was superior to 50%.

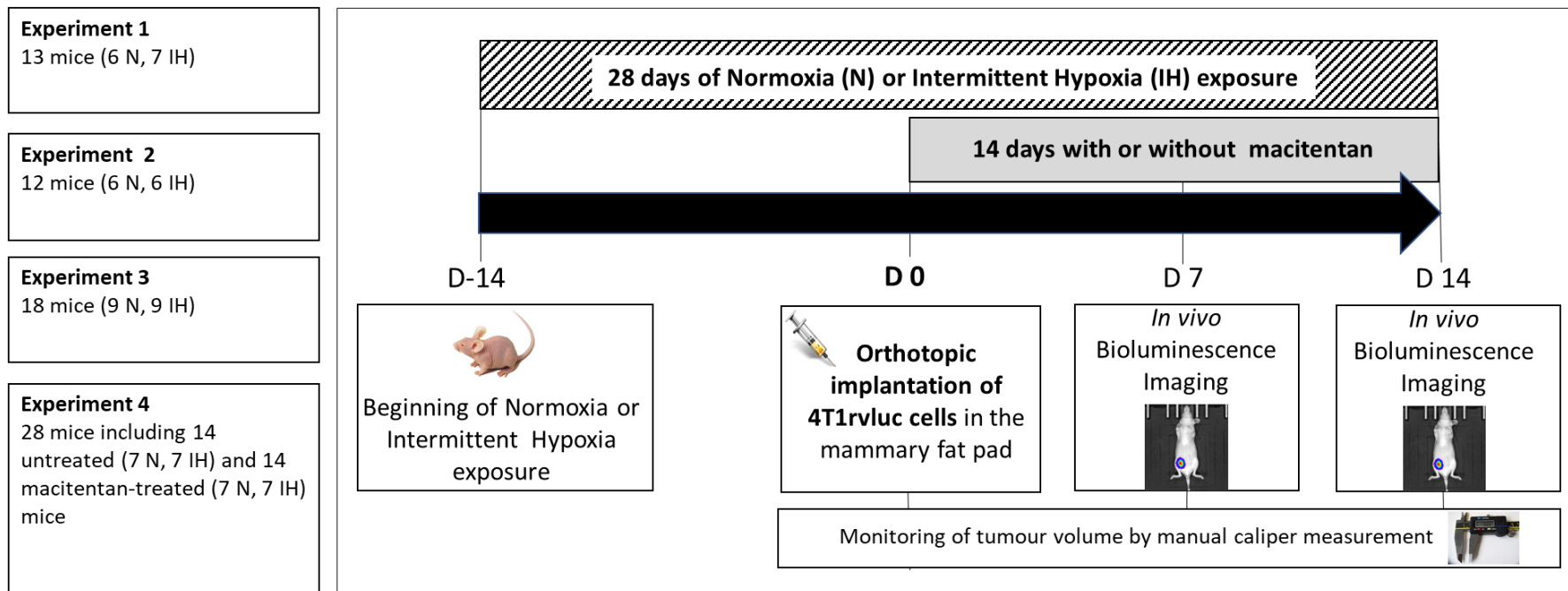


Figure S1. Experimental groups and experimental design.

Evaluation of the effect of intermittent hypoxia was repeated 4 times through 4 independent experiments. The effect of macitentan intermittent hypoxia was evaluated through one experiment.

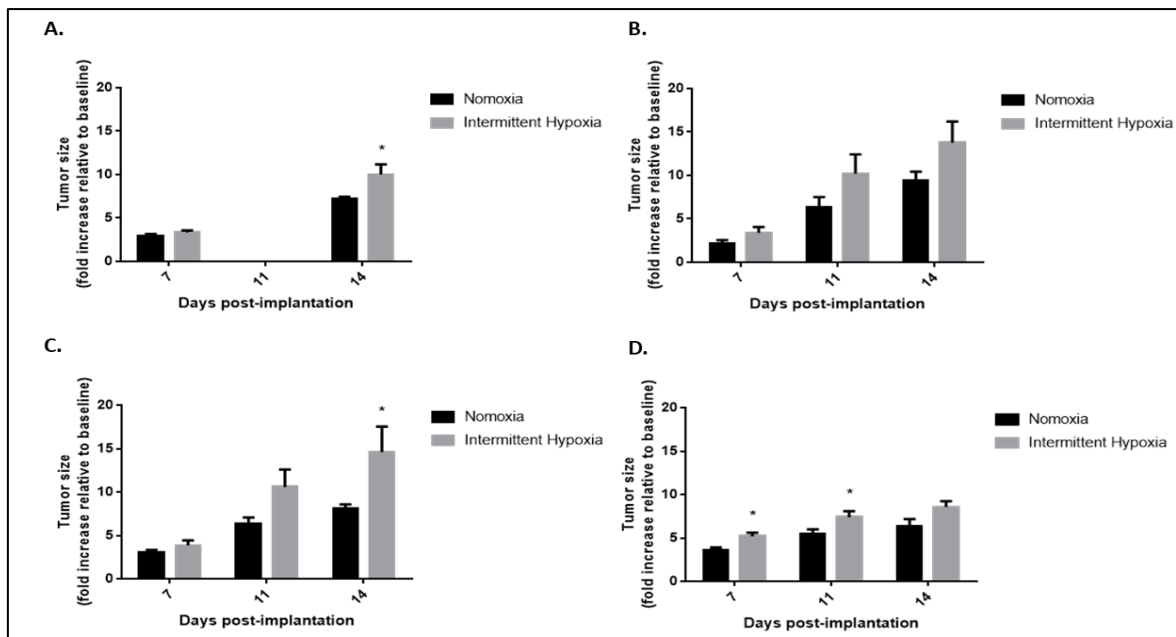


Figure S2. Effects of normoxia and intermittent hypoxia exposure on orthotopic breast tumour growth in 4 independent experiments.

Kinetics of 4T1 breast tumour growth were evaluated on days 7, 11 and 14 of exposure to normoxia (N) or intermittent hypoxia (IH) immediately after orthotopic implantation. Tumour size was assessed by repeated calliper measurements and expressed relative to baseline value (3 days following implantation).

The four experiments were performed on 13 (6 N and 7 IH; **A**), 12 (6 N and 6 IH; **B**), 18 (9 N and 9 IH; **C**) and 14 (7 N and 7 IH; **D**) mice, respectively. Significant effects of IH exposure were observed on day 14 in two experiments (* $p < 0.05$, **A** and **C**) and on days 7 and 11 in one experiment (* $p < 0.05$, **D**).

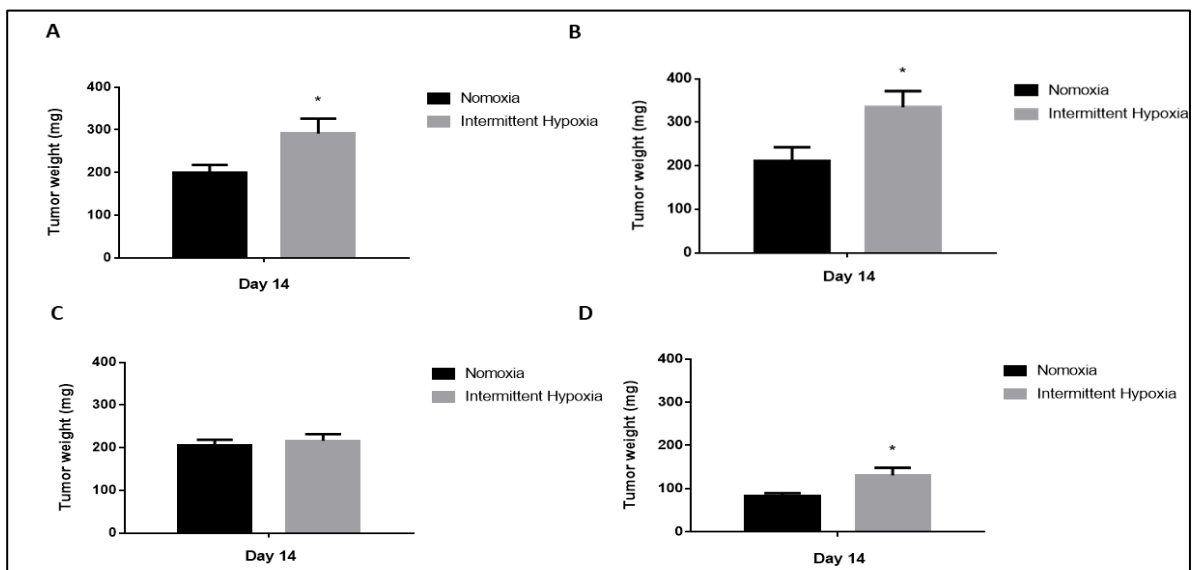


Figure S3. Effects of normoxia and intermittent hypoxia exposure on orthotopic breast tumour weight in 4 independent experiments.

4T1 breast tumours were excised and weighted on day 14 of normoxia (N) or intermittent hypoxia (IH) exposure. The four experiments were performed on 13 (6 N and 7 IH; **A**), 12 (6 N and 6 IH; **B**), 18 (9 N and 9 IH; **C**) and 14 (7 N and 7 IH; **D**) mice, respectively. Significant effects of IH exposure were observed in two experiments (* $p < 0.05$, **A**, **B** and **D**).

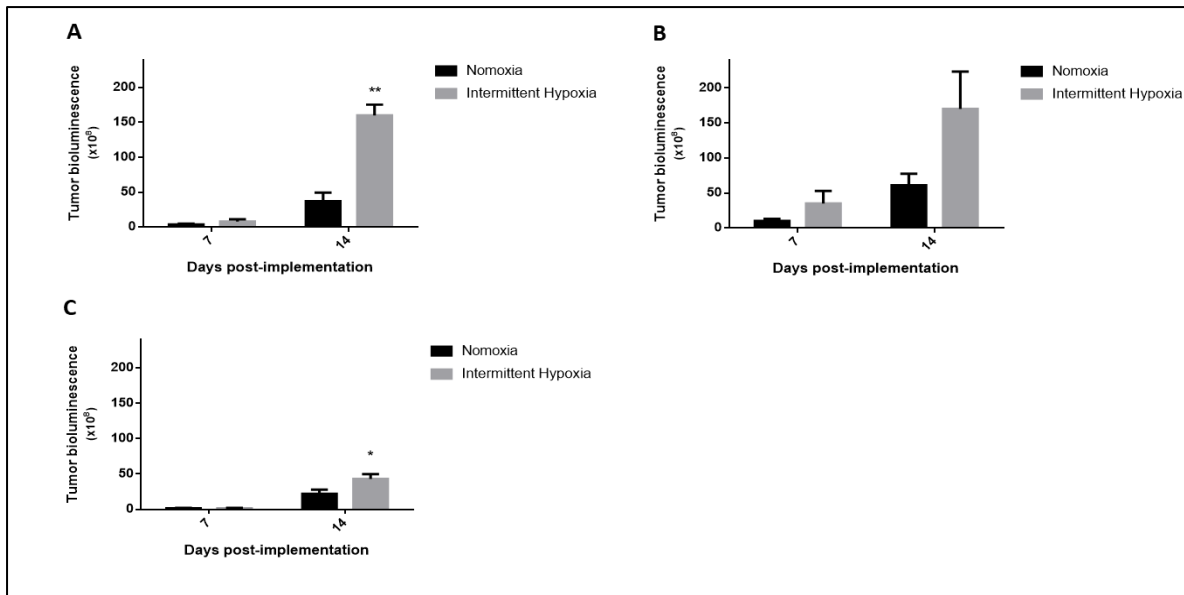


Figure S4. Effects of normoxia and intermittent hypoxia exposure on tumour growth estimated by in vivo bioluminescence imaging in 3 independent experiments.

4T1 breast tumour growth was estimated on days 7 and 14 of normoxia (N) or intermittent hypoxia (IH) exposure. The three experiments were carried out on 13 (6 N and 7 IH, **A**), 12 (6 N and 6 IH, **B**) and 14 (7 N and 7 IH, **C**) mice, respectively. The bioluminescence signal was significantly increased on day 14 in two experiments (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, **A** and **C**) and a strong tendency was seen in the other one ($p=0,064$, **B**).

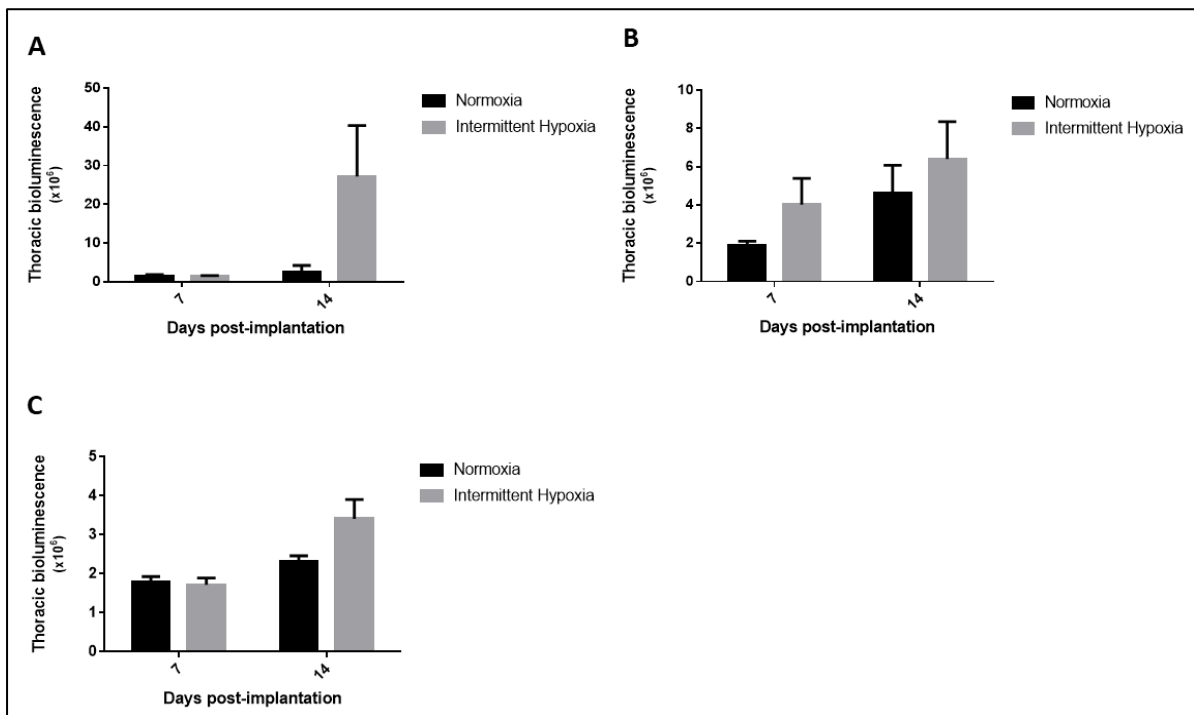


Figure S5. Effect of normoxia or intermittent hypoxia exposure on thoracic invasion estimated by bioluminescence.

Thoracic tumour invasion, estimated by bioluminescence imaging, was assessed in three independent experiments on 13 (6 N vs 7 HI, **A**), 12 (6 N vs 6 HI, **B**) and 14 (7 N vs 7 HI, **C**) mice, respectively.

No significant difference was observed between the effects of normoxia and intermittent hypoxia exposure at all time points, although a strong tendency was observed at day 14 in the second experiment ($p=0.054$, **C**).

III. Discussion

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé et le Centre International pour la Recherche sur le Cancer (CIRC), le cancer est devenu la 2^{nde} cause de mortalité dans le monde. En 2018 les données épidémiologiques faisaient état d'environ 18.1 millions de nouveaux cas et 9.6 millions de morts par cancer ce qui représenterait environ un décès sur six (Bray et al., 2018). Le CIRC estime qu'un homme sur cinq et une femme sur onze meurent de cette maladie, tandis que près de 44 millions de personnes vivaient avec un cancer dans le monde. Cette expansion du « *fardeau du cancer* » serait associée à la croissance démographique et au vieillissement ainsi qu'à l'évolution de la prévalence de facteurs associés au développement social et économique. Ceci est particulièrement vrai dans les économies à croissance rapide, où l'on observe une transition des cancers en lien avec la pauvreté et les conditions sanitaires vers des cancers associés aux modes de vie plus typiques des pays industrialisés (Bray et al., 2018). Malgré d'importants efforts de prévention qui ont conduit à une baisse de certains cancers comme celui du poumon chez les hommes dans les pays les plus développés (campagne contre le tabac) ou celui du col de l'utérus chez les femmes de la plupart des pays (campagne de vaccination à grande échelle), l'incidence globale mondiale du cancer reste en constante augmentation. Les cancers du poumon, du sein (chez la femme) et du côlon-rectum sont les plus incidents et se classent parmi les cinq premiers en termes de mortalité. Ainsi, chez la femme, la survenue d'un cancer du sein concernerait plus de 2.1 millions de patientes par an soit près de 11.6% de l'incidence totale mondiale et conduirait, selon les estimations, à près de 627 000 décès soit 6.6% du total. Bien que le pronostic soit relativement favorable dans les pays développés, le cancer du sein se classe en 5^{ième} position des cancers les plus meurtriers en nombre total de décès. Aussi, pour lutter contre ce « *fardeau* » il est indispensable d'identifier les populations à risque ainsi que les facteurs de prédisposition.

Parmi les différents facteurs de risque de développement du cancer du sein, une étude publiée en 2012 par une équipe espagnole dirigée par le Pr. Farré a montré que les patients présentant un syndrome d'apnée du sommeil avaient un risque de mortalité par cancer plus élevé par rapport à la population générale, et ce pour tous types de cancers confondus (Nieto et al., 2012). Ce travail n'a cependant pas mis en évidence de surmortalité spécifique liée au cancer du sein. En revanche en analysant les données de l'assurance maladie taïwanaise, plusieurs équipes ont observé une incidence augmentée du cancer du sein chez les patientes souffrant d'un SAOS (Chang et al., 2014; Fang et al., 2015). Depuis, cette association entre SAOS et incidence du cancer du sein a été confirmée à plusieurs reprises (Sillah et al., 2018; Brenner et al., 2019; Choi et al., 2019; Gao et al., 2020).

Dans ce travail de thèse nous nous sommes intéressés aux effets de l'hypoxie intermittente, la composante la plus délétère du SAOS, sur le développement tumoral à travers deux modèles précliniques de cancer du sein, le premier *in vitro* et le second *in vivo*. Il s'agit, à notre connaissance, de la première étude qui combine des protocoles sur modèles animal et cellulaire dans le but d'explorer les répercussions à différentes échelles de l'HI dans le contexte particulier du cancer du sein et de son pouvoir métastatique. Cette approche mixte a été rendue possible grâce à la mise au point du dispositif *in vitro* détaillé plus haut qui permet d'exposer des cultures de cellules à des cycles répétés d'hypoxie-réoxygénation qui reflètent l'HI induite par le SAOS (Minoves et al., 2017)

Le principal résultat dans ce projet de recherche préclinique est la démonstration que l'exposition chronique à des cycles d'hypoxie intermittente entraîne une accélération de la croissance et de l'invasion tumorale. Cette démonstration nous semble solide dans la mesure où nous avons mené des expériences *in vivo* avec plusieurs critères de jugement de croissance

tumorale (volume, prolifération et poids) mesurés par différentes techniques, que nous avons complété par des expériences cellulaires mécanistiques.

L'exposition à l'hypoxie intermittente induit une augmentation de la croissance tumorale Le principal résultat de cette étude montre que les souris exposées pendant 4 semaines à des séquences répétées d'hypoxie intermittente quotidiennes présentent une croissance tumorale accélérée pendant la phase d'exposition ainsi qu'une masse tumorale plus importante après excision de la tumeur mammaire primaire. Cet effet de l'HI sur la croissance tumorale a été évalué par trois méthodes complémentaires : la mesure au pied à coulisse, l'imagerie par bioluminescence et la pesée post-excisionnelle. Cette approche a été proposée pour s'affranchir en partie des limites de chaque technique et ainsi conclure objectivement sur l'existence d'un effet délétère de l'HI avec un plus fort niveau de preuves. En l'occurrence, quel que soit la méthode de suivi pendant l'exposition au stimulus hypoxique (pied à coulisse et bioluminescence), nous avons mesuré une croissance plus importante chez les souris exposées à l'HI par rapport aux animaux exposés à la normoxie. L'effet maximal a été mesuré 14 jours après l'implantation mais des différences étaient déjà observées après une semaine d'exposition. Cette cinétique accélérée de croissance tumorale a été confirmée par une masse tumorale post-excisionnelle plus élevée chez ces mêmes animaux.

Ces résultats obtenus sur notre modèle murin de xénogreffe mammaire orthotopique sont concordants avec les analyses réalisées sur des modèles cellulaires avec les mêmes cellules tumorales. Nous avons montré que l'effet protumoral de l'HI observé *in vivo* était retrouvé sur notre modèle *in vitro*. Nous avons ainsi mesuré une prolifération et une migration augmentée lorsque les cellules ont été exposées à des cycles répétés d'hypoxie-normoxie. Que ce soit sur les tests de prolifération (MTT) ou les tests de migration/prolifération (« wound healing »), les

cellules exposées à l'HI ont montré des capacités prolifératives et migratoires supérieures à celles exposées en normoxie. Cependant ces expériences de « wound healing » ne permettent pas de distinguer la part de prolifération et la part de migration dans les effets observés de l'HI sur la croissance et la dissémination tumorale. Des expériences complémentaires de type "transwell migration assay" (Justus et al., 2014) qui évaluent spécifiquement la capacité de migration des cellules tumorales à travers une matrice extracellulaire pourront être menées dans chacune des conditions d'exposition afin de conclure sur ce point. Avec le modèle de sphéroïde 3D qui présente l'intérêt de laisser les cellules tumorales interagir entre elles dans toutes les dimensions à l'instar de ce qui se passe au cours du développement tumoral *in vivo*, nous avons mesuré une expansion supérieure des sphéroïdes exposées à l'HI. Dans ce type de modèle 3D, l'expansion est communément associée à une migration et à une prolifération cellulaire mais elle peut également faire intervenir une survie cellulaire et une organisation tissulaire anarchique (Pampaloni et al., 2007; Weiswald et al., 2015).

En sommes, les résultats expérimentaux obtenus sur modèles cellulaires viennent compléter les observations obtenues sur le modèle animal. Nous disposons ainsi d'un faisceau cohérent de preuves qui démontre un effet délétère de l'exposition à l'hypoxie intermittente sur le développement tumoral du cancer du sein et que cet effet semble s'expliquer par une prolifération, une migration et une expansion accrues des cellules tumorales dans cet environnement hypoxique. Nos observations concordent avec les données déjà publiées sur les modèles de cancer du poumon ou de mélanome (Almendros et al., 2012 b; a; Yoon et al., 2017), bien que les procédures d'HI utilisées puissent différer et que la plupart de ces études n'utilisent que le poids de la tumeur comme critère d'analyse principal, ce qui peut représenter une limite majeure comme nous le verrons par la suite. Une autre différence fondamentale entre nos résultats et ceux des autres études qui ont montré un effet délétère

de l'HI dans le cancer vient du choix du modèle, et plus précisément du choix de la taille des tumeurs utilisées. En effet, dans la majorité des études publiées le volume et le poids des tumeurs étaient bien supérieurs à la limite des 5% du poids de l'animal imposée par les comités d'éthique pour l'expérimentation animale en France (Rapport Puget, 2002), et par conséquent bien au-delà des proportions que l'on peut mesurer chez l'homme. Il est important d'ajouter que de telles tailles tumorales (> 5% du poids total) reflètent davantage un stade avancé de développement tumoral. De notre côté, notre modèle nous a permis d'observer des différences entre l'exposition à l'HI et la normoxie pour des volumes plus faibles, ce que l'on peut assimiler à un stade plus précoce de développement. Autrement dit nos résultats viennent à la fois confirmer l'impact de l'HI sur la croissance tumorale déjà montré par d'autres équipes, mais montre aussi que cette différence peut s'exprimer plus précocement.

L'exposition à l'hypoxie intermittente favorise la dissémination tumorale

La migration cellulaire est une propriété essentielle des cellules pour le développement tissulaire et l'organogénèse, mais elle devient marqueur de mauvais pronostic lorsqu'il s'agit de cellules cancéreuses (Carmeliet et al., 2000). Pour suivre la dissémination de la tumeur, nous avons analysé le signal de bioluminescence thoracique des souris et nous avons également estimé le risque relatif d'avoir une invasion thoracique selon les conditions d'exposition.

Dans notre étude, les souris exposées à l'HI présentent un signal de bioluminescence thoracique plus intense que les souris du groupe normoxique, ce qui signifie que davantage de cellules tumorales ont disséminé chez les premières par rapport aux secondes. Cette différence entre les deux groupes n'a pas été retrouvée lorsque nous avons estimé le risque

relatif d'avoir une invasion thoracique, calculé à partir du nombre de souris présentant ou non une invasion thoracique dans chaque groupe. Cette absence de différence statistique n'est pas surprenante puisque plus de la moitié des souris issues des deux groupes présentaient déjà une invasion thoracique au 7^e jour. Cette invasion précoce, indépendante des conditions d'oxygénation traduit un fort pouvoir de dissémination des cellules tumorales dans notre modèle. Selon nos résultats il n'y a donc pas plus de risque de voir des cellules tumorales s'échapper du foyer primaire chez les animaux exposés à l'HI, en revanche cette dissémination est plus importante d'un point de vue quantitatif. Il y a donc bien un risque augmenté de développer un foyer secondaire chez ces animaux.

Cette dissémination accrue en condition d'HI est conforme à l'hypothèse d'un phénotype métastatique induit par l'HI, qui a été étudiée par Almendros dans deux modèles de métastases pulmonaires de mélanome. Il a notamment montré que l'hypoxie intermittente intensifiait l'ensemble du processus de dissémination pulmonaire (Almendros et al., 2013). Une augmentation du pouvoir métastatique consécutif à l'HI a également été mise en évidence dans le cancer du sein par Chen et al (Chen et al., 2018). Dans leurs travaux, ils mettent en évidence des changements génétiques, moléculaires, biochimiques et cellulaires qui facilitent la survie des cellules tumorales, la colonisation et la constitution d'un microenvironnement favorable à la croissance métastatique (A. Chen et al. 2018). En outre, la survie et la dissémination des tumeurs dépendent étroitement de l'interaction des cellules tumorales avec le microenvironnement. Sous la pression d'une hypoxie intermittente, les cellules tumorales semblent donc capables de développer des mécanismes adaptatifs pour continuer à croître et à se propager. Parmi les diverses voies cellulaires potentiellement impactées, nous nous sommes concentrés sur le facteur HIF-1 et ses gènes cibles codant pour le facteur ET-1 et le VEGF.

Le blocage de la voie ET-1 ralentit l'effet de l'HI sur la croissance tumorale

Avant d'explorer la voie HIF-1/ET-1/VEGF sur le modèle animal nous avons commencé par traiter des cellules 4T1, exposées ou non à l'HI, avec trois inhibiteurs différents : acriflavine, pazopanib et macitentan dirigés respectivement contre HIF-1, VEGF et ET-1. L'inhibition de HIF-1 et du VEGF pendant l'exposition à l'HI n'a eu aucun effet sur la croissance tumorale. Ceci signifie que le blocage de ces deux facteurs respectifs n'était pas suffisant pour ralentir la prolifération et la migration induites par l'hypoxie. Ceci peut s'expliquer par la présence de mécanismes compensatoires indépendants, ou partiellement indépendants, de la voie HIF-1. En revanche, le traitement par macitentan, un antagoniste mixte des récepteurs à l'endothéline a contribué à limiter l'effet délétère de l'HI observé sur la prolifération et sur la migration des cellules tumorales. Pour confirmer cette implication de la voie ET-1 nous avons traité des animaux, exposés ou non à l'HI, avec du macitentan. Les résultats ont été confirmés chez l'animal avec une diminution de la croissance des tumeurs observée chez les souris traitées et exposées à l'HI.

Par ailleurs, il est remarquable qu'en condition de normoxie nous n'avons mesuré aucun effet du blocage des récepteurs ET-1 que ce soit sur la prolifération / migration des cellules *in vitro* ou sur la croissance tumorale sur le modèle animal. Ce résultat n'est pas cohérent avec l'hypothèse du « microenvironnement » avancée depuis plusieurs années et selon laquelle la voie ET-1 serait activée par l'hypoxie chronique qui règne au cœur de la masse tumorale et contribuerait aux pouvoirs prolifératifs et métastatiques tumoraux. Brièvement, l'une des équipes de référence dans la recherche du lien entre endothéline 1 et développement tumoral est celle d'Anna Bagnato et Laura Rosano. Cette équipe, pionnière dans le domaine, a publié des travaux montrant que la voie de l'ET-1 peut s'activer et participer à la croissance tumorale sous l'effet de l'hypoxie chronique intra-tumorale (Bagnato et al., 2002). Les deux chercheuses

italiennes avancent que sous la pression de l'hypoxie, voire de l'anoxie, nucléaire les cellules répondraient par une stabilisation du facteur HIF-1 alpha ce qui pourrait conduire à une surexpression de l'endothéline 1. Cette ET-1 participerait ensuite à favoriser le développement et la dissémination tumorale par une action autocrine et paracrine (Bagnato et al., 2008 b; Rosanò et al., 2013). D'autres équipes ont confirmé cette implication de la voie de l'endothéline sur la survie, l'invasion mais également dans l'angiogenèse, la transition épithélio-mésenchymateuse ou encore la modulation immunitaire (Zhao et al., 2011; Semprucci et al., 2016). Par la suite, plusieurs travaux ont montré que la réponse au blocage de la voie ET-1 pouvait dépendre des récepteurs cibles. Il a ainsi été démontré que l'utilisation d'un antagoniste mixte des récepteurs A et B présentait de meilleurs résultats que le blocage sélectif de l'un ou l'autre (Kim et al., 2012). Toujours selon Rosano et Bagnato, l'utilisation d'un antagoniste mixte des récepteurs présenterait l'intérêt d'associer à la fois une réduction des capacités invasives des cellules tumorales par une action sur ETAR et un renforcement des mécanismes immunitaires antitumoraux via ETBR (Rosanò et al., 2014, 2016).

Toutefois, cette différence de réponse au blocage de la voie ET-1 entre l'hypoxie intermittente et la normoxie n'est pas incompatible avec notre hypothèse du macroenvironnement. En effet, nous pensons que chez les animaux exposés à la normoxie les tumeurs n'ont pas encore développé une hypoxie continue et soutenue en leur sein car elles seraient encore à un stade précoce de développement. En l'absence d'hypoxie chronique, la voie de ET-1 ne serait tout simplement pas encore activée de manière significative ce qui rendrait le blocage de la voie inefficace. Tandis qu'en condition d'HI, le stimulus hypoxique étant par définition systémique il pourrait y avoir une circulation d'ET-1 en périphérie de la tumeur qui soit consécutive à une activation de la voie HIF-1/ET-1 au niveau des tissus sains du macroenvironnement et peut être aussi du microenvironnement. Ainsi, dans notre modèle de tumeur précoce, le

macitentan serait efficace uniquement en condition d'hypoxie intermittente car la voie ET-1 y serait davantage stimulée par les tissus sains périphériques que par les tissus tumoraux. Autrement-dit cette réponse différente en condition d'HI pourrait être liée au fait que par son caractère systémique l'HI serait un stimulus suffisamment puissant pour activer les voies de réponse à l'hypoxie au niveau des tissus sains ce qui aurait une répercussion sur le développement tumoral à un stade précoce de la maladie. Nous pouvons imaginer qu'en réalisant une étude similaire mais à un stade plus avancé du développement, les tumeurs exprimeraient mieux la voie HIF-1/ET-1 ce qui les rendrait sensible au macitentan même en condition de normoxie.

Des analyses cellulaires et tissulaires tumorales complémentaires, actuellement en cours, devraient nous permettre d'évaluer l'implication de la cascade de signalisation HIF1/VEGF/ET-1 en condition d'hypoxie intermittente à la fois dans la tumeur mais aussi au niveau systémique. Ainsi, des extraits des tumeurs mammaires prélevées lors des expérimentations animales et des extraits cellulaires issus de nos cultures cellulaires font l'objet d'analyses biochimiques et biomoléculaires. Les principales évaluations portent sur l'expression cellulaire génique de HIF-1/ET-1 /VEGF par Q-PCR et sur leurs expressions protéiques respectives par western blot et ELISA. D'autres analyses immunohistologiques sur coupes tissulaires tumorales sont également en cours pour confirmer les analyses biologiques mais aussi pour mettre en évidence les facteurs Ki67 (prolifération tumorale) et CD31 (vascularisation) ou encore le stress oxydatif par fluorescence au dihydroéthidium.

Hypoxie chronique, hypoxie cyclique et hypoxie intermittente

Nous pensons que l'absence de réponse du blocage de la voie ET-1 *in vivo* en condition de normoxie ne signifie pas une absence d'hypoxie au niveau tumoral mais seulement que cette hypoxie n'est pas suffisante pour activer la voie ET-1. En effet, il est parfaitement connu que pour les tumeurs solides l'hypoxie est un phénomène très hétérogène à la fois dans le temps et dans l'espace mais qu'il existe à tous les stades tumoraux même dans les phases précoces (Zhang et al., 2016). Par conséquent, il est important de reconnaître que notre étude n'avait pas pour objectif d'explorer les répercussions de l'hypoxie intermittente sur l'oxygénation des régions déjà hypoxiques d'une tumeur. En effet, il est plus que probable que l'HI interfère avec l'hypoxie continue au niveau tumoral et que cette interférence puisse se traduire par une modification du comportement tumoral. L'étude des effets respectifs de l'hypoxie chronique, de l'hypoxie cyclique et de l'hypoxie intermittente dans chacune de ces situations est très difficile à réaliser et il est d'autant plus difficile de proposer un modèle préclinique intégratif unique. Nous verrons tout de même que notre modèle actuel pourrait faire l'objet d'améliorations permettant de mieux appréhender cette question de la superposition de phénomènes hypoxiques très différents, notamment en se dotant d'outils permettant de mesurer l'oxygénation comme la photoacoustique.

Avantages et limites du modèle

Ce travail de recherche a été rendu possible grâce à une plateforme multimodale d'exposition à l'hypoxie intermittente, la plateforme « HYPE », qui combine un dispositif cellulaire, un dispositif animal ainsi qu'un dispositif clinique (non utilisé ici). Comme nous l'avons vu, le dispositif cellulaire permet des modifications très rapides de la pO_2 du milieu de culture et de générer des cycles d'hypoxie intermittente courts (pO_2 oscillant entre 118 et 34 mmHg toutes

les 2 minutes, ou entre 120 et 25 mmHg toutes les 5 minutes). Toutes les valeurs intermédiaires entre 150 mmHg (air pur) et 25 mmHg peuvent être obtenues. La gamme de pO_2 que nous sommes capables de produire est donc relativement large, pour autant elle ne l'est pas encore suffisamment si l'on en croit certaines publications sur les taux d'oxygénation retrouvés au sein des tumeurs mammaires. Ce point, déjà discuté plus haut dans ce manuscrit, est une limite importante de notre modèle. En particulier, il est probable que pour aller plus loin dans les études *in vitro* il soit nécessaire d'abaisser le seuil minimal de pO_2 au moins autour de 15 mmHg (2% O_2) pour se mettre dans les conditions du réel.

Toujours à propos du modèle cellulaire, bien que nous ayons pris le parti de travailler sur deux modèles de cellules, à savoir un modèle 2D classique et un modèle de sphéroïdes, nous n'avons finalement eu recours qu'à des cultures monocellulaires de cellules tumorales 4T1. Or ces modèles ne sont, par définition, pas capables de produire des interactions complexes entre les cellules ou une structure complexe telle que la vascularisation. Dans la mesure où nous supposons que l'angiogenèse est l'un des processus les plus impacté par l'hypoxie intermittente et la voie ET-1, de futures expériences avec plusieurs types cellulaires seraient souhaitables. Ainsi nous envisageons des cultures mixtes avec des cellules endothéliales. Récemment, Oh et al. ont développé un système de coculture tridimensionnelle à deux couches pour étudier les interactions entre des cellules cancéreuses et des cellules endothéliales (Oh et al. 2020). De nombreuses autres approches modernes existent, telles que l'impression 3D (Reid et al. 2019), le 3D Matrigel (Cavo et al. 2018), les modèles de tumeurs microfluidiques (Truong et al. 2019) ou les modèles organoïdes (Walsh et al. 2016). D'autres plateformes de cultures 3D ont également été proposées pour recréer certains aspects des microenvironnements tumoraux présents dans le cancer du sein (Bhattacharya et al., 2020).

Au niveau du choix d'un modèle de souris immunodéficientes NMRI-nu, ces souris sont particulièrement bien adaptées pour le suivi de la croissance tumorale, notamment parce qu'elles sont glabres ce qui facilite la mesure de taille tumorale et l'utilisation de la bioluminescence.

Enfin, à propos des méthodes utilisées pour la mesure des critères tumoraux : volume, prolifération et poids tumoral, nous avons eu recours à des méthodes non invasives particulièrement bien adaptées au suivi longitudinal *in situ* de la croissance tumorale. Dans les modèles précliniques en oncologie, le suivi temporel de l'évolution du volume de la tumeur après une xélogreffe orthotopique est souvent réalisé à partir de mesures manuelles au pied à coulisse. Cette méthode est appréciée pour son faible coût, sa rapidité d'exécution et son caractère non invasif mais les mesures sont affectées par la présence d'épiderme ou du tissu adipeux et l'estimation du volume ne prend généralement pas en compte la dimension sur l'axe z (Tomayko et al., 1989). En outre, la technique n'est évidemment pas applicable pour évaluer la dissémination métastatique (Suggitt et al., 2005). Dans notre protocole nous avons eu recours à cette méthode manuelle indirecte du pied à coulisse, mais pour apporter une preuve supplémentaire, et/ou complémentaire, de l'effet de l'HI sur la croissance des tumeurs, nous avons renforcé notre suivi par de l'imagerie par bioluminescence. Cette technique d'imagerie, utilisée depuis plusieurs années en oncologie (Josserand et al., 2007) est basée sur l'analyse d'un signal de bioluminescence émis par les cellules tumorales génétiquement modifiées. Ces cellules ont été (re)programmées pour exprimer une enzyme luciférase capable de produire un signal lumineux après administration de son substrat, la luciférine (Gould Stephen J. et al., 1988). La quantification *in vivo* en temps réel du signal permet alors de suivre la prolifération et le pouvoir de dissémination des cellules marquées par la luciférase (Lyons, 2005). La méthode présente en outre l'avantage de détecter les

micrométastases ce qui en fait un outil utilisé à la fois pour le suivi du foyer primaire et pour l'invasion secondaire (Troy et al., 2004). La bioluminescence présente toutefois quelques limites, notamment l'absence de corrélation linéaire entre la quantité de signal mesurée et le volume tumoral dès lors que le degré de nécrose tumoral augmente (Jurczok et al., 2008). En effet, pour être activée la luciférase requiert de l'énergie sous forme d'ATP et d'oxygène, par conséquent plus la nécrose se développe et moins la corrélation entre signal émis et volume tumoral sera linéaire (Gould Stephen J. et al., 1988). Pied à coulisse et imagerie de bioluminescence sont des techniques indirectes et non-invasives efficaces pour comparer des cinétiques de croissance et leur combinaison apporte un niveau de preuve supérieur à ce qu'elles apportent individuellement. En revanche elles ne donnent aucune information directe, pour cela il faut peser la masse tumorale après excision, ce que nous avons fait. La pesée des tumeurs a permis de confirmer la différence observée entre les groupes exposés à l'HI et les groupes non exposés.

Une approche méta-analytique pour un meilleur niveau de preuve

Afin d'améliorer le niveau de preuve de nos résultats, nous avons choisi de répéter notre protocole expérimental *in vivo*. Ainsi, les résultats que nous avons présentés ne sont pas issus d'une seule étude mais de plusieurs études indépendantes ce qui nous a permis de réaliser une analyse statistique de type méta-analytique. Nous avons emprunté cette méthode d'analyse au domaine de la recherche clinique et l'avons adapté à notre contexte pré-clinique. L'avantage principal est qu'en traitant les résultats individuels des différentes études répétées nous augmentons le niveau de preuve de notre étude. Cette approche nous a permis de présenter et d'analyser tous les résultats des études réalisées au lieu d'en sélectionner

certaines ou encore de prendre la liberté de regrouper certains résultats issus d'expériences différentes, ce qui est la plupart du temps un procédé contestable en recherche scientifique.

RESULTATS PRELIMINAIRES ET PERSPECTIVES

A. Hypoxie intermittente, hypoxie cyclique et hypoxie continue

Vouloir étudier les répercussions de l'hypoxie intermittente associée au syndrome d'apnées obstructives du sommeil sur le développement tumoral c'est d'une certaine manière se poser la question des conséquences de l'interférence entre un macroenvironnement hypoxique par intermittence et un microenvironnement tumoral soumis à une hypoxie locale plus ou moins marquée dans le temps et dans l'espace. L'exploration des effets propres de l'hypoxie intermittente systémique et de l'hypoxie continue locale sur le développement de tumeur a déjà été posée par Hunyor et al. dans une revue publiée récemment. Dans son article l'auteur explique très bien qu'il est particulièrement difficile de faire la distinction entre les conséquences de ces deux formes très différentes d'hypoxie (Hunyor et al., 2018). Pour comprendre la difficulté d'explorer les effets de l'HI sur une tumeur, il faut d'abord savoir que le terme « Hypoxie Intermittente » a été proposé pour la première fois en 1987, pour décrire des fluctuations importantes du flux sanguin au niveau tumoral (Chaplin et al., 1987), et que ce terme n'avait aucun lien avec le SAOS. Progressivement cette expression a été remplacée par la formule « Hypoxie Cyclique » notamment pour signifier le caractère récurrent de cette hypoxie fluctuante. Depuis de nombreuses études se sont intéressées aux effets de ces séquences d'oxygénation/réoxygénation sur les principaux marqueurs de la progression tumorale : angiogenèse, prolifération, invasion, etc. (Saxena et al., 2019).

Lorsqu'une tumeur se développe dans un macroenvironnement normoxique (hors contexte du SAOS), celle-ci va potentiellement subir deux formes d'hypoxie : une hypoxie continue en son centre et une hypoxie cyclique en périphérie associée au réseau vasculaire qui s'installe entre la tumeur et son microenvironnement. Très schématiquement, on considère que l'hypoxie cyclique peut durer de plusieurs minutes à quelques heures sur des périodes de

quelques heures à quelques semaines, avec des pressions en O₂ qui peuvent descendre en dessous de 15 mmHg. L'hypoxie continue se définit tout simplement comme une diminution permanente de l'apport en O₂ au cœur de la tumeur. Ces deux phénomènes se superposent spatialement et dans le temps, et ils évoluent en permanence puisqu'ils dépendent directement de la progression tumorale. Il est donc particulièrement complexe d'étudier leurs effets respectifs (Zhang et al., 2016).

Lorsqu'un patient avec une tumeur présente un SAOS, celui-ci vient ajouter une nouvelle source d'hypoxie chronique et nocturne, l'hypoxie intermittente avec une cyclicité bien plus rapide, de l'ordre de quelques secondes à quelques minutes selon la sévérité des apnées et dont l'intensité ressentie au niveau de la tumeur va dépendre de nombreux facteurs comme la localisation tumorale, la distance au système vasculaire ou encore l'état du réseau de néovaisseaux élaboré par la tumeur (Hunyor et al., 2018). Selon Hunyors, la rapidité de l'hypoxie induite par le SAOS peut activer ou inhiber sélectivement certaines voies contrairement à l'hypoxie continue ou l'hypoxie cyclique et, de fait, les conséquences d'une telle hypoxie intermittente systémique sur le tissu tumoral et son microenvironnement hypoxique sont difficiles à appréhender.

Dans ce contexte, il semble évident que les répercussions de l'HI sur la progression tumorale peuvent être très différentes d'un patient à l'autre, d'un cancer à l'autre ou encore d'un stade tumoral à l'autre. Si à l'avenir nous voulons mieux comprendre les interactions complexes entre hypoxie intermittente, hypoxie cyclique et hypoxie continue au niveau tumoral et les conséquences sur le développement, la dissémination ou encore la résistance aux traitements il sera nécessaire de compléter notre modèle expérimental. C'est dans cette perspective que nous avons mené une première série d'expériences *in vitro* sur des cellules 4T1 que nous

avons exposées à une hypoxie continue. L'objectif simple étant d'une part d'intégrer ce nouveau dispositif d'hypoxie à notre plateforme et d'autre part de mesurer la réponse des cellules 4T1 à ce nouveau stimulus qui est censé être représentatif de l'hypoxie qui règne au cœur de la tumeur.

Brièvement, des cellules 4T1 ont été exposées pendant 4 jours soit à un protocole d'hypoxie continue correspondant à une exposition sans interruption à 2% d'oxygène (15 mmHg), soit à un protocole contrôle normoxique à 16%. Afin d'explorer la voie HIF-1/ET-1/VEGF nous avons réparti les cellules exposées ou non à l'hypoxie continue en 4 groupes : un groupe contrôle, un groupe endothéline dans lequel les cellules ont été incubées avec 5 μ M de macitentan, un groupe VEGF dans lequel les cellules ont été incubées avec 0.1 μ M de pazopanib et un groupe HIF-1 dans lequel les cellules ont été incubées avec 0.2 μ M d'acriflavine. Des tests de migration et prolifération sur modèle 2D par wound healing et sur sphéroïdes ont été réalisés dans chaque groupe de chaque condition d'exposition, de la même façon que sur les cellules exposées à l'HI. La réparation des plaies a été évaluée pendant 5 jours consécutifs à l'aide d'un microscope.

Dans le groupe normoxique nous avons pu montrer que la prolifération et la migration in vitro des cellules tumorales 4T1 étaient accélérées après une exposition à l'hypoxie continue par rapport à la normoxie avec : Une augmentation significative de la migration en wound healing à J1, J2 et J3 (Figure 24, **B** et **C**) ; Une augmentation significative de l'expansion 3D des sphéroïdes J2.5 et à J3 (Figure 24, **D**).

Tandis que l'analyse des groupes traités par rapport au groupe contrôle n'a montré qu'un effet isolé du macitentan après 1 jour d'exposition figure 24.D). Dans l'ensemble aucun des trois traitements testés n'a modifié de manière significative la prolifération et la migration cellulaire dans le temps (Figure **25.A, B** et **C**).

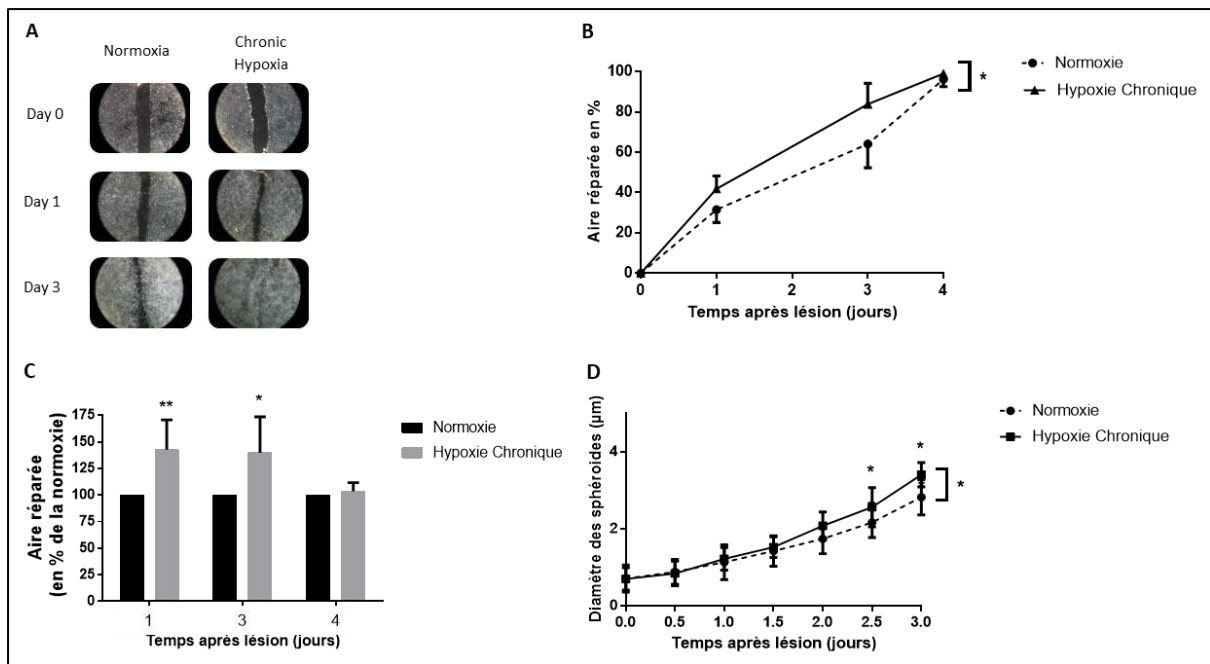


Figure 24 : L'hypoxie continue augmente la prolifération et la migration des cellules cancéreuses du sein *in vitro*. La migration des cellules 4T1 a été évaluée par des tests de wound healing. N= 6 expériences, au moins 3 puits/expérience par groupe.

- A.** Illustration de la cicatrisation des cellules 4T1 à 2 jours d'exposition à l'hypoxie continue ou à la normoxie.
- B.** Wound healing exprimé en % de la surface réparée, des cellules 4T1 exposées à 4 jours d'hypoxie continue ou de normoxie. * $p = 0.002$, ANOVA par mesures répétées. L'analyse post-hoc a montré des différences significatives * $p = 0.044$, * $p = 0.004$ et * $p = 0.048$, à J1, J2 et J3 respectivement post exposition à l'hypoxie continue ou de la normoxie. **C.** Wound healing exprimé en % des valeurs de normoxie, des cellules 4T1 exposées à 4 jours d'hypoxie continue ou de normoxie. L'hypoxie continue induit à une migration cellulaire accélérée entre J1 et J4 ** $p = 0.004$ et * $p = 0,018$ (ANOVA une voie). **D.** L'expansion des sphéroïdes 4T1 a été augmentée après 2.5 jours d'hypoxie continue par rapport à la normoxie. N= 5 expériences par groupe, 6 à 12 puits/expérience. * $p = 0.0043$, analyse en ANOVA par mesures répétées. L'analyse post-hoc a montré des différences significatives ; $p < 0.05$ aux jours 2,5 et 3 post exposition à l'hypoxie continue ou de la normoxie.

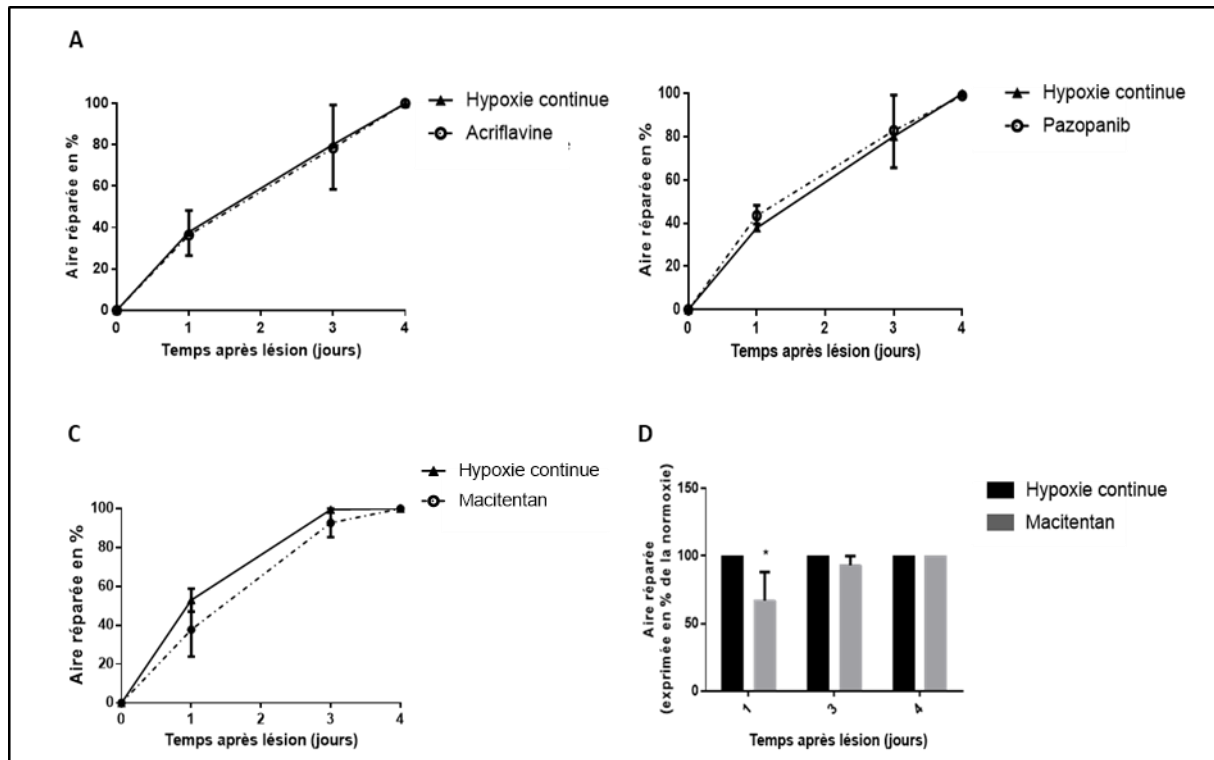


Figure 25 : Le blocage non sélectif des récepteurs de l'endothéline limite l'effet de l'hypoxie continue sur la cicatrisation

La migration des cellules 4T1 a été évaluée par des tests de cicatrisation pendant 4 jours d'hypoxie continue en présence ou en absence d'Acriflavine (0,2 μ M), de Pazopanib (0,1 μ g/ml) et de Macitentan (5 μ M). Le wound healing a été exprimé en % de la surface réparée. N=4 expériences par groupe, au moins 3 puits par expérience. L'effet de l'hypoxie continue favorisant la migration cellulaire n'a pas été affecté par l'Acriflavine (A) ou le Pazopanib (B) mais a tendance à être réduit ($p=0,067$, mesures répétées ANOVA) par le traitement au Macitentan (C). D. Comparaison des effets de l'hypoxie continue (HC) sur la cicatrisation des cellules 4T1 non traitées et traitées au macitentan. Une analyse post-hoc a montré des différences significatives après un jour d'exposition à l'HC (* $p < 0,05$).

Ces résultats intéressants se devront d'être confirmés puis comparés aux résultats obtenus en conditions d'hypoxie intermittente. Nous pouvons déjà observer que l'effet du macitentan en situation d'hypoxie intermittente serait supérieur à celui de l'hypoxie ce qui est cohérent avec l'hypothèse de Yuan et al. qui a montré que l'HI est un stimulus plus puissant que l'HC pour activer les gènes cibles de HIF (Yuan et al., 2005, 2008). Ce type d'expérience pourra nous apporter des informations sur la manière dont les cellules tumorales répondent aux différents stimulus qu'elles peuvent rencontrer dans les conditions réelles. En revanche les protocoles sur cellules en cultures ne permettront pas d'aborder la question de la superposition ou de

l'interférence des différentes situations hypoxiques rencontrées par une tumeur en fonction de son type, son stade et de sa localisation. Pour cela il faut nécessairement se mettre dans les conditions in vivo et par conséquent il faut compléter notre modèle par des outils de mesures fines de l'oxygénation intra-tumorale.

B. Exploration de l'oxygénation tissulaire mammaire saine et tumorale

Comme évoqué précédemment, notre protocole expérimental ne prévoyait pas d'exploration des niveaux d'oxygénation dans la tumeur mammaire, dans son microenvironnement, dans les tissus sains périphériques ni dans le tissu sain controlatéral, que ce soit pendant ou hors exposition au stimulus hypoxique. Pourtant, si nous pouvions ajouter une surveillance des niveaux d'oxygène dans le protocole animal cela pourrait considérablement améliorer notre compréhension des phénomènes en jeu. Parmi les méthodes existantes de monitoring de l'oxygénation tissulaire nous nous sommes intéressés à l'imagerie par analyse photoacoustique. Il s'agit d'une technique non-invasive qui combine une imagerie à haut niveau de contraste optique et une imagerie de haute résolution par ultrasons. Cette méthode permet notamment d'explorer le rapport oxyhémoglobine sur désoxyhémoglobine qui constitue un bon indicateur du taux d'oxygénation tissulaire. Le principe de cette technique est assez complexe mais on peut le résumer ainsi : en illuminant un tissu avec une lumière pulsée proche de l'infrarouge, l'énergie absorbée localement va se dissiper en chaleur ce qui conduit à une expansion thermoélastique des tissus. Ce phénomène va générer des ondes ultrasonores pouvant être détectées par un transducteur. En utilisant plusieurs longueurs d'onde de stimulation, les concentrations relatives en oxyhémoglobine et désoxyhémoglobine peuvent être appréciées et la saturation en oxygène peut être calculée (Brown et al., 2019).

En oncologie, la photoacoustique est de plus en plus utilisée pour explorer la microcirculation et la saturation en oxygène des tissus dans des cancers tels que le cancer du sein (Heijblom et al., 2016). Dans une revue récente, Brown et al. ont présenté les avantages de l'imagerie photoacoustique comme outil pour sonder le microenvironnement de la tumeur (Brown et al., 2019). Dans les études précliniques, l'imagerie photoacoustique permet de visualiser de

manière non-invasive l'architecture et la morphologie vasculaire de la tumeur avec une résolution spatiale élevée. Elle permet de suivre l'apport sanguin à l'échelle de la tumeur, d'avoir une information sur la néovascularisation et d'observer les changements structurels tels que l'augmentation du diamètre ou de la densité vasculaires ainsi que le recrutement des vaisseaux existants (Brown et al., 2019).

Devant de telles promesses nous avons complété notre modèle expérimental de tumeur du sein par une mesure de la saturation en O₂ associée à une quantification de l'hémoglobémie locale à l'aide d'un dispositif d'imagerie photoacoustique. Nous avons donc mené une première série de mesures d'oxygénation sur notre modèle animal.

Brièvement, des souris ont été exposées à 14 jours d'HI ou de normoxie puis ont reçu une inoculation de cellules 4T1 et ont poursuivi leur exposition à l'HI ou la normoxie pendant 14 jours supplémentaires. Aux jours 7 et 14 post-implantation, les souris des deux groupes ont été soumises à une séance d'imagerie par photoacoustique pour mesurer la concentration totale d'hémoglobine et l'oxygénation des tissus mammaires néoplasiques et des tissus mammaires sains en controlatéral. Tout d'abord il est essentiel de préciser que dans cette expérience pilote, les mesures photoacoustiques ont été réalisées en dehors des phases d'expositions à l'HI, entre 1 et 4 heures après, sur des animaux anesthésiés à l'isoflurane (4 % pour l'induction et 1,5% pour le maintien) sous air ambiant c'est-à-dire non supplémenté en oxygène.

Nous avons observé une augmentation significative de la SO₂ dans la glande mammaire saine entre J7 et J14 chez les animaux exposés à l'HI chronique tandis qu'elle reste stable en normoxie (Figure **26.A** et **B**). Une semaine après l'implantation, la SO₂ de la glande mammaire saine est comparable entre HI et normoxie. En revanche elle devient significativement

augmentée à J14 en condition d'HI par rapport au groupe normoxique (Figure **26.A** et **B**). Cette amélioration de la SO₂ mesurée en dehors de la séance d'HI traduit probablement un mécanisme compensatoire en réponse aux 8 heures quotidiennes d'exposition à l'HI. Ce phénomène se manifesterait pendant la période de réoxygénation (16 h/j) et conduirait à une meilleure oxygénation de la glande mammaire. Plusieurs hypothèses mécanistiques peuvent expliquer ce phénomène de compensation : 1) une augmentation locale de l'angiogenèse physiologique au niveau de la glande mammaire ; 2) une hyperémie réactionnelle systémique ; ou encore 3) une affinité augmentée de l'hémoglobine.

La technique de photoacoustique permet une évaluation indirecte de la densité des vaisseaux présents dans un tissu via une estimation de la quantité d'hémoglobine qu'il contient. Ainsi nous avons pu évaluer la quantité d'hémoglobine contenue dans la glande mammaire saine et observer que cette quantité reste stable entre j7 et J14 en condition de normoxie (Figure **26.C** et **D**), alors qu'elle augmente en condition d'HI et devient significativement supérieure à J14 par rapport à la normoxie (Figure **26.C** et **D**). Ces observations sont en faveur d'une augmentation de l'angiogenèse en condition d'HI et renforcent l'hypothèse d'un processus compensatoire.

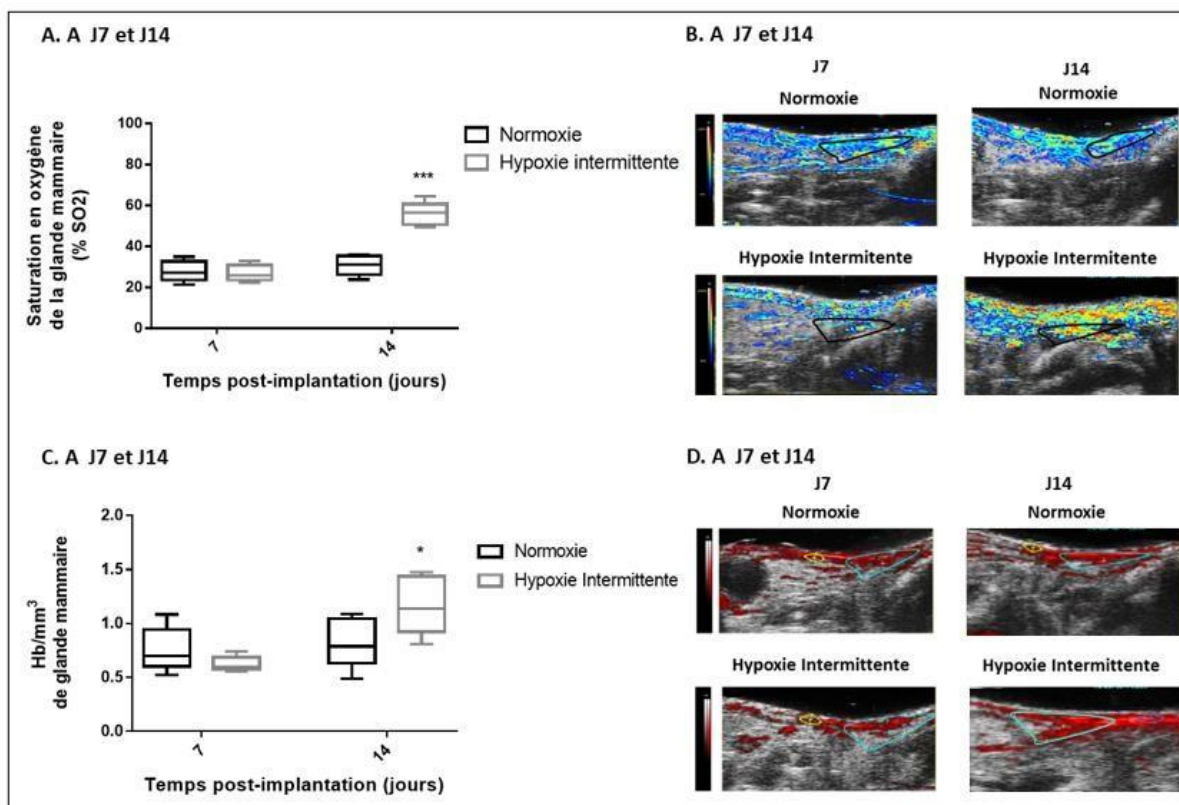


Figure 26 : Effet de l'hypoxie intermittente sur l'oxygénation et la vascularisation de la glande mammaire controlatérale saine évaluée par imagerie photoacoustique. Représentation des données issues de 10 souris (dont 5 N et 5 HI). **A.** Saturation en oxygène (%) de la glande mammaire saine en condition HI ou N mesurée à J7 et J14 ($p < 0.0001$, ANOVA répétée ; $p < 0.001$ interaction (exposition x temps)). HI induit une augmentation de la SO2 de la glande mammaire saine à J14 (***) ($p < 0.0001$, post-hoc). **B.** Figure illustrative de la SO2 de la glande mammaire saine en condition HI ou N mesurée à J7 et J14. **C.** Quantité d'hémoglobine contenue dans la glande mammaire saine en condition HI ou N exprimée par la quantité d'hémoglobine / mm³ et mesurée à J7 et J14 ($p < 0.01$ ANOVA répétée ; $p < 0.01$ interaction (exposition x temps)). HI induit une augmentation de la quantité d'hémoglobine dans la glande mammaire saine à J14 ($p < 0.05$, post hoc). **D.** Figure illustrative de la quantité d'hémoglobine / mm³ de tissu en condition HI ou N mesurée à J7 et J14 post implantation.

Au niveau tumoral, les acquisitions de photoacoustique réalisées à J7 et J14 montrent une diminution de la saturation en oxygène dans le temps en condition normoxique (figure 27.A) qui pourrait être liée à l'hypoxie continue tumorale qui s'installe lors de la croissance tumorale, un phénomène très bien décrit comme nous l'avons déjà vu. En HI, nous observons cette fois une stabilisation de la SO2 dans le temps avec une saturation significativement supérieure à la normoxie au jour 14 (Figure 27.A). Cette observation est cohérente avec le phénomène de compensation que nous avons mesuré sur la glande saine et surtout cela

semble confirmer que l'HI peut entraîner des modifications de l'hypoxie microenvironnementale, du moins pendant les séquences de réoxygénation. Cette compensation à l'échelle de la tumeur pourrait contribuer à favoriser le développement tumoral. Ce résultat a été retrouvé par des analyses réalisées sur ces mêmes animaux à partir d'une autre technique d'imagerie appelée hypoxysense permettant d'estimer le niveau d'hypoxie tissulaire par la mesure de la quantité d'anhydrase carbonique IX au niveau tumoral. Bien que nous ne présentions pas les résultats dans ce manuscrit, il est intéressant de souligner que les données montrent aussi une tendance à l'augmentation de l'oxygénation tumorale en condition d'HI. Concernant l'évaluation de la densité vasculaire tumoral, nous avons montré que le réseau vasculaire tumoral était probablement encore peu développé puisque les concentrations en hémoglobine sont plus faibles dans les groupes HI et normoxie par rapport au tissu mammaire sain. En outre, entre J7 et J14 cette concentration en hémoglobine tend à diminuer, aussi bien pour le groupe HI que pour la normoxie, ce que l'on peut interpréter comme une augmentation du volume tumoral plus rapide que la néo-angiogenèse (Figure **27.C**). Ces résultats sont finalement en adéquation avec des tumeurs qui seraient encore à un stade précoce de leur développement et qui par conséquent présenteraient une faible densité de néovaisseaux. Il est à noter que si l'on se fie aux résultats de concentrations en hémoglobine, les animaux exposés à l'HI présenteraient une angiogenèse légèrement plus avancée que les animaux non exposés aussi bien à J7 qu'à J4, et ce malgré un stade précoce de développement (Figure **27.C**). L'HI pourrait donc contribuer à accélérer la cinétique de pousse tumorale à travers une formation de nouveaux vaisseaux plus rapide ou plus abondante

En situation de normoxie, la diminution d'un facteur 2 de la SO_2 entre J7 et J14 simultanée avec la diminution de la densité du réseau vasculaire évoque une hypoxie continue tumorale

liée à la croissance tissulaire et à l'apparition de zones très hypoxiques, voire anoxiques, qui ne serait pas compensée par un processus d'angiogenèse suffisant. En condition d'HI la situation est un peu différente puisque la stabilisation de la SO₂ observée est aussi associée à une réduction de la densité du réseau vasculaire dans le temps. Ceci nous laisse penser que le maintien d'une oxygénation tissulaire ne serait pas principalement lié à un phénomène compensatoire médié par une angiogenèse efficiente. Il y aurait donc des différences sur les mécanismes en jeu entre les tumeurs exposées à l'HI systémique et celles maintenues en normoxie, et ces différences pourraient venir du stade de développement.

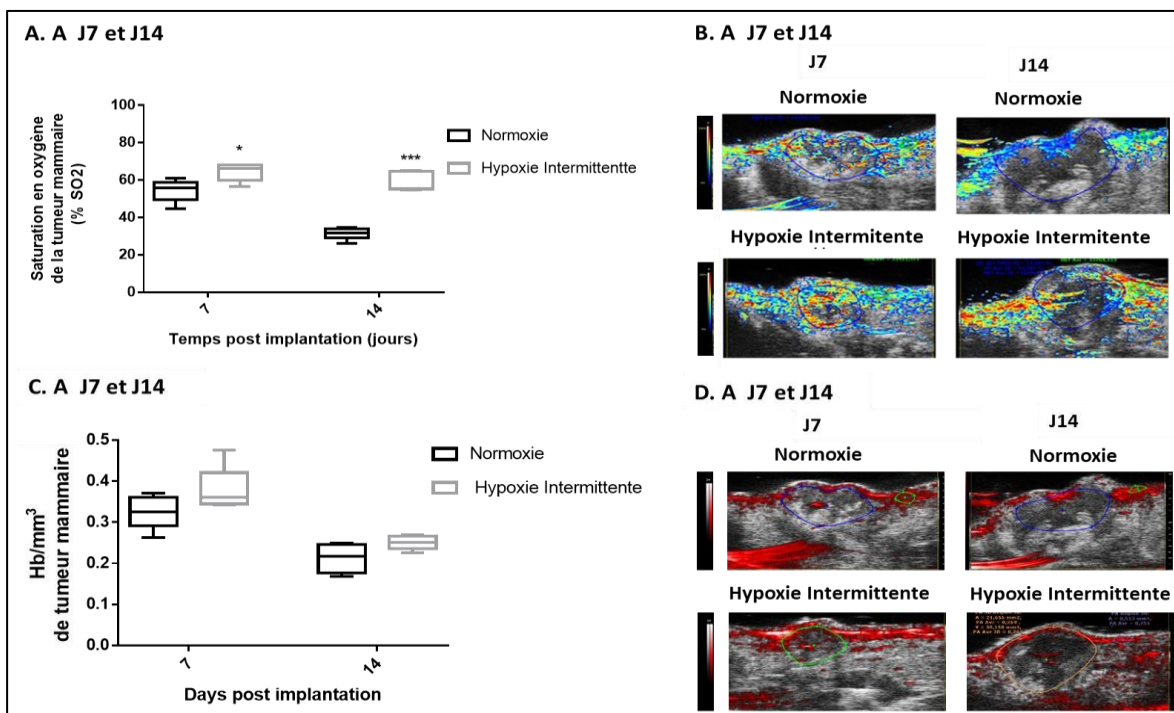


Figure 27 : Effet de l'hypoxie intermittente sur l'oxygénation et la vascularisation tumorale évaluée par imagerie photoacoustique. Représentation des données issues de 10 souris (dont 5 N et 5 HI)

A. Saturation en oxygène (%) de la tumeur en condition HI ou N mesurée à J7 et J14 ($p < 0.0001$, ANOVA répétée ; $p < 0.001$ interaction (exposition x temps)). L'HI induit une augmentation de la SO₂ tumorale à J7 et J14 (respectivement $*p < 0.05$ et $***p < 0.0001$, post-hoc). **B.** Figure illustrative de la saturation en oxygène de la tumeur mammaire en condition HI ou N mesurée à J7 et J14. **C.** Hémoglobine contenue dans la tumeur mammaire en condition HI ou N exprimée par la quantité d'hémoglobine / mm³ et mesurée à J7 et J14 ($p < 0.0001$ ANOVA répétée ; $p < 0.05$ interaction (exposition x temps)). L'HI ne modifie pas significativement la quantité d'hémoglobine tumorale ni à J7, ni à J14 (p NS). **D.** Figure illustrative de la quantité d'hémoglobine / mm³ de tumeur en condition HI ou N mesurée à J7 et J14 post implantation.

Nous avons cité plus haut les travaux de Zhang et al. qui montrent que la fraction hypoxique d'une tumeur évolue au cours du temps, et plus précisément en fonction du volume de la tumeur (figure 28) (Zhang et al., 2016). Sur la figure 28 qui exprime justement cette fraction en fonction du volume tumoral nous pouvons distinguer trois phases différentes : 1) La phase précoce de développement tumoral au cours de laquelle les tumeurs sont de petites tailles et de plus en plus hypoxiques puisque le phénomène de diffusion de l'oxygène y est prépondérant ; 2) La phase d'angiogenèse au cours de laquelle la fraction hypoxique se réduit grâce à l'apport d'oxygène par les nouveaux vaisseaux; et enfin 3) la phase d'hypoxie tumorale durant laquelle la fraction hypoxique augmente à nouveau mais plus progressivement à cause d'un réseau vasculaire qui devient anarchique et dysfonctionnel. Nous émettons l'hypothèse qu'au regard de ces trois cinétiques différentes les animaux exposés à la normoxie seraient encore dans la phase 1 avec une baisse rapide et élevée de la saturation et une vascularisation très insuffisante, tandis que les animaux exposés à l'HI seraient quant à eux au début de la seconde phase avec une saturation qui commence à s'améliorer mais avec un réseau vasculaire toujours peu concentré, du moins pas suffisamment pour être détectable à travers la mesure de l'hémoglobine par photoacoustique.

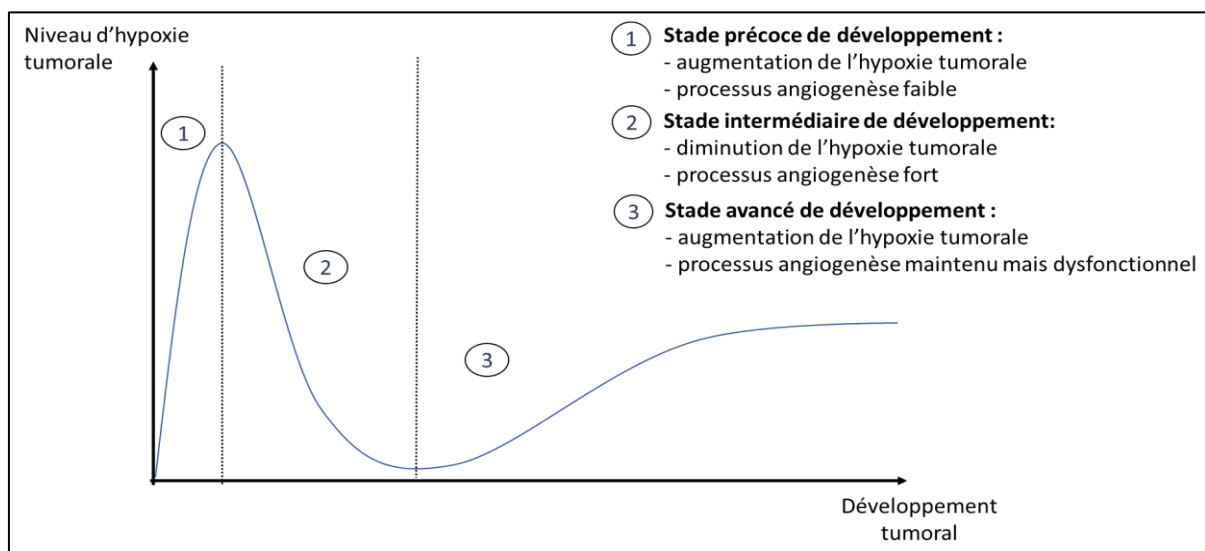


Figure 28 : Niveau d'hypoxie en fonction du volume tumoral (d'après (Zhang, 2016))

A travers ce travail pilote, nous avons montré que le suivi de l'oxygénation pourrait apporter des informations essentielles à la compréhension des mécanismes impliqués dans l'effet de l'hypoxie intermittente sur la croissance tumorale. Des acquisitions de photoacoustique supplémentaires devront être réalisées (à des temps intermédiaires et plus tardif : J7-J10-J14J18 et J21) afin de mieux comprendre la cinétique de croissance tumorale et l'impact de l'HI dans la modification de cette cinétique. Pour le moment nous n'avons pu qu'observer la répercussion de l'HI sur l'oxygénation tissulaire et tumorale à distance des séquences d'hypoxie. Pour compléter ces données nous aurons besoin d'un modèle nous permettant de suivre ces répercussions pendant la phase d'exposition à l'hypoxie intermittente afin de voir si cette dernière a un impact direct sur l'hypoxie continue et/ou l'hypoxie cyclique du microenvironnement tumoral.

CONCLUSION

En 2012, Nieto et al. ont publié la première étude de cohorte montrant une association entre le syndrome d'apnées obstructives du sommeil et le pronostic de cancer, tout type de cancers confondus. Un an plus tard, cette même équipe espagnole dirigée par le Professeur Ramon Farré (Université de Barcelone), a pu mener une étude prospective grâce au Réseau Espagnol du Sommeil et montrer cette fois une corrélation entre la présence du SAOS et une incidence augmentée de cancers dans les 5 années après le diagnostic de SAOS. Depuis, plusieurs équipes et travaux ont tenté de retrouver ces résultats sur l'incidence et la mortalité, certaines ont effectivement confirmé l'effet délétère du SAOS tandis que d'autres n'ont pas retrouvé ces liens.

Pour explorer les causes mécanistiques sous-jacentes, l'équipe du Pr. Farré a rapidement élaboré un modèle préclinique permettant d'exposer des souris à un stimulus d'hypoxie intermittente, la composante du SAOS considérée comme étant la plus délétère, pour observer les conséquences d'une telle exposition chronique sur la croissance et l'agressivité tumorale et ceci dans différents modèles de tumeurs comme le mélanome. Leurs travaux ont conduit à une série conséquente de publications et d'autres équipes les ont suivis mais finalement aucune hypothèse mécanistique n'a pu être formellement démontrée et plusieurs pistes restent en cours d'exploration. Ont ainsi été évoqués tour à tour le stress oxydant, l'inflammation, la fonction endothéliale, la réponse immune, mais aussi certaines voies bien connues dans le domaine de la cancérologie et de l'hypoxie tumorale comme le facteur HIF-1 et NF- κ B.

Dans ce travail de thèse nous avons voulu mettre notre plateforme multimodale d'exposition à l'hypoxie intermittente (exposition animale et cellulaire) au profit de cette recherche du lien entre SAOS et cancer, appliquée au contexte du cancer du sein. Notre objectif principal était

d'explorer la relation entre l'HI et la croissance tumorale mammaire. Grâce à un protocole expérimental complexe alliant à la fois un modèle murin de tumeur mammaire orthotopique et deux modèles de culture cellulaire (plan et tridimensionnel) nous avons pu montrer que l'exposition répétée à un stimulus d'hypoxie intermittente entraînait une augmentation du volume tumoral dans le temps, une accélération de la prolifération tumorale dans le temps et enfin une augmentation de la taille tumorale après exposition. Notre second objectif était d'analyser la répercussion de l'exposition chronique à l'HI sur la dissémination thoracique du foyer primaire mammaire. En mesurant la dissémination tumorale au niveau thoracique nous avons démontré que les animaux exposés à l'HI présentaient un plus important foyer secondaire au niveau thoracique. Enfin, notre dernier objectif était d'explorer l'implication de la voie du facteur HIF-1 ainsi que de deux de ses gènes cibles, l'endothéline 1 et le VEGF. Alors que ni le blocage du facteur HIF-1 ni celui du récepteur au VEGF n'a eu d'impact sur l'effet délétère de l'HI *in vitro*, nous avons pu mettre en évidence que le blocage non sélectif des récepteurs à l'endothéline 1 pouvait contrer cet effet aussi bien sur notre modèle cellulaire que sur notre modèle animal. L'absence de réponse au blocage de cette voie chez les animaux non exposés à l'HI nous a amené à proposer une hypothèse mécanistique qui impliquerait davantage ce que nous avons appelé le macroenvironnement, c'est-à-dire les tissus sains soumis à l'HI systémique, que le microenvironnement tumoral et la tumeur elle-même. D'autres études plus poussées avec des mesures répétées dans le temps des concentrations tissulaires tumorale et non tumorale (macroenvironnement tumoral) en endothéline 1 seront encore nécessaires avant d'envisager la voie ET-1 comme une piste thérapeutique.

En somme, grâce à ce travail transversal nous pouvons conclure que l'hypoxie intermittente induite par le SAOS est susceptible de provoquer une accélération de la croissance et de la dissémination tumorale dans le cancer du sein et que ce phénomène fait intervenir la voie de l'endothéline à travers une activation d'avantage systémique que micro environnementale.

BIBLIOGRAPHIE

- Almendros, I.; Montserrat, J. M.; Ramirez, J.; Torres, M.; Duran-Cantolla, J.; Navajas, D.; Farre, R., 2012a: Intermittent hypoxia enhances cancer progression in a mouse model of sleep apnoea. *European Respiratory Journal.*, **39**, 215–217.
- Almendros, I.; Montserrat, J. M.; Torres, M.; Bonsignore, M. R.; Chimenti, L.; Navajas, D.; Farré, R., 2012b: Obesity and intermittent hypoxia increase tumor growth in a mouse model of sleep apnea. *Sleep Medicine.*, **13**, 1254–1260.
- Almendros, I.; Montserrat, J. M.; Torres, M.; Dalmases, M.; Cabañas, M. L.; Campos-Rodríguez, F.; Navajas, D.; Farré, R., 2013: Intermittent hypoxia increases melanoma metastasis to the lung in a mouse model of sleep apnea. *Respiratory Physiology & Neurobiology.*, **186**, 303–307.
- Almendros, I.; Wang, Y.; Becker, L.; Lennon, F. E.; Zheng, J.; Coats, B. R.; Schoenfelt, K. S.; Carreras, A.; Hakim, F.; Zhang, S. X.; Farré, R.; Gozal, D., 2014a: Intermittent hypoxia-induced changes in tumor-associated macrophages and tumor malignancy in a mouse model of sleep apnea. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.*, **189**, 593–601.
- Almendros, I.; Wang, Y.; Gozal, D., 2014b: The polymorphic and contradictory aspects of intermittent hypoxia. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology.*, **307**.
- American Diabetes Association, 2015: Standards of medical care in diabetes-2015 abridged for primary care providers. *Clinical diabetes : a publication of the American Diabetes Association.*, **33**, 97–111.
- Ángel Martínez-García, M.; Campos-Rodríguez, F.; Almendros, I.; Farré, R.; Martínez-garcía, M. Á.; Campos-Rodríguez, F.; Almendros, I., 2015: Relationship Between Sleep Apnea and Cancer. *Arch Bronconeumol.*, **51**, 456–461.
- Arnaud, C.; Dematteis, M.; Pepin, J. L.; Baguet, J. P.; Lévy, P., 2009: Obstructive sleep apnea, immunoinflammation, and atherosclerosis. *Seminars in immunopathology.*, **31**, 113–125.
- Arnaud, C.; Poulain, L.; Lévy, P.; Dematteis, M., 2011: Inflammation contributes to the atherogenic role of intermittent hypoxia in apolipoprotein-E knock out mice. *Atherosclerosis.*, **219**, 425–431.
- Arnaud, C.; Bochaton, T.; Pépin, J. L.; Belaidi, E., 2020: Obstructive sleep apnoea and cardiovascular consequences: Pathophysiological mechanisms. *Archives of cardiovascular diseases.*, **113**, 350–358.
- Aron-Wisnewsky, J.; Minville, C.; Tordjman, J.; Lévy, P.; Bouillot, J. L.; Basdevant, A.; Bedossa, P.; Clément, K.; Pépin, J. L., 2012: Chronic intermittent hypoxia is a major trigger for non-alcoholic fatty liver disease in morbid obese. *Journal of hepatology.*, **56**, 225–233.
- Arthur, R.; Wassertheil-Smoller, S.; Manson, J. A. E.; Luo, J.; Snetselaar, L.; Hastert, T.; Caan, B.; Qi, L.; Rohan, T., 2018: The combined association of modifiable risk factors with breast cancer risk in the women's health initiative. *Cancer Prevention Research.*, **11**, 317–326.
- Asham, E.; Shankar, A.; Loizidou, M.; Fredericks, S.; Miller, K.; Boulos, P. B.; Burnstock, G.; Taylor, I., 2001: Increased endothelin-1 in colorectal cancer and reduction of tumour growth by ET(A) receptor antagonism. *British journal of cancer.*, **85**, 1759–1763.
- Ashrafian, H.; Toma, T.; Rowland, S.; Harling, L.; Tan, A.; Efthimiou, E.; Darzi, A.; Athanasiou, T., 2015: Bariatric Surgery or Non-Surgical Weight Loss for Obstructive Sleep Apnoea? A Systematic Review and Comparison of Meta-analyses. *Obesity Surgery.*, **25**, 1239–1250.

- Ayas, N. T.; Hirsch, A. A. J.; Laher, I.; Bradley, T. D.; Malhotra, A.; Polotsky, V. Y.; Tasali, E., 2014: New frontiers in obstructive sleep apnoea. *Clinical science (London, England : 1979)*, **127**, 209–216.
- Bagnato, A.; Cirilli, A.; Salani, D.; Simeone, P.; Muller, A.; Nicotra, M. R.; Natali, P. G.; Venuti, A., 2002: Growth inhibition of cervix carcinoma cells in vivo by endothelin a receptor blockade. *Cancer Research*, **62**, 6381–6384.
- Bagnato, A.; Rosanò, L.; Spinella, F.; Di Castro, V.; Tecce, R.; Natali, P. G., 2004: Endothelin B receptor blockade inhibits dynamics of cell interactions and communications in melanoma cell progression. *Cancer research*, **64**, 1436–1443.
- Bagnato, A.; Spinella, F.; Rosanò, L., 2008a: The endothelin axis in cancer: the promise and the challenges of molecularly targeted therapy. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, **86**, 473–484.
- Bagnato, A.; Rosanò, L., 2008b: The endothelin axis in cancer. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, **40**, 1443–1451.
- Bagnato, A.; Loizidou, M.; Pflug, B. R.; Curwen, J.; Growcott, J., 2011: Role of the endothelin axis and its antagonists in the treatment of cancer. *British journal of pharmacology*, **163**, 220–233.
- Balamurugan, K., 2016: HIF-1 at the crossroads of hypoxia, inflammation, and cancer. *International Journal of Cancer*, **138**, 1058–1066.
- Barbé, F.; Durán-Cantolla, J.; Sánchez-de-la-Torre, M.; Martínez-Alonso, M.; Carmona, C.; Barceló, A.; Chiner, E.; Masa, J. F.; Gonzalez, M.; Marín, J. M.; Garcia-Rio, F.; Díaz de Atauri, J.; Terán, J.; Mayos, M.; de la Peña, M.; Monasterio, C.; del Campo, F.; Montserrat, J. M.; Spanish Sleep And Breathing Network, 2012: Effect of continuous positive airway pressure on the incidence of hypertension and cardiovascular events in nonsleepy patients with obstructive sleep apnea: a randomized controlled trial. *JAMA*, **307**, 2161–2168.
- Bayer, C.; Vaupel, P., 2012: Acute versus chronic hypoxia in tumors. *Strahlentherapie und Onkologie*, **188**, 616–627.
- Beaber, E. F.; Malone, K. E.; Tang, M. T. C.; Barlow, W. E.; Porter, P. L.; Daling, J. R.; Li, C. I., 2014: Oral contraceptives and breast cancer risk overall and by molecular subtype among young women. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, **23**, 755–764.
- Belaidi, E.; Joyeux-Faure, M.; Ribuot, C.; Launois, S. H.; Levy, P.; Godin-Ribuot, D., 2009: Major role for hypoxia inducible factor-1 and the endothelin system in promoting myocardial infarction and hypertension in an animal model of obstructive sleep apnea. *Journal of the American College of Cardiology*, **53**, 1309–1317.
- Belaidi, E.; Morand, J.; Gras, E.; Pépin, J. L.; Godin-Ribuot, D., 2016: Targeting the ROS-HIF-1-endothelin axis as a therapeutic approach for the treatment of obstructive sleep apnea-related cardiovascular complications. *Pharmacology & therapeutics*, **168**, 1–11.
- Benjafield, A. V.; Ayas, N. T.; Eastwood, P. R.; Heinzer, R.; Ip, M. S. M.; Morrell, M. J.; Nunez, C. M.; Patel, S. R.; Penzel, T.; Pépin, J. L.; Peppard, P. E.; Sinha, S.; Tufik, S.; Valentine, K.; Malhotra, A., 2019:

Estimation of the global prevalence and burden of obstructive sleep apnoea: a literature-based analysis. *The Lancet Respiratory Medicine.*, **7**, 687–698.

Berry, R. B.; Budhiraja, R.; Gottlieb, D. J.; Gozal, D.; Iber, C.; Kapur, V. K.; Marcus, C. L.; Mehra, R.; Parthasarathy, S.; Quan, S. F.; Redline, S.; Strohl, K. P.; Davidson Ward, S. L.; Tangredi, M. M.; American Academy of Sleep Medicine, 2012: 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. *Journal of clinical sleep medicine : JCSM : official publication of the American Academy of Sleep Medicine.*, **8**, 597–619.

Bhattacharya, S.; Calar, K.; de la Puente, P., 2020: Mimicking tumor hypoxia and tumor-immune interactions employing three-dimensional in vitro models. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR.*, **39**, 75.

Binder-foucard, F.; Belot, A.; Delafosse, P.; Remontet, L.; Woronoff, A. S.; Bossard, N., 2019: Estimation nationale de l' incidence et de la mortalité par cancer en France: synthese 2018. *Institut de veille sanitaire.*

Bironneau, V.; Tamisier, R.; Trzepizur, W.; Andriantsitohaina, R.; Berger, M.; Goupil, F.; Joyeux-Faure, M.; Jullian-Desayes, I.; Launois, S.; Le Vaillant, M.; Martinez, M. C.; Roche, F.; Pépin, J. L.; Gagnadoux, F., 2020: Sleep apnoea and endothelial dysfunction: An individual patient data meta-analysis. *Sleep medicine reviews.*, **52**, 101309.

Bixler, E. O.; Vgontzas, A. N.; Lin, H. M.; Ten Have, T.; Rein, J.; Vela-Bueno, A.; Kales, A., 2001: Prevalence of sleep-disordered breathing in women: effects of gender. *American journal of respiratory and critical care medicine.*, **163**, 608–613.

Borel, A. L.; Leblanc, X.; Alméras, N.; Tremblay, A.; Bergeron, J.; Poirier, P.; Després, J. P.; Series, F., 2012: Sleep apnoea attenuates the effects of a lifestyle intervention programme in men with visceral obesity. *Thorax.*, **67**, 735–741.

Bos, R.; van der Groep, P.; Greijer, A. E.; Shvarts, A.; Meijer, S.; Pinedo, H. M.; Semenza, G. L.; van Diest, P. J.; van der Wall, E., 2003: Levels of hypoxia-inducible factor-1? independently predict prognosis in patients with lymph node negative breast carcinoma. *Cancer.*, **97**, 1573–1581.

Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R. L.; Torre, L. A.; Jemal, A., 2018: Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians.*, **68**, 394–424.

Brenner, R.; Kivity, S.; Peker, M.; Reinhorn, D.; Keinan-Boker, L.; Silverman, B.; Liphitsz, I.; Kolitz, T.; Levy, C.; Shlomi, D.; Pillar, G.; Peled, N., 2019: Increased Risk for Cancer in Young Patients with Severe Obstructive Sleep Apnea. *Respiration.*, **97**, 15–23.

Briançon-Marjollet, A.; Pépin, J. L.; Weiss, J. W.; Lévy, P.; Tamisier, R., 2014: Intermittent hypoxia upregulates serum VEGF. *Sleep medicine.*, **15**, 1425–1426.

Briançon-Marjollet, A.; Weiszenstein, M.; Henri, M.; Thomas, A.; Godin-Ribuot, D.; Polak, J., 2015: The impact of sleep disorders on glucose metabolism: endocrine and molecular mechanisms. *Diabetology & Metabolic Syndrome.*, **7**, 25.

- Briançon-Marjollet, A.; Monneret, D.; Henri, M.; Hazane-Puch, F.; Pepin, J. L.; Faure, P.; Godin-Ribuot, D., 2016: Endothelin regulates intermittent hypoxia-induced lipolytic remodelling of adipose tissue and phosphorylation of hormone-sensitive lipase. *The Journal of physiology.*, **594**, 1727–1740.
- Brown, E.; Brunker, J.; Bohndiek, S. E., 2019: Photoacoustic imaging as a tool to probe the tumour microenvironment. *Disease models & mechanisms.*, **12**.
- Bruning, P. F.; Bonfrère, J. M.; van Noord, P. A.; Hart, A. A.; de Jong-Bakker, M.; Nooijen, W. J., 1992: Insulin resistance and breast-cancer risk. *International journal of cancer.*, **52**, 511–516.
- Buckland, G.; Travier, N.; Cottet, V.; González, C. A.; Luján-Barroso, L.; Agudo, A.; Trichopoulou, A.; Lagiou, P.; Trichopoulos, D.; Peeters, P. H.; May, A.; Bueno-de-Mesquita, H. B.; Bvan Duijnhoven, F. J.; Key, T. J.; Allen, N.; Khaw, K. T.; Wareham, N.; Romieu, I.; McCormack, V. et al., 2013: Adherence to the mediterranean diet and risk of breast cancer in the European prospective investigation into cancer and nutrition cohort study. *International journal of cancer.*, **132**, 2918–2927.
- Campos-Rodriguez, F.; Martinez-Garcia, M. A.; Martinez, M.; Duran-Cantolla, J.; De La Penã, M.; Masdeu, M. J.; Gonzalez, M.; Del Campo, F.; Gallego, I.; Marin, J. M.; Barbe, F.; Montserrat, J. M.; Farre, R., 2013: Association between obstructive sleep apnea and cancer incidence in a large multicenter spanish cohort. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.*
- Campos-Rodriguez, F.; Cruz-Medina, A.; Selma, M. J.; Rodriguez-de-la-Borbolla-Artacho, M.; SanchezVega, A.; Ripoll-Orts, F.; Almeida-Gonzalez, C. V.; Martinez-Garcia, M. A., 2018: Association between sleep-disordered breathing and breast cancer aggressiveness. *PLoS ONE.*, **13**, 1–14.
- Carmeliet, P.; Jain, R. K., 2000: Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature.*, **407**, 249–257.
- Chang, W. P.; Liu, M. E.; Chang, W. C.; Yang, A. C.; Ku, Y. C.; Pai, J. T.; Lin, Y. W.; Tsai, S. J., 2014: Sleep apnea and the subsequent risk of breast cancer in women: a nationwide population-based cohort study. *Sleep medicine.*, **15**, 1016–1020.
- Chao, Y.; Shang, J.; Ji, W., 2020: ALKBH5-m6A-FOXO1 signaling axis promotes proliferation and invasion of lung adenocarcinoma cells under intermittent hypoxia. *Biochemical and Biophysical Research Communications.*, **521**, 499–506.
- Chaplin, D. J.; Olive, P. L.; Durand, R. E., 1987: Intermittent blood flow in a murine tumor: radiobiological effects. *Cancer research.*, **47**, 597–601.
- Chen, A.; Sceneay, J.; Gödde, N.; Kinwel, T.; Ham, S.; Thompson, E. W.; Humbert, P. O.; Möller, A., 2018: Intermittent hypoxia induces a metastatic phenotype in breast cancer. *Oncogene.*, **37**, 4214–4225.
- Chen, C. L.; Chu, J. S.; Su, W. C.; Huang, S. C.; Lee, W. Y., 2010: Hypoxia and metabolic phenotypes during breast carcinogenesis: expression of HIF-1 α , GLUT1, and CAIX. *Virchows Archiv.*, **457**, 53–61.
- Chen, W. Y.; Rosner, B.; Hankinson, S. E.; Colditz, G. A.; Willett, W. C., 2011: Moderate Alcohol Consumption During Adult Life, Drinking Patterns, and Breast Cancer Risk. *JAMA.*, **306**, 1884.
- Chirinos, J. A.; Gurubhagavatula, I.; Teff, K.; Rader, D. J.; Wadden, T. A.; Townsend, R.; Foster, G. D.; Maislin, G.; Saif, H.; Broderick, P.; Chittams, J.; Hanlon, A. L.; Pack, A. I., 2014: CPAP, weight loss, or both for obstructive sleep apnea. *The New England journal of medicine.*, **370**, 2265–2275.

- Choi, J. H.; Lee, J. Y.; Han, K. Do; Lim, Y. C.; Cho, J. H., 2019: Association between obstructive sleep apnoea and breast cancer: The Korean National Health Insurance Service Data 2007–2014. *Scientific Reports.*, **9**, 19044.
- De Palma, M.; Biziato, D.; Petrova, T. V., 2017: Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis. *Nature Reviews Cancer.*, **17**, 457–474.
- Defossez, G.; Le Guyader-Peyrou, S.; Uhry, Z.; Remontet, L.; Colonna, M., 2019: Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018
- Dematteis, M.; Godin-Ribuot, D.; Arnaud, C.; Ribuot, C.; Stanke-Labesque, F.; Pépin, J. L.; Lévy, P., 2009: Cardiovascular consequences of sleep-disordered breathing: contribution of animal models to understanding the human disease. *ILAR journal.*, **50**, 262–281.
- Dempsey, J. A.; Veasey, S. C.; Morgan, B. J.; O'Donnell, C. P., 2010: Pathophysiology of sleep apnea. *Physiological reviews.*, **90**, 47–112.
- Dewan, N. A.; Nieto, F. J.; Somers, V. K., 2015: Intermittent hypoxemia and OSA: implications for comorbidities. *Chest.*, **147**, 266–274.
- Dong, J. Y.; Qin, L. Q., 2011: Soy isoflavones consumption and risk of breast cancer incidence or recurrence: a meta-analysis of prospective studies. *Breast cancer research and treatment.*, **125**, 315–323.
- Drabkin, H. A., 2010: Pazopanib and anti-VEGF therapy. *Open access journal of urology.*, **2**, 35–40.
- Drager, L. F.; Li, J.; Reinke, C.; Bevans-Fonti, S.; Jun, J. C.; Polotsky, V. Y., 2011: Intermittent hypoxia exacerbates metabolic effects of diet-induced obesity. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, **19**, 2167–2174.
- Elmasry, A.; Lindberg, E.; Hedner, J.; Janson, C.; Boman, G., 2002: Obstructive sleep apnoea and urine catecholamines in hypertensive males: a population-based study. *The European respiratory journal.*, **19**, 511–517.
- Fang, H. F.; Miao, N. F.; Chen, C. D.; Sithole, T.; Chung, M. H., 2015: Risk of Cancer in Patients with Insomnia, Parasomnia, and Obstructive Sleep Apnea: A Nationwide Nested Case-Control Study. *Journal of Cancer.*, **6**, 1140–1147.
- Farvid, M. S.; Cho, E.; Chen, W. Y.; Eliassen, A. H.; Willett, W. C., 2014: Dietary protein sources in early adulthood and breast cancer incidence: prospective cohort study. *BMJ (Clinical research ed.)*, **348**, g3437.
- Gao, X. L.; Jia, Z. M.; Zhao, F. F.; An, D. D.; Wang, B.; Cheng, E. J.; Chen, Y.; Gong, J. N.; Liu, D.; Huang, Y. Q.; Yang, J. J.; Wang, S. J., 2020: Obstructive sleep apnea syndrome and causal relationship with female breast cancer: a mendelian randomization study. *Aging.*, **12**, 4082–4092.
- Garcia-Estevez, L.; Moreno-Bueno, G., 2019: Updating the role of obesity and cholesterol in breast cancer. *Breast Cancer Research.*, **21**, 1–8.
- Gaudet, M. M.; Press, M. F.; Haile, R. W.; Lynch, C. F.; Glaser, S. L.; Schildkraut, J.; Gammon, M. D.; Douglas Thompson, W.; Bernstein, J. L., 2011: Risk factors by molecular subtypes of breast cancer across a population-based study of women 56 years or younger. *Breast cancer research and treatment.*, **130**, 587–597.

- Gautier-Veyret, E.; Arnaud, C.; Bäck, M.; Pépin, J. L.; Petri, M. H.; Baguet, J. P.; Tamisier, R.; Lévy, P.; Stanke-Labesque, F., 2013: Intermittent hypoxia-activated cyclooxygenase pathway: role in atherosclerosis. *The European respiratory journal.*, **42**, 404–413.
- Gileles-Hillel, A.; Kheirandish-Gozal, L.; Gozal, D., 2016: Biological plausibility linking sleep apnoea and metabolic dysfunction. *Nature reviews. Endocrinology.*, **12**, 290–298.
- Gilson, P., 2019: The pyrrolopyrimidine colchicine-binding site agent PP-13 reduces the metastatic dissemination of invasive cancer cells in vitro and in vivo. *Biochem Pharmacol.*
- Godinho-Mota, J. C. M.; Martins, K. A.; Vaz-Gonçalves, L.; Mota, J. F.; Soares, L. R.; Freitas-Junior, R., 2018: Visceral adiposity increases the risk of breast cancer: a case-control study. *Nutricion hospitalaria.*, **35**, 576–581.
- Godinho-Mota, J. C. M.; Gonçalves, L. V.; Mota, J. F.; Soares, L. R.; Schincaglia, R. M.; Martins, K. A.; Freitas-Junior, R., 2019: Sedentary behavior and alcohol consumption increase breast cancer risk regardless of menopausal status: A case-control study. *Nutrients.*, **11**.
- Gottlieb, D. J.; Whitney, C. W.; Bonekat, W. H.; Iber, C.; James, G. D.; Lebowitz, M.; Nieto, F. J.; Rosenberg, C. E., 1999: Relation of sleepiness to respiratory disturbance index: the Sleep Heart Health Study. *American journal of respiratory and critical care medicine.*, **159**, 502–507.
- Gould Stephen J.; Subramani Suresh, 1988: Firefly Luciferase as a Tool in Molecular and Cell Biology. *Analytical Biochemistry.*
- Gras, E.; Belaidi, E.; Briançon-Marjollet, A.; Pépin, J. L. L.; Arnaud, C.; Godin-Ribuot, D.; Ribouot, D. G., 2016: Endothelin-1 mediates intermittent hypoxia-induced inflammatory vascular remodeling through HIF-1 activation. *Journal of Applied Physiology.*, **120**, 437–443.
- Gutsche, K.; Randi, E. B.; Blank, V.; Fink, D.; Wenger, R. H.; Leo, C.; Scholz, C. C., 2016: Intermittent hypoxia confers pro-metastatic gene expression selectively through NF-κB in inflammatory breast cancer cells. *Free Radical Biology and Medicine.*, **101**, 129–142.
- Harris, A. L., 2002: Hypoxia — a key regulatory factor in tumour growth. *Nature Reviews Cancer.*, **2**, 38–47.
- Hatfield, S.; Veszeleiova, K.; Steingold, J.; Sethuraman, J., 2019: Hypoxia and Cancer Metastasis, **1136**, 113–121.
- Heijblom, M.; Piras, D.; van den Engh, F. M.; van der Schaaf, M.; Klaase, J. M.; Steenbergen, W.; Manohar, S., 2016: The state of the art in breast imaging using the Twente Photoacoustic Mammoscope: results from 31 measurements on malignancies. *European Radiology.*, **26**, 3874–3887.
- Heinzer, R.; Marti-Soler, H.; Marques-Vidal, P.; Tobback, N.; Andries, D.; Waeber, G.; Preisig, M.; Vollenweider, P.; Haba-Rubio, J., 2018: Impact of sex and menopausal status on the prevalence, clinical presentation, and comorbidities of sleep-disordered breathing. *Sleep Medicine.*, **51**, 29–36.
- Horner, R. L., 2007: Contributions of passive mechanical loads and active neuromuscular compensation to upper airway collapsibility during sleep. *Journal of Applied Physiology.*, **102**, 510–512.

- Hunyor, I.; Cook, K. M., 2018: Models of intermittent hypoxia and obstructive sleep apnea: Molecular pathways and their contribution to cancer. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology.*, **315**, R669–R687.
- Jing, X.; Yang, F.; Shao, C.; Wei, K.; Xie, M.; Shen, H.; Shu, Y., 2019: Role of hypoxia in cancer therapy by regulating the tumor microenvironment. *Molecular Cancer.*, **18**, 1–15.
- Josserand, V.; Texier-Nogues, I.; Huber, P.; Favrot, M. C. C.; Coll, J. L. L., 2007: Non-invasive in vivo optical imaging of the lacZ and luc gene expression in mice. *Gene therapy.*, **14**, 1587–1593.
- Joyeux-Faure, M.; Jullian-Desayes, I.; Pepin, J. L. L.; Cracowski, J. L. L.; Baguet, J. P. P.; Tamisier, R.; Levy, P.; Godin-Ribuot, D.; Launois, S. H., 2016: Comparison of continuous positive airway pressure and bosentan effect in mildly hypertensive patients with obstructive sleep apnoea: A randomized controlled pilot study. *Respirology.*, **21**, 546–552.
- Jullian-Desayes, I.; Joyeux-Faure, M.; Tamisier, R.; Launois, S.; Borel, A. L.; Levy, P.; Pepin, J. L., 2015: Impact of obstructive sleep apnea treatment by continuous positive airway pressure on cardiometabolic biomarkers: a systematic review from sham CPAP randomized controlled trials. *Sleep medicine reviews.*, **21**, 23–38.
- Jurczok, A.; Fornara, P.; Söling, A., 2008: Bioluminescence imaging to monitor bladder cancer cell adhesion in vivo: A new approach to optimize a syngeneic, orthotopic, murine bladder cancer model. *BJU International.*
- Justus, C. R.; Leffler, N.; Ruiz-Echevarria, M.; Yang, L. V., 2014: In vitro Cell Migration and Invasion Assays. *Journal of Visualized Experiments.*
- Kakizaki, M.; Kuriyama, S.; Sone, T.; Ohmori-Matsuda, K.; Hozawa, A.; Nakaya, N.; Fukudo, S.; Tsuji, I., 2008: Sleep duration and the risk of breast cancer: the Ohsaki Cohort Study. *British journal of cancer.*, **99**, 1502–1505.
- Kang, H. S.; Kwon, H. Y.; Kim, I. K.; Ban, W. H.; Kim, S. W.; Kang, H. H.; Yeo, C. D.; Lee, S. H., 2020: Intermittent hypoxia exacerbates tumor progression in a mouse model of lung cancer. *Scientific Reports.*, **10**, 1854.
- Kasai, T.; Bradley, T. D., 2011: Obstructive sleep apnea and heart failure: pathophysiologic and therapeutic implications. *Journal of the American College of Cardiology.*, **57**, 119–127.
- Katt, M. E.; Placone, A. L.; Wong, A. D.; Xu, Z. S.; Searson, P. C., 2016: In Vitro Tumor Models: Advantages, Disadvantages, Variables, and Selecting the Right Platform. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology.*, **4**.
- Keith, B.; Johnson, R. S.; Simon, M. C., 2012: HIF1 α and HIF2 α : sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nature Reviews Cancer.*, **12**, 9–22.
- Kim, S. W. S. J.; Kim, J. S.; Kim, S. W. S. J.; Yun, S. J.; He, J.; Brantley, E.; Fan, D.; Strickner, P.; Lehembre, F.; Regenass, U.; Fidler, I. J., 2012: Antivascular therapy for multidrug-resistant ovarian tumors by macitentan, a dual endothelin receptor antagonist. *Translational oncology.*, **5**, 39–47.
- Kline, C. E.; Burke, L. E.; Sereika, S. M.; Imes, C. C.; Rockette-Wagner, B.; Mendez, D. D.; Strollo, P. J.; Zheng, Y.; Rathbun, S. L.; Chasens, E. R., 2018: Bidirectional Relationships Between Weight Change and Sleep Apnea in a Behavioral Weight Loss Intervention. *Mayo Clinic Proceedings.*, **93**, 1290–1298.

- Laaban, J. P.; Daenen, S.; Léger, D.; Pascal, S.; Bayon, V.; Slama, G.; Elgrably, F., 2009: Prevalence and predictive factors of sleep apnoea syndrome in type 2 diabetic patients. *Diabetes & metabolism.*, **35**, 372–377.
- Lavie, L.; Lavie, P., 2009: Molecular mechanisms of cardiovascular disease in OSAHS: the oxidative stress link. *European Respiratory Journal.*, **33**, 1467–1484.
- Lee, K.; Zhang, H.; Qian, D. Z.; Rey, S.; Liu, J. O.; Semenza, G. L., 2009: Acriflavine inhibits HIF-1 dimerization, tumor growth, and vascularization. *Proceedings of the National Academy of Sciences.*, **106**, 17910–17915.
- Levy, P.; Tamisier, R.; Minville, C.; Launois, S.; Pepin, J. L.; Lévy, P.; Tamisier, R.; Minville, C.; Launois, S.; Pépin, J. L.; Levy, P.; Tamisier, R.; Minville, C.; Launois, S.; Pepin, J. L., 2011: Sleep apnoea syndrome in 2011: current concepts and future directions. *European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society.*, **20**, 134–146.
- Lévy, P.; Louis Pépin, J.; Deschaux-Blanc, C.; Paramelle, B.; Brambilla, C., 1996: Accuracy of Oximetry for Detection of Respiratory Disturbances in Sleep Apnea Syndrome. *Chest.*, **109**, 395–399.
- Lévy, P.; Pépin, J. L.; Arnaud, C.; Tamisier, R.; Borel, J. C.; Dematteis, M.; Godin-Ribuot, D.; Ribuot, C., 2008: Intermittent hypoxia and sleep-disordered breathing: current concepts and perspectives. *The European respiratory journal.*, **32**, 1082–1095.
- Lévy, P.; Ryan, S.; Oldenburg, O.; Parati, G., 2013: Sleep apnoea and the heart. *European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society.*, **22**, 333–352.
- Lévy, P.; Kohler, M.; McNicholas, W. T.; Barbé, F.; McEvoy, R. D.; Somers, V. K.; Lavie, L.; Pépin, J. L., 2015: Obstructive sleep apnoea syndrome. *Nature Reviews Disease Primers.*, **1**, 15015.
- Li, C. W.; Xia, W.; Huo, L.; Lim, S. O.; Wu, Y.; Hsu, J. L.; Chao, C. H.; Yamaguchi, H.; Yang, N. K.; Ding, Q.; Wang, Y.; Lai, Y. J.; LaBaff, A. M.; Wu, T. J.; Lin, B. R.; Yang, M. H.; Hortobagyi, G. N.; Hung, M. C., 2012: Epithelial-mesenchymal transition induced by TNF- α requires NF- κ B-mediated transcriptional upregulation of Twist1. *Cancer research.*, **72**, 1290–1300.
- Li, L.; Ren, F.; Qi, C.; Xu, L.; Fang, Y.; Liang, M.; Feng, J.; Chen, B.; Ning, W.; Cao, J., 2018: Intermittent hypoxia promotes melanoma lung metastasis via oxidative stress and inflammation responses in a mouse model of obstructive sleep apnea. *Respiratory Research.*, **19**, 1–9.
- Lipsey, M. W.; Wilson, D. B., 2001: *Practical meta-analysis. Practical meta-analysis.*, Applied social research methods series; vol 49. Sage Publications, Inc, Thousand Oaks, CA, US, CA, US.
- Liu, L.; Liu, W.; Wang, L.; Zhu, T.; Zhong, J.; Xie, N., 2017: Hypoxia-inducible factor 1 mediates intermittent hypoxia-induced migration of human breast cancer MDA-MB-231 cells. *Oncology Letters.*, **14**, 7715–7722.
- Logan, A. G.; Perlikowski, S. M.; Mente, A.; Tisler, A.; Tkacova, R.; Niroumand, M.; Leung, R. S.; Bradley, T. D., 2001: High prevalence of unrecognized sleep apnoea in drug-resistant hypertension. *Journal of hypertension.*, **19**, 2271–2277.
- Lyons, S. K., 2005: Advances in imaging mouse tumour models in vivo. *Journal of Pathology.*
- Malhotra, A.; White, D. P., 2002: Obstructive sleep apnoea. *Lancet (London, England).*, **360**, 237–245.

Manus, J. M., 2019: Survie nette conditionnelle chez les personnes atteintes de cancer en France métropolitaine. *Revue Francophone des Laboratoires.*, **2019**, 14.

Marshall, N. S.; Wong, K. K. H.; Cullen, S. R. J.; Knuiman, M. W.; Grunstein, R. R., 2014: Sleep apnea and 20-year follow-up for all-cause mortality, stroke, and cancer incidence and mortality in the Busselton Health Study cohort. *Journal of clinical sleep medicine : JCSM : official publication of the American Academy of Sleep Medicine.*, **10**, 355–362.

Martínez-García, M. A.; Capote, F.; Campos-Rodríguez, F.; Lloberes, P.; Díaz de Atauri, M. J.; Somoza, M.; Masa, J. F.; González, M.; Sacristán, L.; Barbé, F.; Durán-Cantolla, J.; Aizpuru, F.; Mañas, E.; Barreiro, B.; Mosteiro, M.; Cebrián, J. J.; de la Peña, M.; García-Río, F.; Maimó, A. et al., 2013: Effect of CPAP on blood pressure in patients with obstructive sleep apnea and resistant hypertension: the HIPARCO randomized clinical trial. *JAMA.*, **310**, 2407–2415.

Mayer, P.; Pépin, J. L.; Bettega, G.; Veale, D.; Ferretti, G.; Deschaux, C.; Lévy, P., 1996: Relationship between body mass index, age and upper airway measurements in snorers and sleep apnoea patients. *The European respiratory journal.*, **9**, 1801–1809.

Mazeau-Woynar, V.; Cerf, N., 2010: *Survie attendue des patients atteints de cancers en France : état des lieux.*

McEvoy, R. D.; Antic, N. A.; Heeley, E.; Luo, Y.; Ou, Q.; Zhang, X.; Mediano, O.; Chen, R.; Drager, L. F.; Liu, Z.; Chen, G.; Du, B.; McArdle, N.; Mukherjee, S.; Tripathi, M.; Billot, L.; Li, Q.; Lorenzi-Filho, G.; Barbe, F. et al., 2016: CPAP for Prevention of Cardiovascular Events in Obstructive Sleep Apnea. *The New England journal of medicine.*, **375**, 919–931.

McKenzie, F.; Ferrari, P.; Freisling, H.; Chajès, V.; Rinaldi, S.; de Batlle, J.; Dahm, C. C.; Overvad, K.; Baglietto, L.; Dartois, L.; Dossus, L.; Lagiou, P.; Trichopoulos, D.; Trichopoulou, A.; Krogh, V.; Panico, S.; Tumino, R.; Rosso, S.; Bueno-de-Mesquita, H. B. A. et al., 2015: Healthy lifestyle and risk of breast cancer among postmenopausal women in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition cohort study. *International journal of cancer.*, **136**, 2640–2648.

McKeown, S. R., 2014: Defining normoxia, physoxia and hypoxia in tumours—implications for treatment response. *The British Journal of Radiology.*, **87**, 20130676.

McNicholas, W. T.; Bonsignore, M. R.; Bonsignore, M. R.; Management Committee of EU COST ACTION B26, 2007: Sleep apnoea as an independent risk factor for cardiovascular disease: current evidence, basic mechanisms and research priorities. *The European respiratory journal.*, **29**, 156–178.

McTiernan, A.; Kooperberg, C.; White, E.; Wilcox, S.; Coates, R.; Adams-Campbell, L. L.; Woods, N.; Ockene, J.; Women's Health Initiative Cohort Study, 2003: Recreational physical activity and the risk of breast cancer in postmenopausal women: the Women's Health Initiative Cohort Study. *JAMA.*, **290**, 1331–1336.

Michiels, C.; Tellier, C.; Feron, O., 2016: Cycling hypoxia: A key feature of the tumor microenvironment. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer.*, **1866**, 76–86.

Milani, M.; Harris, A. L., 2008: Targeting tumour hypoxia in breast cancer. *European Journal of Cancer.*, **44**, 2766–2773.

Minoves, M.; Morand, J.; Perriot, F.; Chatard, M.; Gonthier, B.; Lemarié, E.; Menut, J. B.; Polak, J.; Pépin, J. L.; Godin-Ribuot, D.; Briançon-Marjollet, A., 2017: An innovative intermittent hypoxia model for cell

cultures allowing fast PO₂ oscillations with minimal gas consumption. *American Journal of Physiology - Cell Physiology.*, **313**, C460–C468.

Mitchell, L. J.; Davidson, Z. E.; Bonham, M.; O’Driscoll, D. M.; Hamilton, G. S.; Truby, H., 2014: Weight loss from lifestyle interventions and severity of sleep apnoea: A systematic review and meta-analysis. *Sleep Medicine.*, **15**, 1173–1183.

Mitler, M. M.; Dawson, A.; Henriksen, S. J.; Sobers, M.; Bloom, F. E., 1988: Bedtime ethanol increases resistance of upper airways and produces sleep apneas in asymptomatic snorers. *Alcoholism, clinical and experimental research.*, **12**, 801–805.

Morand, J.; Arnaud, C.; Pepin, J. L.; Godin-Ribuot, D., 2018: Chronic intermittent hypoxia promotes myocardial ischemia-related ventricular arrhythmias and sudden cardiac death. *Scientific reports.*, **8**, 2997.

Nanduri, J.; Vaddi, D. R.; Khan, S. A.; Wang, N.; Makarenko, V.; Semenza, G. L.; Prabhakar, N. R., 2015: HIF-1 α Activation by Intermittent Hypoxia Requires NADPH Oxidase Stimulation by Xanthine Oxidase. (Schröder, K., Ed.) *PLOS ONE.*, **10**, e0119762.

Neilson, H. K.; Farris, M. S.; Stone, C. R.; Vaska, M. M.; Brenner, D. R.; Friedenreich, C. M., 2017: Moderate-vigorous recreational physical activity and breast cancer risk, stratified by menopause status: a systematic review and meta-analysis. *Menopause (New York, N.Y.)*, **24**, 322–344.

Nelson, J.; Bagnato, A.; Battistini, B.; Nisen, P., 2003: The endothelin axis: emerging role in cancer. *Nature reviews. Cancer.*, **3**, 110–116.

Nieto, F. J.; Peppard, P. E.; Young, T.; Finn, L.; Hla, K. M.; Farré, R., 2012: Sleep-disordered breathing and cancer mortality: Results from the Wisconsin Sleep Cohort Study. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.*, **186**, 190–194.

Oh, Y. S.; Choi, M. H.; Shin, J. I.; Maza, P. A. M. A.; Kwak, J. Y., 2020: Co-Culturing of Endothelial and Cancer Cells in a Nanofibrous Scaffold-Based Two-Layer System. *International journal of molecular sciences.*, **21**.

Pampaloni, F.; Reynaud, E. G.; Stelzer, E. H. K., 2007: The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nature reviews. Molecular cell biology.*, **8**, 839–845.

Pan, S. Y.; Zhou, J.; Gibbons, L.; Morrison, H.; Wen, S. W.; Canadian Cancer Registries Epidemiology Research Group [CCRERG], 2011: Antioxidants and breast cancer risk- a population-based case-control study in Canada. *BMC cancer.*, **11**, 372.

Paschall, A. V.; Liu, K., 2016: An Orthotopic mouse model of spontaneous breast cancer metastasis. *Journal of Visualized Experiments.*, **2016**, 1–7.

Patel, S. R.; White, D. P.; Malhotra, A.; Stanchina, M. L.; Ayas, N. T., 2003: Continuous positive airway pressure therapy for treating sleepiness in a diverse population with obstructive sleep apnea: results of a meta-analysis. *Archives of internal medicine.*, **163**, 565–571.

Peker, Y.; Carlson, J.; Hedner, J., 2006: Increased incidence of coronary artery disease in sleep apnoea: a long-term follow-up. *The European respiratory journal.*, **28**, 596–602.

- Peppard, P. E.; Young, T.; Palta, M.; Dempsey, J.; Skatrud, J., 2000: Longitudinal study of moderate weight change and sleep-disordered breathing. *JAMA.*, **284**, 3015–3021.
- Peppard, P. E.; Young, T.; Barnet, J. H.; Palta, M.; Hagen, E. W.; Hla, K. M., 2013: Increased prevalence of sleep-disordered breathing in adults. *American Journal of Epidemiology.*, **177**, 1006–1014.
- Petrova, V.; Annicchiarico-Petruzzelli, M.; Melino, G.; Amelio, I., 2018: The hypoxic tumour microenvironment. *Oncogenesis.*, **7**.
- Phillips, C. L.; Grunstein, R. R.; Darendeliler, M. A.; Mihailidou, A. S.; Srinivasan, V. K.; Yee, B. J.; Marks, G. B.; Cistulli, P. A., 2013: Health outcomes of continuous positive airway pressure versus oral appliance treatment for obstructive sleep apnea: a randomized controlled trial. *American journal of respiratory and critical care medicine.*, **187**, 879–887.
- Picon-Ruiz, M.; Morata-Tarifa, C.; Valle-Goffin, J. J.; Friedman, E. R.; Slingerland, J. M., 2017: Obesity and adverse breast cancer risk and outcome: Mechanistic insights and strategies for intervention. *CA: A Cancer Journal for Clinicians.*, **67**, 378–397.
- Puget, A. (Cnrs), 2002: *Le « point limite » en expérimentation animale. CNRS guidelines.*
- Randerath, W. J.; Verbraecken, J.; Andreas, S.; Bettge, G.; Boudewyns, A.; Hamans, E.; Jalbert, F.; Paoli, J. R.; Sanner, B.; Smith, I.; Stuck, B. A.; Lacassagne, L.; Marklund, M.; Maurer, J. T.; Pepin, J. L.; Valipour, A.; Verse, T.; Fietze, I., 2011: Non-CPAP therapies in obstructive sleep apnoea. *European Respiratory Journal.*, **37**, 1000–1028.
- Reutrakul, S.; Mokhlesi, B., 2017: Obstructive Sleep Apnea and Diabetes: A State of the Art Review. *Chest.*, **152**, 1070–1086.
- Rofstad, E. K.; Gaustad, J. V.; Egeland, T. A. M.; Mathiesen, B.; Galappathi, K., 2010: Tumors exposed to acute cyclic hypoxic stress show enhanced angiogenesis, perfusion and metastatic dissemination. *International journal of cancer.*, **127**, 1535–1546.
- Rosanò, L.; Spinella, F.; Bagnato, A., 2013: Endothelin 1 in cancer: Biological implications and therapeutic opportunities. *Nature Reviews Cancer.*, **13**, 637–651.
- Rosanò, L.; Cianfrocca, R.; Tocci, P.; Spinella, F.; Di Castro, V.; Caprara, V.; Semprucci, E.; Ferrandina, G.; Natali, P. G.; Bagnato, A., 2014: Endothelin A receptor/ β -arrestin signaling to the Wnt pathway renders ovarian cancer cells resistant to chemotherapy. *Cancer research.*, **74**, 7453–7464.
- Rosanò, L.; Bagnato, A., 2016: Endothelin therapeutics in cancer: Where are we? *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology.*, **310**, R469–R475.
- Rundqvist, H.; Johnson, R. S., 2013: Tumour oxygenation: implications for breast cancer prognosis. *Journal of internal medicine.*, **274**, 105–112.
- Savransky, V.; Nanayakkara, A.; Vivero, A.; Li, J.; Bevans, S.; Smith, P. L.; Torbenson, M. S.; Polotsky, V. Y., 2007: Chronic intermittent hypoxia predisposes to liver injury. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, **45**, 1007–1013.
- Saxena, K.; Jolly, M. K.; Saxena; Jolly; Saxena, K.; Jolly, M. K., 2019: Acute vs. Chronic vs. Cyclic Hypoxia: Their Differential Dynamics, Molecular Mechanisms, and Effects on Tumor Progression. *Biomolecules.*, **9**, 339.

- Semenza, G. L., 2009: Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Physiology (Bethesda, Md.)*, **24**, 97–106.
- Semenza, G. L., 2016: The hypoxic tumor microenvironment: A driving force for breast cancer progression. *Biochimica et biophysica acta.*, **1863**, 382–391.
- Semenza, G. L.; Prabhakar, N. R., 2018: The role of hypoxia-inducible factors in carotid body (patho) physiology. *The Journal of physiology.*, **596**, 2977–2983.
- Semprucci, E.; Tocci, P.; Cianfrocca, R.; Sestito, R.; Caprara, V.; Vegliione, M.; Castro, V. Di; Spadaro, F.; Ferrandina, G.; Bagnato, A.; Rosanò, L., 2016: Endothelin A receptor drives invadopodia function and cell motility through the β -arrestin/PDZ-RhoGEF pathway in ovarian carcinoma. *Oncogene.*, **35**, 3432–3442.
- Sidharta, P. N.; van Giersbergen, P. L. M.; Halabi, A.; Dingemanse, J., 2011: Macitentan: entry-into humans study with a new endothelin receptor antagonist. *European journal of clinical pharmacology.*, **67**, 977–984.
- Sillah, A.; Watson, N. F.; Schwartz, S. M.; Gozal, D.; Phipps, A. I., 2018: Sleep apnea and subsequent cancer incidence. *Cancer Causes & Control.*, **29**, 987–994.
- Suggitt, M.; Bibby, M. C., 2005: 50 Years of preclinical anticancer drug screening: Empirical to targetdriven approaches. *Clinical Cancer Research.*
- Sullivan, C. E.; Issa, F. G.; Berthon-Jones, M.; Eves, L., 1981: Reversal of obstructive sleep apnoea by continuous positive airway pressure applied through the nares. *Lancet (London, England)*, **1**, 862–865.
- Tamimi, R. M.; Spiegelman, D.; Smith-Warner, S. A.; Wang, M.; Pazaris, M.; Willett, W. C.; Eliassen, A. H.; Hunter, D. J., 2016: Population Attributable Risk of Modifiable and Nonmodifiable Breast Cancer Risk Factors in Postmenopausal Breast Cancer. *American journal of epidemiology.*, **184**, 884–893.
- Tamisier, R.; Pépin, J. L.; Rémy, J.; Baguet, J. P.; Taylor, J. A.; Weiss, J. W.; Lévy, P., 2011: 14 nights of intermittent hypoxia elevate daytime blood pressure and sympathetic activity in healthy humans. *The European respiratory journal.*, **37**, 119–128.
- Thomas, A.; Belaidi, E.; Moulin, S.; Horman, S.; van der Zon, G. C.; Viollet, B.; Levy, P.; Bertrand, L.; Pepin, J. L.; Godin-Ribuot, D.; Guigas, B., 2017: Chronic Intermittent Hypoxia Impairs Insulin Sensitivity but Improves Whole-Body Glucose Tolerance by Activating Skeletal Muscle AMPK. *Diabetes.*
- Thompson, S. R.; Ackermann, U.; Horner, R. L., 2001: Sleep as a teaching tool for integrating respiratory physiology and motor control. *Advances in physiology education.*, **25**, 101–116.
- Thorpy, M. J., 2012: Classification of Sleep Disorders. *Neurotherapeutics.*, **9**, 687–701.
- Titus-Ernstoff, L.; Longnecker, M. P.; Newcomb, P. A.; Dain, B.; Greenberg, E. R.; Mittendorf, R.; Stampfer, M.; Willett, W., 1998: Menstrual factors in relation to breast cancer risk. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology.*, **7**, 783–789.
- Tobaldini, E.; Costantino, G.; Solbiati, M.; Cogliati, C.; Kara, T.; Nobili, L.; Montano, N., 2017: Sleep, sleep deprivation, autonomic nervous system and cardiovascular diseases. *Neuroscience and biobehavioral reviews.*, **74**, 321–329.

- Toffoli, S.; Michiels, C., 2008: Intermittent hypoxia is a key regulator of cancer cell and endothelial cell interplay in tumours. *The FEBS journal.*, **275**, 2991–3002.
- Toffoli, S.; Roegiers, A.; Feron, O.; Van Steenbrugge, M.; Ninane, N.; Raes, M.; Michiels, C., 2009: Intermittent hypoxia is an angiogenic inducer for endothelial cells: role of HIF-1. *Angiogenesis.*, **12**, 47–67.
- Tomayko, M. M.; Reynolds, C. P., 1989: Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology.*, **24**, 148–154.
- Troy, T.; Jekic-McMullen, D.; Sambucetti, L.; Rice, B., 2004: Quantitative comparison of the sensitivity of detection of fluorescent and bioluminescent reporters in animal models. *Molecular Imaging.*
- Tufik, S.; Santos-Silva, R.; Taddei, J. A.; Bittencourt, L. R. A., 2010: Obstructive Sleep Apnea Syndrome in the Sao Paulo Epidemiologic Sleep Study. *Sleep Medicine.*, **11**, 441–446.
- Vaupel, P.; Mayer, A.; Briest, S.; Höckel, M., 2005: Hypoxia in Breast Cancer. *Oxygen Transport to Tissue XXVI*. Springer-Verlag, New York, pp. 333–342.
- Waks, A. G.; Winer, E. P., 2019: Breast Cancer Treatment: A Review. *JAMA - Journal of the American Medical Association.*, **321**, 288–300.
- Wang, Z.; Li, Z.; Ye, Y.; Xie, L.; Li, W., 2016: Oxidative Stress and Liver Cancer: Etiology and Therapeutic Targets. *Oxidative medicine and cellular longevity.*, **2016**, 7891574.
- Weiss, J. W.; Tamisier, R.; Liu, Y., 2015: Sympathoexcitation and arterial hypertension associated with obstructive sleep apnea and cyclic intermittent hypoxia. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985).*, **119**, 1449–1454.
- Weiswald, L. B.; Bellet, D.; Dangles-Marie, V., 2015: Spherical cancer models in tumor biology. *Neoplasia (New York, N.Y.).*, **17**, 1–15.
- Wetter, D. W.; Young, T. B.; Bidwell, T. R.; Badr, M. S.; Palta, M., 1994: Smoking as a risk factor for sleep-disordered breathing. *Archives of internal medicine.*, **154**, 2219–2224.
- White, D. P., 2005: Pathogenesis of obstructive and central sleep apnea. *American journal of respiratory and critical care medicine.*, **172**, 1363–1370.
- Xia, Y.; Shen, S.; Verma, I. M., 2014: NF- B, an Active Player in Human Cancers. *Cancer Immunology Research.*, **2**, 823–830.
- Yaggi, H. K.; Concato, J.; Kernan, W. N.; Lichtman, J. H.; Brass, L. M.; Mohsenin, V., 2005: Obstructive sleep apnea as a risk factor for stroke and death. *The New England journal of medicine.*, **353**, 2034–2041.
- Yamauchi, M.; Nakano, H.; Maekawa, J.; Okamoto, Y.; Ohnishi, Y.; Suzuki, T.; Kimura, H., 2005: Oxidative stress in obstructive sleep apnea. *Chest.*, **127**, 1674–1679.
- Yoon, D. W.; So, D.; Min, S.; Kim, J.; Lee, M.; Khalmuratova, R.; Cho, C. H.; Park, J. W.; Shin, H. W., 2017: Accelerated tumor growth under intermittent hypoxia is associated with hypoxia-inducible factor-1dependent adaptive responses to hypoxia. *Oncotarget.*, **8**, 61592–61603.

- Young, T.; Evans, L.; Finn, L.; Palta, M., 1997: Estimation of the Clinically Diagnosed Proportion of Sleep Apnea Syndrome in Middle-aged Men and Women. *Sleep.*, **20**, 705–706.
- Young, T.; Shahar, E.; Nieto, F. J.; Redline, S.; Newman, A. B.; Gottlieb, D. J.; Walsleben, J. A.; Finn, L.; Enright, P.; Samet, J. M.; Sleep Heart Health Study Research Group, 2002: Predictors of sleepdisordered breathing in community-dwelling adults: the Sleep Heart Health Study. *Archives of internal medicine.*, **162**, 893–900.
- Yu, J.; Zhou, Z.; McEvoy, R. D.; Anderson, C. S.; Rodgers, A.; Perkovic, V.; Neal, B., 2017: Association of Positive Airway Pressure With Cardiovascular Events and Death in Adults With Sleep Apnea: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA.*, **318**, 156–166.
- Yuan, G.; Nanduri, J.; Bhasker, C. R.; Semenza, G. L.; Prabhakar, N. R., 2005: Ca²⁺/calmodulin kinasedependent activation of hypoxia inducible factor 1 transcriptional activity in cells subjected to intermittent hypoxia. *The Journal of biological chemistry.*, **280**, 4321–4328.
- Yuan, G.; Nanduri, J.; Khan, S.; Semenza, G. L.; Prabhakar, N. R., 2008: Induction of HIF-1alpha expression by intermittent hypoxia: involvement of NADPH oxidase, Ca²⁺ signaling, prolyl hydroxylases, and mTOR. *Journal of cellular physiology.*, **217**, 674–685.
- Zhang, M.; Zhou, Z.; Zhao, Z.; Garrison, J., 2016: Targeting Tumor Hypoxia in Radiotherapy: A Brief Review of Historical Background and Recent Progress. *Exploratory Research and Hypothesis in Medicine.*, **1**, 17–28.
- Zhang, M., 2016: Targeting Tumor Hypoxia in Radiotherapy: A Brief Review of Historical Background and Recent Progress. *Exploratory Research and Hypothesis in Medicine.*, **1**.
- Zhao, Y.; Liao, Q.; Zhu, Y.; Long, H., 2011: Endothelin-1 promotes osteosarcoma cell invasion and survival against cisplatin-induced apoptosis. *Clinical orthopaedics and related research.*, **469**, 3190–3199.

TITRES ET TRAVAUX ANNEXES



Targeting intermittent hypoxia downstream pathways for biomarker discovery and new treatment perspectives in cutaneous melanoma

Mélanie Minovès, Jean-Louis Pépin and Diane Godin-Ribuot 

Affiliation: Université Grenoble Alpes, Inserm, CHU Grenoble Alpes, HP2, Grenoble, France.

Correspondence: Diane Godin-Ribuot, Université Grenoble Alpes, Inserm, CHU Grenoble Alpes, HP2, 38000 Grenoble, France. E-mail: Diane.Ribuot@univ-grenoble-alpes.fr

 @ERSpublications

Targeting the pathways induced by obstructive sleep apnoea-associated intermittent hypoxia could significantly improve biomarker discovery and new treatment perspectives in patients with cutaneous melanoma <http://ow.ly/wF3J30nlzL4>

Cite this article as: Minovès M, Pépin J-L, Godin-Ribuot D. Targeting intermittent hypoxia downstream pathways for biomarker discovery and new treatment perspectives in cutaneous melanoma. *Eur Respir J* 2019; 53: 1802444 [<https://doi.org/10.1183/13993003.02444-2018>].

Obstructive sleep apnoea and melanoma

In addition to being an independent risk factor for cardiometabolic disease [1], obstructive sleep apnoea (OSA) is now recognised as promoting cancer development. Although experimental [2, 3] and clinical [4, 5] evidence for this association appeared only a few years ago [6, 7], rapid advances have been made in the gap of knowledge regarding the types of cancers promoted by OSA and the oncogenic pathways involved.

A recent retrospective study on 34402 patients observed that overall cancer incidence was increased after OSA diagnosis and identified a specific link with melanoma, kidney, uterine and breast cancers [8]. The association between OSA and cutaneous melanoma has been confirmed by numerous preclinical and clinical studies showing that OSA promotes its incidence [9, 10], progression [2, 11], aggressiveness [11–13] and metastatic potential [3, 14]. In view of the poor 5-year survival rate of metastatic cutaneous melanoma [15], there is a strong need to characterise the association between OSA and cutaneous melanoma. This might allow identification of new prognostic factors for cutaneous melanoma progression and metastasis and open new avenues for innovative drugs and personalised therapies by targeting OSA as an important associated condition.

In the current issue of the *European Respiratory Journal*, CUBILLOS-ZAPATA *et al.* [16] propose soluble programmed cell death ligand 1 (sPD-L1) as a potential biomarker of cutaneous melanoma aggressiveness and metastasis in OSA patients. This is quite relevant in view of the major role of the programmed cell death receptor 1 (PD-1)/PD-L1 axis in melanoma development [15, 17], aggressiveness [18] and survival [19], but also because of its upregulation by intermittent hypoxia and by the hypoxia-inducible factor (HIF)-1 transcription factor in cutaneous melanoma cells (figure 1) [20–22].

Indeed, among the intermediary mechanisms associated with OSA (*i.e.* oxidative stress, sympathetic overactivity, inflammation and intermittent hypoxia), chronic intermittent hypoxia and HIF-1 activation are now widely recognised as the main contributors to deleterious cardiometabolic consequences [1, 23].

Received: Dec 23 2018 | Accepted: Jan 03 2019

Copyright ©ERS 2019

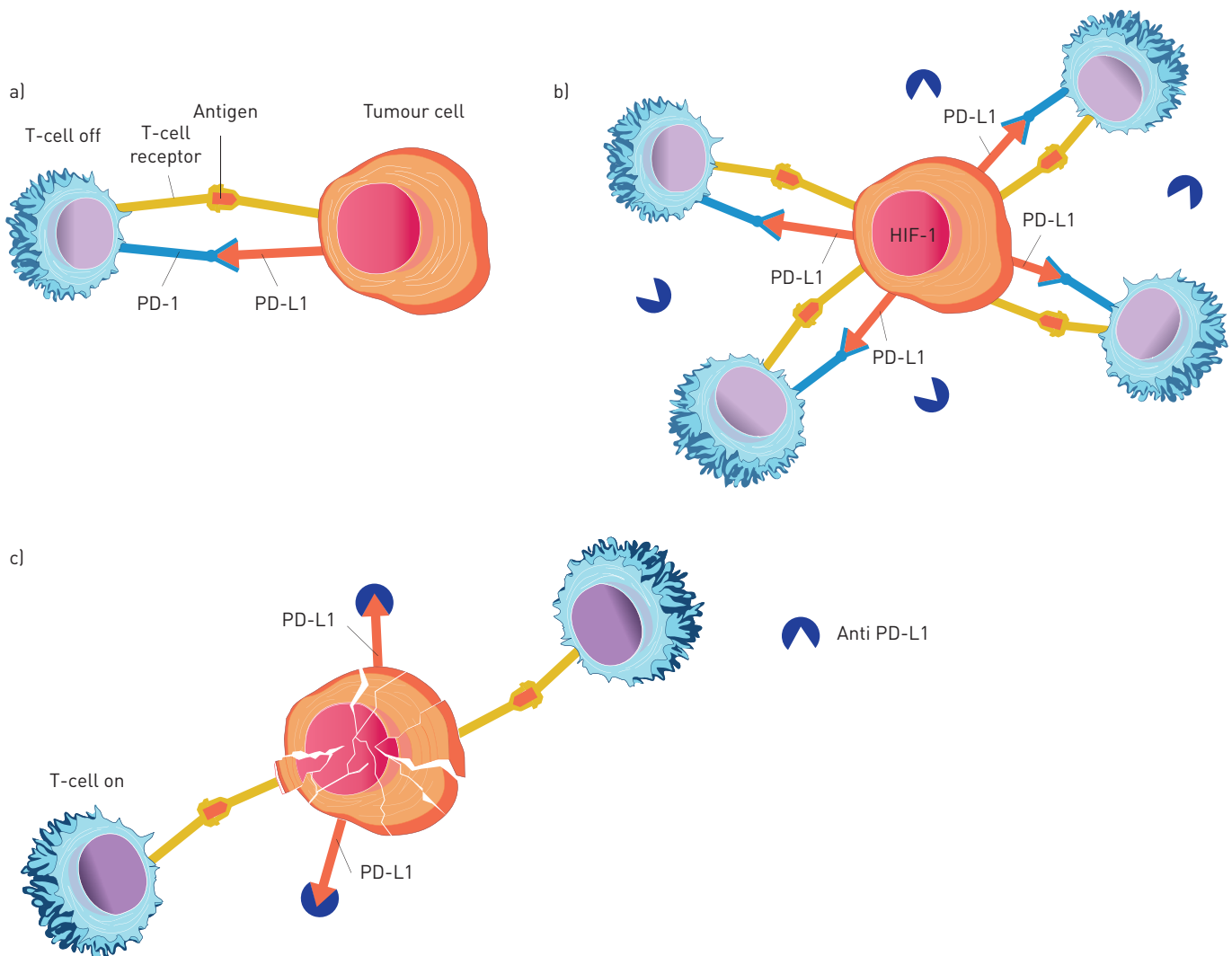


FIGURE 1 a) Immune checkpoint inhibition: binding of programmed cell death ligand 1 (PD-L1) on melanoma tumour cells to programmed cell death receptor 1 (PD-1) on T-cells inhibits their cytotoxic activity. b) Obstructive sleep apnoea (OSA)-related intermittent hypoxia promotes hypoxia-inducible factor (HIF)-1 activation and PD-L1 expression, resulting in increased tumour cell resistance to destruction mediated by T-cells and immune checkpoint inhibitors (such as anti-PD-L1). c) Proposed hypothesis behind the beneficial effects of continuous positive airway pressure treatment following OSA diagnosis: tumour cell death due to reduced PD-L1 expression with increased T-cell activity and increased anti-PD-L1 treatment efficacy.

Moreover, intermittent hypoxia and the related HIF-1 activation have also been shown to promote cancer development *in vitro* [11, 21, 24] and *in vivo* [2, 3, 10, 11, 14, 24].

The PD-1/PD-L1 immune checkpoint in melanoma aggressiveness

Advanced forms of cutaneous melanoma are known to be very aggressive and it is now well established that immunomodulation plays a key role in the mechanisms behind resistance to conventional cancer therapies [15]. This evidence stems from the seminal work of James P. Allison and Tasuku Honjo, for which they were awarded the 2018 Nobel prize in Medicine and Physiology, showing that the cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA-4) and the PD-1 pathways function as molecular “brakes” on the immune system [25]. Expression of surface antigens such as PD-L1 by melanoma cells and subsequent binding to cytotoxic T-cell PD-1 in the tumour microenvironment suppresses T-cell activity, leading to inhibition of antitumoral immune responses (figure 1) [25]. Therefore, “immune checkpoint” complexes such as PD-1/PD-L1 represent ideal targets for the development of prognostic and therapeutic tools for the management of cutaneous melanoma.

Advanced cutaneous melanoma is one of the first cancers where adjuvant immunotherapies targeting the immune checkpoint have been tested [15]. Chronologically, the first adjuvant immune checkpoint blocker

used was the CTLA-4-blocking antibody ipilimumab. Then, two PD-1 inhibitors, nivolumab and pembrolizumab, were rapidly introduced and routinely used in patients with metastatic melanoma, including those refractory to CTLA-4 blockade [25]. In a few years, adjuvant treatment strategies, including antibodies targeting the PD-1/PD-L1 axis in advanced melanoma, have thus significantly contributed to improvement of global survival and healing of cutaneous melanoma patients. In 2018, nivolumab was positioned as the new standard of care in advanced melanoma.

Regarding the value of PD-L1 as a prognostic marker of cancer evolution, recent data have shown that increased PD-L1 expression is associated with unfavourable outcome in various cancers, but there are conflicting reports regarding its prognostic value in others, such as colorectal cancer [26]. This discrepancy can be attributed to technical issues but also to the origin and form of PD-L1 investigated.

For instance, expression of PD-L1 by tumour cells and by tumour-infiltrating immune cells has opposite effects on colorectal cancer aggressiveness and metastasis [26]. Moreover, studies investigating the role of PD-L1 on cancer development should distinguish membrane PD-L1 expressed by tumour and immune cells from plasma sPD-L1 and other circulating PD-L1 sources [27]. Regarding melanoma, ZHOU *et al.* [28] recently demonstrated that sPD-L1 could be used as a prognostic marker of metastatic potential and response to immune checkpoint treatment. Interestingly, an even more recent study has shown the same prognostic value of PD-L1-containing exosomes produced by melanoma cells [29]. This is of particular importance since exosomal PD-L1, in contrast to sPD-L1, closely reflects PD-L1 expression by tumour and metastatic cells.

Why should sPD-L1 be a particularly reliable biomarker of melanoma aggressiveness and metastasis in the context of OSA?

In their multicentre cross-sectional observational study including 360 patients with newly diagnosed cutaneous melanoma, CUBILLOS-ZAPATA *et al.* [16] compared plasma sPD-L1 levels according to the presence and severity of OSA, and evaluated relationships with cutaneous melanoma aggressiveness and invasiveness [16]. Patients were divided into four groups (non-OSA, mild OSA, moderate OSA and severe OSA) according to their apnoea-hypopnoea index (AHI) assessed by overnight respiratory polygraphy. Well-established markers were used to evaluate cutaneous melanoma aggressiveness (mitotic index, tumour ulceration and stage) and invasiveness (Breslow index, Clark levels and sentinel lymph node positivity). An overall analysis of the cohort showed that sPD-L1 levels were higher in severe OSA *versus* mild or non-apnoeic patients and that they were positively and independently correlated with the AHI, both in the whole cohort and in OSA patients. However, there was a huge overlap between groups and correlations were weak, questioning the specificity of the relationship.

Selective analysis of OSA patients revealed that the highest sPD-L1 levels were found in patients with poor prognostic profiles. More specifically, increased sPD-L1 levels were associated with melanoma aggressiveness markers, such as high extension stage, deep tumour invasion, tumour ulceration and sentinel lymph node involvement. None of these results were observed in non-apnoeic patients, but the authors acknowledge that this could be due to the limited sample size of the non-OSA group.

Moreover, the value of sPD-L1 as a prognostic biomarker of aggressiveness and metastasis in OSA patients was confirmed by the net improvement provided by its incorporation in classical prediction models, and in particular in the positive sentinel lymph node risk prediction model, which led to a better classification of 27.3% of the cases.

In view of these results, the study by CUBILLOS-ZAPATA *et al.* [16] does indeed allow proposal of sPD-L1 as a potential biomarker of cutaneous melanoma aggressiveness and metastasis in OSA patients. This is also reinforced by the fact that PD-L1 expression is upregulated by intermittent hypoxia, a major hallmark of OSA, as previously demonstrated by the same group [20] and by others [22, 30]. In fact, PD-L1 has been formally identified as a target gene of HIF-1 [22], a transcription factor known to be involved in the deleterious cardiometabolic outcome of intermittent hypoxia/OSA [23] but also to worsen cutaneous melanoma prognosis [21, 30].

One of the major issues is to explore why some OSA patients develop more aggressive cutaneous melanoma than non-OSA patients. Studies have already shown that OSA is independently associated with increased aggressiveness of cutaneous melanoma [12, 13]. Moreover, intermittent hypoxia upregulates the PD-1/PD-L1 pathway in severe OSA patients without cancer, resulting in immunomodulation of CD8⁺ T-cell activity (figure 1) [20]. Such an effect of intermittent hypoxia on the PD-1/PD-L1 axis in a melanoma ecosystem may contribute to the deleterious effect of PD-L1 on cutaneous melanoma prognosis. Indeed, PD-L1 expression has been directly related to cutaneous melanoma aggressiveness [17–19, 29, 31]. A major issue in the field is understanding why some patients with cutaneous melanoma are non-responders to immune checkpoint inhibitors. Approximately 60% of patients show *de novo* resistance

to immune checkpoint inhibition and 20–30% of initial responders will eventually develop acquired resistance [32]. Deciphering the confounding role of intermittent hypoxia in this specific subgroup of patients might be a next step.

Finally, the study of CUBILLOS-ZAPATA *et al.* [16] is certainly important and by far the largest prospective multicentre study in the field, and the authors should be congratulated for this. However, as acknowledged by the authors themselves, sleep fragmentation, a major confounding mechanistic factor, has not been assessed in the current study. Such an evaluation is required in future studies. Moreover, sPD-L1 elevation does not demonstrate causality; that would require interventional studies. A research agenda might be anticipated as follows: 1) an OSA prevalence study in non-responders to immune checkpoint inhibitors; 2) randomised controlled trials comparing acute impact of several weeks of sham *versus* effective continuous positive airway pressure (CPAP) on sPD-L1 would be highly informative; 3) in case of positive results, CPAP should be tested as a combined therapy for improving the long-term control of cutaneous melanoma (figure 1); and 4) finally, in view of its secretion by tumour and metastatic cells, assay of exosomal PD-L1 [29] should be tested in OSA to potentiate patient stratification.

Due to the complexity and costs of such a research programme, an international consortium is highly desirable. After crossing all these “research checkpoints”, our wish is that the true impact of OSA and intermittent hypoxia on immunomodulation of cutaneous melanoma will be established and that the results will be of profit to melanoma patients.

Conflict of interest: None declared.

References

- Lévy P, Kohler M, McNicholas WT, *et al.* Obstructive sleep apnoea syndrome. *Nat Rev Dis Primers* 2015; 1: 15015.
- Almendros I, Montserrat JM, Ramírez J, *et al.* Intermittent hypoxia enhances cancer progression in a mouse model of sleep apnoea. *Eur Respir J* 2012; 39: 215–217.
- Almendros I, Montserrat JM, Torres M, *et al.* Intermittent hypoxia increases melanoma metastasis to the lung in a mouse model of sleep apnea. *Respir Physiol Neurobiol* 2013; 186: 303–307.
- Nieto FJ, Peppard PE, Young T, *et al.* Sleep-disordered breathing and cancer mortality: results from the Wisconsin Sleep Cohort Study. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 186: 190–194.
- Campos-Rodríguez F, Martínez-García MA, Martínez M, *et al.* Association between obstructive sleep apnea and cancer incidence in a large multicenter Spanish cohort. *Am J Respir Crit Care Med* 2013; 187: 99–105.
- Martínez-García MÁ, Campos-Rodríguez F, Farré R. Sleep apnoea and cancer: current insights and future perspectives. *Eur Respir J* 2012; 40: 1315–1317.
- Lévy P, Godin-Ribuot D, Pepin JL. Sleep apnoea and cancer: the new challenge. *Eur Respir J* 2014; 43: 1567–1570.
- Sillah A, Watson NF, Schwartz SM, *et al.* Sleep apnea and subsequent cancer incidence. *Cancer Causes Control* 2018; 29: 987–994.
- Gozal D, Ham SA, Mokhlesi B. Sleep apnea and cancer: analysis of a nationwide population sample. *Sleep* 2016; 39: 1493–1500.
- Gallego-Martin T, Farré R, Almendros I, *et al.* Chronic intermittent hypoxia mimicking sleep apnoea increases spontaneous tumorigenesis in mice. *Eur Respir J* 2017; 49: 1602111.
- Almendros I, Wang Y, Becker L, *et al.* Intermittent hypoxia-induced changes in tumor-associated macrophages and tumor malignancy in a mouse model of sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 2014; 189: 593–601.
- Martínez-García MÁ, Martorell-Calatayud A, Nagore E, *et al.* Association between sleep disordered breathing and aggressiveness markers of malignant cutaneous melanoma. *Eur Respir J* 2014; 43: 1661–1668.
- Martínez-García MA, Campos-Rodríguez F, Nagore E, *et al.* Sleep-disordered breathing is independently associated with increased aggressiveness of cutaneous melanoma: a multicenter observational study in 443 patients. *Chest* 2018; 154: 1348–1358.
- Li L, Ren F, Qi C, *et al.* Intermittent hypoxia promotes melanoma lung metastasis *via* oxidative stress and inflammation responses in a mouse model of obstructive sleep apnea. *Respir Res* 2018; 19: 28.
- Schadendorf D, van Akkooi ACJ, Berking C, *et al.* Melanoma. *Lancet* 2018; 392: 971–984.
- Cubillos-Zapata C, Martínez-García MÁ, Campos-Rodríguez F, *et al.* Soluble PD-L1 is a potential biomarker of cutaneous melanoma aggressiveness and metastasis in obstructive sleep apnoea patients. *Eur Respir J* 2019; 53: 1801298.
- Merelli B, Massi D, Cattaneo L, *et al.* Targeting the PD1/PD-L1 axis in melanoma: biological rationale, clinical challenges and opportunities. *Crit Rev Oncol Hematol* 2014; 89: 140–165.
- Audrito V, Serra S, Stingi A, *et al.* PD-L1 up-regulation in melanoma increases disease aggressiveness and is mediated through miR-17-5p. *Oncotarget* 2017; 8: 15894–15911.
- Massi D, Brusa D, Merelli B, *et al.* PD-L1 marks a subset of melanomas with a shorter overall survival and distinct genetic and morphological characteristics. *Ann Oncol* 2014; 25: 2433–2442.
- Cubillos-Zapata C, Avendaño-Ortiz J, Hernandez-Jimenez E, *et al.* Hypoxia-induced PD-L1/PD-1 crosstalk impairs T-cell function in sleep apnoea. *Eur Respir J* 2017; 50: 1700833.
- Yoon DW, So D, Min S, *et al.* Accelerated tumor growth under intermittent hypoxia is associated with hypoxia-inducible factor-1-dependent adaptive responses to hypoxia. *Oncotarget* 2017; 8: 61592–61603.
- Barsoum IB, Smallwood CA, Siemens DR, *et al.* A mechanism of hypoxia-mediated escape from adaptive immunity in cancer cells. *Cancer Res* 2014; 74: 665–674.
- Belaidi E, Morand J, Gras E, *et al.* Targeting the ROS-HIF-1-endothelin axis as a therapeutic approach for the treatment of obstructive sleep apnea-related cardiovascular complications. *Pharmacol Ther* 2016; 168: 1–11.

- 24 Campillo N, Torres M, Vilaseca A, *et al.* Role of cyclooxygenase-2 on intermittent hypoxia-induced lung tumor malignancy in a mouse model of sleep apnea. *Sci Rep* 2017; 7: 44693.
- 25 Wolchok J. Putting the immunologic brakes on cancer. *Cell* 2018; 175: 1452–1454.
- 26 Lee KS, Kim BH, Oh HK, *et al.* Programmed cell death ligand-1 protein expression and CD274/PD-L1 gene amplification in colorectal cancer: implications for prognosis. *Cancer Sci* 2018; 109: 2957–2969.
- 27 Zhu X, Lang J. Soluble PD-1 and PD-L1: predictive and prognostic significance in cancer. *Oncotarget* 2017; 8: 97671–97682.
- 28 Zhou J, Mahoney KM, Giobbie-Hurder A, *et al.* Soluble PD-L1 as a biomarker in malignant melanoma treated with checkpoint blockade. *Cancer Immunol Res* 2017; 5: 480–492.
- 29 Chen G, Huang AC, Zhang W, *et al.* Exosomal PD-L1 contributes to immunosuppression and is associated with anti-PD-1 response. *Nature* 2018; 560: 382–386.
- 30 Almendros I, Martínez-García MÁ, Campos-Rodríguez F, *et al.* Intermittent hypoxia is associated with high hypoxia inducible factor-1 α but not high vascular endothelial growth factor cell expression in tumors of cutaneous melanoma patients. *Front Neurol* 2018; 9: 272.
- 31 Chen L, Han X. Anti-PD-1/PD-L1 therapy of human cancer: past, present, and future. *J Clin Invest* 2015; 125: 3384–3391.
- 32 Syn NL, Teng MWL, Mok TSK, *et al.* De-novo and acquired resistance to immune checkpoint targeting. *Lancet Oncol* 2017; 18: e731–e741.

Prevalence of Obstructive Sleep Apnea in patients with hepatocellular carcinoma: study protocol of a cross-sectional, multicenter study.

Mélanie Minovés^{1,2*} Thomas Decaens^{3,4*}, Gael Roth^{3,4}, Adeline Paris⁶, Jonathan Gaucher¹, Ingrid Julian-Desayes⁸, Pierrick Bedouch^{2,7}, Renaud Tamisier^{1,5}, Sébastien Bailly¹, Jean-Louis Pépin^{1,5,¥}, Charlotte E. Costentin^{1,3¥}

*Co-first authors

¥Co-senior authors

1. HP2 Laboratory, INSERM, U1042/University Grenoble Alpes, Grenoble, France
2. Pôle pharmacie, CHU Grenoble-Alpes, Grenoble, France
3. Clinique Universitaire d'Hépatogastroentérologie et Oncologie Digestive, CHU Grenoble-Alpes, Grenoble, France CHU
4. Institute for Advanced Biosciences Inserm U 1209/CNRS 5309/ University Grenoble Alpes, Grenoble, France
5. Pôle Thorax et Vaisseaux, CHU Grenoble-Alpes, Grenoble, France
6. Centre d'Investigation Clinique, CHU Grenoble-Alpes, Grenoble, France
7. CNRS (UMR5525), TIMC-IMAG, Grenoble 38000, France
8. Centre Hospitalier Métropole-Savoie, Chambéry

Corresponding author:

Charlotte E. Costentin

Clinique Universitaire d'Hépatogastroentérologie, Pôle Digidune

Centre Hospitalier Universitaire Grenoble Alpes (CHUGA) Avenue

Maquis du Grésivaudan, 38700 La Tronche, France.

Phone number: +33 4 76 76 93 68 Fax number: +33 4 76 76 51 79 Email

address: ccostentin.pro@chu-grenoble.fr

Keywords: Prevalence, Obstructive Sleep Apnea, Hepatocellular Carcinoma, Nonalcoholic

Steatohepatitis

Abstract

Introduction: Obstructive Sleep Apnoea (OSA) characterized by chronic intermittent hypoxia is one of the most prevalent chronic diseases worldwide. Intermittent hypoxia and sleep fragmentation are key intermediary mechanisms underlying significant cardiovascular and metabolic consequences including nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), frequently observed in patients with OSA. OSA has been associated with cancer incidence and aggressiveness. NAFLD plays an increasingly important part for

the increase in hepatocellular carcinomas (HCC), the fourth most common cause of cancer-related death worldwide. Our hypothesis is that OSA promotes progression from steatosis to Non-Alcoholic Steatohepatitis (NASH), and could facilitate HCC development or aggressiveness in a context of NASH. No study to date has thoroughly investigated OSA prevalence in patients with HCC, nor HCC features according to OSA status. We aim to assess the prevalence of OSA in patients with NASH-related HCC compared to HCV-related HCC and describe liver and HCC clinical and pathological characteristics and prognosis in OSA compared to non-OSA patients.

Methods and analysis: This cross-sectional, multicenter, non-randomized observational study will include adults with NASH-related or HCV-related HCC (matched 1:2) participating in the French Liver Biobanks network: INCa, BB-0033-00085 (CRB-Foie). Epidemiological, clinical, and pathological data will be retrieved from the French Liver Cancer Biobanks Network database. To determine OSA status, patients will make pulse oximetry recordings and complete questionnaires assessing OSA-related symptoms and sleep quality. The prevalence of OSA between NASH-related and HCV-related HCC patients will be compared. Associations between OSA features and liver disease parameters (NASH and HCC) will be estimated by multivariate logistic regression analysis; and between HCC prognostic factors and OSA by logistic regressions.

Ethics and dissemination: This study ECHAPS-38RC17-410 was approved by the Ethics Committee “Comité de Protection des Personnes-Ile de France VII” on August 23, 2019. The results will be presented at scientific meetings and published in peer-reviewed journals.

Registration: NCT04190498

ARTICLE SUMMARY

Article focus

- Our hypothesis is that OSA is more prevalent in NASH-related HCC compared to HCV-related HCC and that OSA is associated with more advanced liver disease and more aggressive HCC.

Key messages

- Hepatocellular carcinoma carries a poor prognosis. Identifying new risk factors may improve disease prevention and prognosis.

- OSA is a prevalent condition which should be screened in patients with NASH and treatment initiated when appropriate.

Strengths and limitations of this study

- This study focuses on a major public health issue.

- To our knowledge this is the first study investigating OSA prevalence in patients with HCC and HCC characteristics according to OSA status and severity.

- The validation of our hypothesis that OSA is more prevalent in NASH-related HCC compared to HCV-related HCC and is associated with more advanced underlying liver disease and more aggressive HCC, would provide a strong rationale to design larger-scale studies and interventions.

- One limitation of our study is that OSA diagnosis is based simply on home oximetry to ensure greater acceptance by a eligible patients. But a polysomnography will be systematically proposed to patients with positive oximetry results.

Introduction

Obstructive Sleep Apnoea (OSA) (Lévy et al., 2015) is one of the most prevalent chronic diseases affecting nearly one billion people worldwide.(Benjafield et al., 2019) Half of these patients have moderate to severe OSA, defined by an Apnoea + Hypopnea Index (AHI) ≥ 15 . In France OSA affects several millions of individuals.(Benjafield et al., 2019)

OSA is characterized by the repetitive occurrence of partial (hypopneas) or complete (apnoeas) collapse of the upper airway during sleep leading to cyclic desaturation-reoxygenation sequences, called intermittent hypoxia (IH). Intermittent hypoxia and sleep fragmentation owing to the microarousals that terminate apnoeas and hypopneas are the key intermediary mechanisms underlying the significant cardiovascular and metabolic consequences of OSA. These include hypertension, coronary artery disease, cerebrovascular disease, and also insulin-resistance and

diabetes.(Lévy et al., 2009; Levy et al., 2012) It is therefore not surprising that OSA has also been significantly associated with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD).(Aron-Wisnewsky et al., 2016; Mesarwi et al., 2019)

NAFLD is nowadays one of the dominant causes of chronic liver disease in Western countries, especially in the US, as a consequence of the epidemic levels of obesity, also associated with type-II diabetes and/or dyslipidemia.(Hashimoto et al., 2013) NAFLD is associated with increased risks of cardiovascular as well as liver events such as portal hypertension, liver fibrosis or cirrhosis. Indeed, in 10% of cases, NAFLD may progress to NASH, defined as the combination of steatosis, inflammation, fibrosis and necrosis, which may lead to cirrhosis (0.2-3%) and in the end stage disease to hepatocellular carcinoma (HCC) (0.3-2.6%).(Younossi et al., 2015; D'Avola et al., 2016) Liver cancer is the fourth leading cause of cancer deaths worldwide, and hepatocellular carcinoma (HCC) accounts for 90% of all liver cancers.(Fitzmaurice et al., 2017) According to the French Institute of Health Watch (InVS), the annual incidence of HCC in France in 2013 was 12.1 and 2.4 per 100 000 persons among men and women respectively. In more than 90% of cases, HCC developed in a context of cirrhosis induced by viral hepatitis (HBV or HCV), or alcoholic or non-alcoholic steatohepatitis, but a shift in the underlying causes is expected due to the efficacy of treatments for HCV and HBV hepatitis and the parallel huge increase in NAFLD. NASH-related HCC is predicted to become a leading cause of liver cancer mortality in the near future since metabolic syndrome, obesity and diabetes are in constant progression and there are needs to better define their triggering mechanisms and actionable risk factors.(Rinella, 2015) OSA has been independently associated with the increased incidence and progression of NASH and liver fibrosis in NALFD populations.(Sookoian et al., 2013; Minville et al., 2014; Corey et al., 2015; Lin et al., 2015; Aron-Wisnewsky et al., 2016) Non-alcoholic fatty liver disease, in turn, is an established risk factor for the incidence of hepatocellular carcinoma, raising the question as to the potential impact of OSA on NASH-related HCC development. Indeed, several studies have shown that IH stimulates cancer cells resulting in increased tumour growth, invasiveness, aggressiveness and also resistance to chemotherapy and radiation. (Almendros et al., 2012 a; b, 2013, 2014) In addition, recent reports suggest that OSA is independently associated with an increased risk of cancer,(Nieto et al., 2012;

Martínez-García et al., 2014) and that among different cancer sites there is an increased risk of HCC. Taken together, these data support the hypothesis that OSA might trigger NAFLD progression and in turn affect HCC incidence and progression, especially in patients with underlying NAFLD. However, data relating to OSA and HCC together are scarce. To our knowledge, only one observational study from a US health insurance database, has reported that OSA is associated with an increased risk of a limited number of types of cancer, not including liver cancer. (Gozal et al., 2016) However, these results were flawed by many confounding factors including body mass index (BMI). In addition, there is no data available regarding the prevalence of OSA in patients with HCC or HCC characteristics by OSA status and whether OSA status would affect NASH-related and non-NASH related HCC differently. Our aim is to assess the prevalence of OSA in patients undergoing curative resection for HCC and compare two groups of patients with distinct underlying liver diseases, NASH or chronic hepatitis C (HCV). Given the prevalence of OSA in the general population, we hypothesize that the observed prevalence in HCC will represent a sufficiently large group to study the dose-response effect between

OSA severity and HCC features and prognosis.

Methods and analysis

The *Primary objective* is to assess the prevalence of OSA in patients with a history of liver resection for NASH-related HCC compared to a control group of patients with history of liver resection for HCV-related HCC.

Secondary objectives are to:

- Assess and compare the prevalence of OSA in NASH-related HCC patients with or without cirrhosis.
- Assess and compare the prevalence of OSA in NASH-related HCC patients with or without Fibrosis.
- Compare the NAS score between OSA and non-OSA patients based on histological reports. - Compare prognosis factors of HCC between OSA and non-OSA patients in each group (NASH and HCV-related HCC).
- Compare survival (overall and progression-free survival) and tumour recurrence rates between OSA and non-OSA patients in each group (NASH and HCV-related HCC).

Obstructive sleep apnoea diagnosis

The diagnosis of OSA will be made initially by pulse oximetry recordings using an oximeter (BlueNight® Screener, SleepInnov Technology, France), a reliable and portable device allowing a simplified homebased diagnosis of OSA. A specific algorithm provides the 2, 3 and 4% mean oxygen desaturation index (ODI), mean and minimum natural oxygen saturation and time spent below 90% SaO₂. In addition, the micro-arousal index will be estimated by pulse wave amplitude variations. Oximetry recording will be made during a single night, at the patient's home. A diagnosis of OSA will be considered if the 3% ODI is > 10, i.e. if more than ten desaturations greater than 3% occur per hour of recording during sleep.(Craig et al., 2012) The 3% ODI is a sensitive and specific parameter of OSA that is highly correlated with AHI. Additional oximetry parameters from the oximetry report will be examined, such as the 2% ODI and 4% ODI, minimal nocturnal saturation, mean nocturnal saturation, time spent with oxygen saturation < 90% (Tsat 90%), micro-arousals events associated with desaturation periods superior to 2, 3 and 4%. If OSA is diagnosed, associated investigator will be informed and a polysomnography, the gold standard OSA diagnostic method, will be organized to confirm diagnosis and initiate OSA treatment.

Study design and population

This is a cross-sectional, multicentre, non-randomized study including adult patients with NASH-related or HCV-related HCC participating in the French Liver Cancer Biobank Network (LCBN) – INCa, BB-0033-00085 (CRB-Foie). The LCBN database collects epidemiological, clinical, anatomical and pathological data from patients with available resected HCC specimens (serum, liver and tumour). Currently there are more than 2,500 patients included in this prospective database. The study will focus on NASH-related HCC. HCV-related HCC was chosen as a control group because of HCV is a frequent cause of HCC with a distinct physiopathology compared to NASH-related HCC. Based on a pragmatic analysis of availability via the LCBN database, a 5-year period is needed to ensure sufficient recruitment.

Patient screening

The LCBN database allows pre-screening of adult patients with NASH or HCV-related HCC resected within the last 5 years in one of the 5 participating centres. Patients with any of the following criteria

will not be included: ongoing or history of alcohol consumption greater than 20g/d or 30g/d for females or males respectively; vascular invasion assessed by pathology examination of the resection; genotype 3 HCV infection; liver disease due to other aetiologies; another chronic respiratory disorder (chronic obstructive pulmonary disease, respiratory failure); weight change greater than 5% since surgery; menopausal status change, pregnant or breastfeeding women; subject already participating in another study; retention centre inmates or adults protected by law; patient not affiliated to French social security or equivalent; patient thought unlikely to cooperate or respect the obligations inherent to the study. Items to collect are listed in Table 1. Each NASH-related HCC patient will be matched with one HCV-related HCC patients. Adjustment with confounding factors such as age (± 5 years), sex, body mass index (± 2 kg/m²) and tumour stage according to the Barcelona-Clinic Liver *Cancer* (BCLC) system will be used.(Galle et al., 2018)

We do not anticipate significant changes in sleep apnoea status over the 5 years window provided that:1) weight has not changed by more than 5%, 2) there is no change in menopausal status since surgery.

Once identified in the LCBN, patients will be contacted by phone (V1) to present study protocol, to confirm eligibility criteria and assess their interest in participating in the study. If they express interest, they will be sent an information letter and an inclusion visit (V2) will be organized in one of the six participating centres. Ideally, this visit will coincide with the next follow-up consultation scheduled with their referent hepatologist during which eligibility criteria will be checked and the Informed Consent Form (ICF) signed. Then a medical examination will be performed including weight and height and an assessment of OSA medical history or symptoms. Data will be entered in the MARS electronic medical record (EMR) (https://mars-database.science/users/sign_in). The patient will be shown how to use the oximeter by a qualified staff member and be asked to complete the Pittsburgh Sleep Quality Index (PSQI) and Epworth Sleepiness Scale (ESS) questionnaires (included in the EMR). The patient will be provided with an oximeter to perform a single overnight oximetry recording to be done at home within five days following the inclusion visit. The device will be returned to the investigating centre by post and raw oximetry data will be sent to the coordinating centre (Grenoble Alpes University Hospital

(CHUGA) Grenoble, France) for centralized analysis by two blinded experienced investigators (JLP and RT).

Data collection

All data will be recorded in the secure MARS electronic medical record (EMR) stored in the sponsor's (CHUGA) data centre, including data required for eligibility assessment.

The impact of OSA on patient reported outcomes will be evaluated through the PSQI and ESS questionnaires which are routinely used to rapidly quantify sleep and excessive daytime sleepiness respectively. (Buysse et al., 1989; Johns, 1991, 1994) The PSQI, the most widely used instrument assessing sleep quality, is a 19-item self-administered questionnaire used for evaluation of subjective sleep quality over a 1-month period. The items (each scored from 0 to 3) generate 7 clinically derived sub-scores regarding sleep quality, latency, duration, habitual sleep efficiency, sleep disturbance, use of sleeping medication, and daytime dysfunction. ESS is a self-administered questionnaire to assess daytime sleepiness, with higher scores indicating increased daytime hyper somnolence. Respondents are asked to rate, on a 4-point scale, their usual risk of dozing off or falling asleep while engaged in eight different activities.

Histologic data pertaining to NASH severity, histological and biological data related to HCC aggressiveness, data on tumour recurrence and survival at months 12 and 24 will be collected from the LCBN (Table 1).

Follow-up and safety

For a given patient, the study will last no more than two months, with a single visit to the centre (inclusion visit, V2). Two weeks after the nocturnal oximetry recording, the patient will be contacted by phone to collect feedback on study procedures and any adverse event (V3) (Figure 1). Oximeter use is safe, and no adverse event is expected. Any unexpected or severe event will be systematically recorded and declared to the sponsor and investigators within 24 hours. Survival data at 12 and 24 months will be retrieved from medical records and follow-up phone calls (Figure 2).

Patient and public involvement

Patients are responsible for sleep quality and daytime sleepiness self-assessments via the PSQI and ESS questionnaires respectively. After training by the study staff patients will be entrusted to make their own oximetry recordings at home.

Statistical considerations

The sample size estimation was based on a cross-analysis between OSA prevalence in NASH patients (estimated around to 60% (Corey et al., 2015)), OSA prevalence in the general French population (estimated around 5% and 20% before or after age 65 respectively (Fuhrman et al., 2012)) and NASH-related versus HCV-related HCC prevalence (15% and 20% respectively (Trichopoulos et al., 2011; van Meer et al., 2015)). Based on these prevalence data, we expect a 60% prevalence rate of OSA in NASH patients and 20% in HCV patients. Based on a chi-square test of 2 proportions, 57 patients with NASH-related HCC and 57 patients with HCV-related HCC will be necessary to demonstrate OSA proportions of 60% and 34% in the NASH and HCV groups respectively, with a power of 80% and an α -risk of 5% (Figure 3). A lower proportion of OSA among patients with HCV-induced HCC will result in higher statistical power.

A comparison of the proportions of patients with OSA according to NASH severity (stage), cirrhosis and fibrosis will be conducted.

The association between HCC prognosis factors and OSA will be explored by logistic regressions for each of the measured factors and expressed by the Odds Ratio. Prognosis factors will be defined by a score as published by Johnson

The Kaplan-Meier method and log-rank test will be used to compare overall survival, progression-free survival, and tumour recurrence among all patients with or without OSA.

All analyses will be conducted using SAS V.9.4 (SAS Institute, Cary, North Carolina, USA), with the significance level set at 0.05 in the two-tailed tests.

Missing value will be considered based on the results.

Adjustment with confounding factors will be done and a propensity score matching for secondary outcome will be used to refine the analysis.

Ethics and dissemination

The ECHAPS-38RC17-410 study was approved by the French Ethics Committee “Comité de Protection des Personnes-Ile de France VII” on August 23, 2019 and is registered on ClinicalTrials.gov (NCT04190498). The first phone contact (V1) with the first patient is expected in July 2020. The study results will be presented at respiratory and/or liver related scientific meetings and published in peerreviewed journals.

Discussion / Perspectives

Despite the growing evidence linking OSA and the progression of NAFLD, and a recent report suggesting OSA could increase the incidence or aggressiveness of cancers, no well-designed study has carefully investigated OSA prevalence and impact in patients with HCC. The primary aim of this study is to assess the prevalence of OSA in patients having undergone liver resection for NASH-related HCC compared to a control group of patients who have had liver resection for HCV-related HCC. We hypothesize that OSA is more prevalent in NASH-related HCC compared to HCV-related HCC and that OSA is associated with more advanced underlying liver disease and more aggressive HCC (microvascular invasion, dedifferentiated tumour, macro-trabecular HCC subtype, satellite nodules etc.). Our priority is to demonstrate that screening for OSA should become systematic within the standard care of NASH and HCC. Our findings could support an update of clinical practice guidelines relating to the screening and management of OSA, including early initiation of continuous positive airway pressure therapy when required.

A potential limitation of our study is the initial OSA diagnosis modality, which is based on oximetry and not on the gold standard, polysomnography. However, we believe oximetry will ensure greater acceptance among eligible patients given the simplicity of the procedure compared to polysomnography that requires overnight hospitalization. Furthermore, since confirmation with a

polysomnography will be systematically proposed to patients with positive oximetry results, we are confident that OSA will be accurately assessed.

Also, given the selection process will be carried out after HCC treatment, we will not be able to precisely document timelines between OSA and HCC onset. We consider this study a mandatory first step, generating exploratory data to support large scale prospective studies.

Our results might also provide clues into how chronic IH could be involved in NASH-related carcinogenesis potentially offering new perspectives for targeted therapies, considering the poor prognosis of HCC. If our hypothesis is confirmed we plan an ancillary study to explore the underlying mechanisms involved using tumour and non-tumour frozen samples provided by The French Liver Biobanks Network to explore the role of various signalling pathways such as HIF-1, NF- κ B, clock genes or ROS in the progression of NAFLD to HCC.

By exploring OSA as a potential risk factor for HCC occurrence and/or its aggressiveness, this study should contribute to our understanding of digestive oncology, support a change in guidelines regarding OSA screening and management in patients with NAFLD at risk of HCC and improve the quality of life as well as prognosis of patients with NASH and HCC

Acknowledgement

We thank Alison Foote (Grenoble Alpes University Hospital, France) for editing the manuscript.

Authors' contributions: state how each author was involved in writing the protocol.

Study concept and design: Mélanie Minovés, Thomas Decaens, Jonathan Gaucher, Ingrid Julian-Desayes, Renaud Tamisier, Sébastien Bailly, Jean-Louis Pépin, Charlotte E Costentin

Drafting of the manuscript: Mélanie Minovés, Charlotte E Costentin

Critical revision and final approval of the manuscript: Mélanie Minovés, Thomas Decaens, Pierrick Bedouch, Renaud Tamisier, Sébastien Bailly, Jean-Louis Pépin, Charlotte E Costentin.

Funding: This work is supported by AGIRADOM (<https://www.agiradom.com>)

Competing interests statement: The authors declare no competing interests related to this study

References

- Almendros, I.; Montserrat, J. M.; Ramirez, J.; Torres, M.; Duran-Cantolla, J.; Navajas, D.; Farre, R., 2012a: Intermittent hypoxia enhances cancer progression in a mouse model of sleep apnoea. *European Respiratory Journal.*, **39**, 215–217.
- Almendros, I.; Montserrat, J. M.; Torres, M.; Bonsignore, M. R.; Chimenti, L.; Navajas, D.; Farré, R., 2012b: Obesity and intermittent hypoxia increase tumor growth in a mouse model of sleep apnea. *Sleep Medicine.*, **13**, 1254–1260.
- Almendros, I.; Montserrat, J. M.; Torres, M.; Dalmases, M.; Cabañas, M. L.; Campos-Rodríguez, F.; Navajas, D.; Farré, R., 2013: Intermittent hypoxia increases melanoma metastasis to the lung in a mouse model of sleep apnea. *Respiratory Physiology & Neurobiology.*, **186**, 303–307.
- Almendros, I.; Wang, Y.; Becker, L.; Lennon, F. E.; Zheng, J.; Coats, B. R.; Schoenfelt, K. S.; Carreras, A.; Hakim, F.; Zhang, S. X.; Farré, R.; Gozal, D., 2014: Intermittent hypoxia-induced changes in tumor-associated macrophages and tumor malignancy in a mouse model of sleep apnea. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.*, **189**, 593–601.
- Aron-Wisnewsky, J.; Clement, K.; Pépin, J. L., 2016: Nonalcoholic fatty liver disease and obstructive sleep apnea. *Metabolism: clinical and experimental.*, **65**, 1124–1135.
- Benjafield, A. V.; Ayas, N. T.; Eastwood, P. R.; Heinzer, R.; Ip, M. S. M.; Morrell, M. J.; Nunez, C. M.; Patel, S. R.; Penzel, T.; Pépin, J. L.; Peppard, P. E.; Sinha, S.; Tufik, S.; Valentine, K.; Malhotra, A., 2019: Estimation of the global prevalence and burden of obstructive sleep apnoea: a literature-based analysis. *The Lancet Respiratory Medicine.*, **7**, 687–698.
- Buysse, D. J.; Reynolds, C. F.; Monk, T. H.; Berman, S. R.; Kupfer, D. J., 1989: The Pittsburgh sleep quality index: A new instrument for psychiatric practice and research. *Psychiatry Research.*, **28**, 193–213.
- Corey, K. E.; Misdraji, J.; Gelrud, L.; King, L. Y.; Zheng, H.; Malhotra, A.; Chung, R. T., 2015: Obstructive Sleep Apnea Is Associated with Nonalcoholic Steatohepatitis and Advanced Liver Histology. *Digestive Diseases and Sciences.*, **60**, 2523–2528.
- Craig, S. E.; Kohler, M.; Nicoll, D.; Bratton, D. J.; Nunn, A.; Davies, R.; Stradling, J., 2012: 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.*, **67**, 1090–1096.
- D'Avola, D.; Labgaa, I.; Villanueva, A., 2016: Natural history of nonalcoholic steatohepatitis/nonalcoholic fatty liver disease-hepatocellular carcinoma: Magnitude of the problem from a hepatology clinic perspective. *Clinical Liver Disease.*, **8**, 100–104.
- Fitzmaurice, C.; Allen, C.; Barber, R. M.; Barregard, L.; Bhutta, Z. A.; Brenner, H.; Dicker, D. J.; Chimed-Orchir, O.; Dandona, R.; Dandona, L.; Fleming, T.; Forouzanfar, M. H.; Hancock, J.; Hay, R. J.; HunterMerrill, R.; Huynh, C.; Hosgood, H. D.; Johnson, C. O.; Jonas, J. B. et al., 2017: Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015. *JAMA Oncology.*, **3**, 524.
- Fuhrman, C.; Fleury, B.; Nguyễn, X. L. L.; Delmas, M. C. C., 2012: Symptoms of sleep apnea syndrome: high prevalence and underdiagnosis in the French population. *Sleep medicine.*, **13**, 852–858.
- Galle, P. R.; Forner, A.; Llovet, J. M.; Mazzaferro, V.; Piscaglia, F.; Raoul, J. L.; Schirmacher, P.; Vilgrain, V., 2018: EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology.*, **69**, 182–236.

Gozal, D.; Ham, S. A.; Mokhlesi, B., 2016: Sleep Apnea and Cancer: Analysis of a Nationwide Population Sample. *Sleep.*, **39**, 1493–1500.

Hashimoto, E.; Taniai, M.; Tokushige, K., 2013: Characteristics and diagnosis of NAFLD/NASH. *Journal of Gastroenterology and Hepatology.*, **28**, 64–70.

Johns, M. W., 1991: A New Method for Measuring Daytime Sleepiness: The Epworth Sleepiness Scale. *Sleep.*, **14**, 540–545.

Johns, M. W., 1994: Sleepiness in Different Situations Measured by the Epworth Sleepiness Scale. *Sleep.*, **17**, 703–710.

Levy, P.; Tamisier, R.; Arnaud, C.; Monneret, D.; Baguet, J. P.; Stanke-Labesque, F.; Dematteis, M.; Godin-Ribuot, D.; Ribuot, C.; Pepin, J. L., 2012: Sleep deprivation, sleep apnea and cardiovascular diseases. *Frontiers in bioscience (Elite edition).*, **4**, 2007–2021.

Lévy, P.; Bonsignore, M. R.; Eckel, J., 2009: Sleep, sleep-disordered breathing and metabolic consequences. *European Respiratory Journal.*, **34**, 243–260.

Lévy, P.; Kohler, M.; McNicholas, W. T.; Barbé, F.; McEvoy, R. D.; Somers, V. K.; Lavie, L.; Pépin, J. L., 2015: Obstructive sleep apnoea syndrome. *Nature Reviews Disease Primers.*, **1**, 15015.

Lin, Q. C.; Chen, L. D.; Chen, G. P.; Zhao, J. M.; Chen, X.; Huang, J. F.; Wu, L. H., 2015: Association between nocturnal hypoxia and liver injury in the setting of nonalcoholic fatty liver disease. *Sleep and Breathing.*, **19**, 273–280.

Martínez-García, M. A.; Campos-Rodríguez, F.; Durán-Cantolla, J.; de la Peña, M.; Masdeu, M. J.; González, M.; del Campo, F.; Serra, P. C.; Valero-Sánchez, I.; Ferrer, M. J. S.; Marín, J. M.; Barbé, F.; Martínez, M.; Farré, R.; Montserrat, J. M., 2014: Obstructive sleep apnea is associated with cancer mortality in younger patients. *Sleep Medicine.*, **15**, 742–748.

Mesarwi, O. A.; Loomba, R.; Malhotra, A., 2019: Obstructive Sleep Apnea, Hypoxia, and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.*, **199**, 830–841.

Minville, C.; Hilleret, M. N.; Tamisier, R.; Aron-Wisnewsky, J.; Clement, K.; Trocme, C.; Borel, J. C.; Lévy, P.; Zarski, J. P.; Pépin, J. L., 2014: Nonalcoholic Fatty Liver Disease, Nocturnal Hypoxia, and Endothelial Function in Patients With Sleep Apnea. *Chest.*, **145**, 525–533.

Nieto, F. J.; Peppard, P. E.; Young, T.; Finn, L.; Hla, K. M.; Farré, R., 2012: Sleep-disordered breathing and cancer mortality: Results from the Wisconsin Sleep Cohort Study. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.*, **186**, 190–194.

Rinella, M. E., 2015: Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *JAMA.*, **313**, 2263.

Sookoian, S.; Pirola, C. J., 2013: Obstructive sleep apnea is associated with fatty liver and abnormal liver enzymes: A meta-analysis. *Obesity Surgery.*, **23**, 1815–1825.

Trichopoulos, D.; Bamia, C.; Lagiou, P.; Fedirko, V.; Trepo, E.; Jenab, M.; Pischon, T.; Nöthlings, U.; Overvad, K.; Tjønneland, A.; Outzen, M.; Clavel-Chapelon, F.; Kaaks, R.; Lukanova, A.; Boeing, H.; Aleksandrova, K.; Benetou, V.; Zylis, D.; Palli, D. et al., 2011: Hepatocellular Carcinoma Risk Factors and Disease Burden in a European Cohort: A Nested Case–Control Study. *JNCI Journal of the National Cancer Institute.*, **103**, 1686–1695.

van Meer, S.; De Man, R. A.; Coenraad, M. J.; Sprengers, D.; van Nieuwkerk, K. M. J.; Klümpen, H. J. J.; Jansen, P. L. M.; Ijzermans, J. N. M.; van Oijen, M. G. H.; Siersema, P. D.; van Erpecum, K. J., 2015: Surveillance for hepatocellular carcinoma is associated with increased survival: Results from a large cohort in the Netherlands. *Journal of Hepatology*, **63**, 1156–1163.

Younossi, Z. M.; Otgonsuren, M.; Henry, L.; Venkatesan, C.; Mishra, A.; Erario, M.; Hunt, S., 2015: Association of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) with hepatocellular carcinoma (HCC) in the United States from 2004 to 2009. *Hepatology*, **62**, 1723–1730.

Figures

Table 1: Characterization of OSA and HCC: measurements and follow-up assessment

Variables	Source of data or	
	Measurement modalities	Objectives
Anthropometric features : Age, sex, BMI	French Liver Cancer Biobank Network database	
Liver function (platelet count, albumin, bilirubin, prothrombin time, Child score; portal hypertension status) Comorbidities (Diabetes, arterial hypertension, dyslipidemia, obesity)	French Liver Cancer Biobank Network database	
3% Oxygen Desaturation Index	Oximetry	OSA prevalence
2% Oxygen Desaturation Index 4% Oxygen Desaturation Index Minimum nocturnal Saturation Mean nocturnal Saturation Percentage of sleep time spent below 90% SaO₂ (TSat 90%) Micro-arousal associated with 2, 3 and 4% ODI	Oximetry	OSA features
PSQI scale Epworth scale	Self-assessment (questionnaires)	OSA and sleep symptoms
HCC features: Tumor grade (Staging according to BCLC classification), tumor differentiation, tumor size, vascular invasion, satellite nodules Alpha fetoprotein level	French Liver Cancer Biobank Network database	Association between OSA and HCC prognosis factors
If available non-tumor liver histology	French Liver Cancer Biobank	Association between OSA and NASH severity

Steatosis, hepatocyte ballooning, lobular inflammation, fibrosis, SAF score	Network database	
Overall survival Progression-free survival Tumor recurrence	Patient Follow-up (12 and 24 months after resection) French Liver Cancer Biobank Network database	Association between HCC severity, OSA severity and morbidity/mortality

SAF: steatosis, activity, and fibrosis scoring system

Figure 1: OSAS screening and follow-up procedure

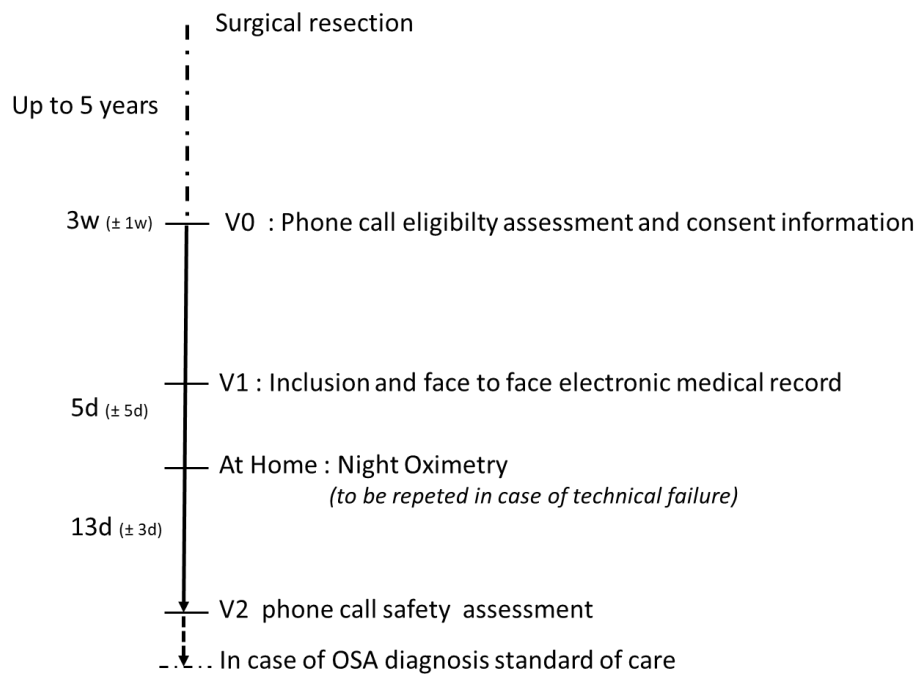
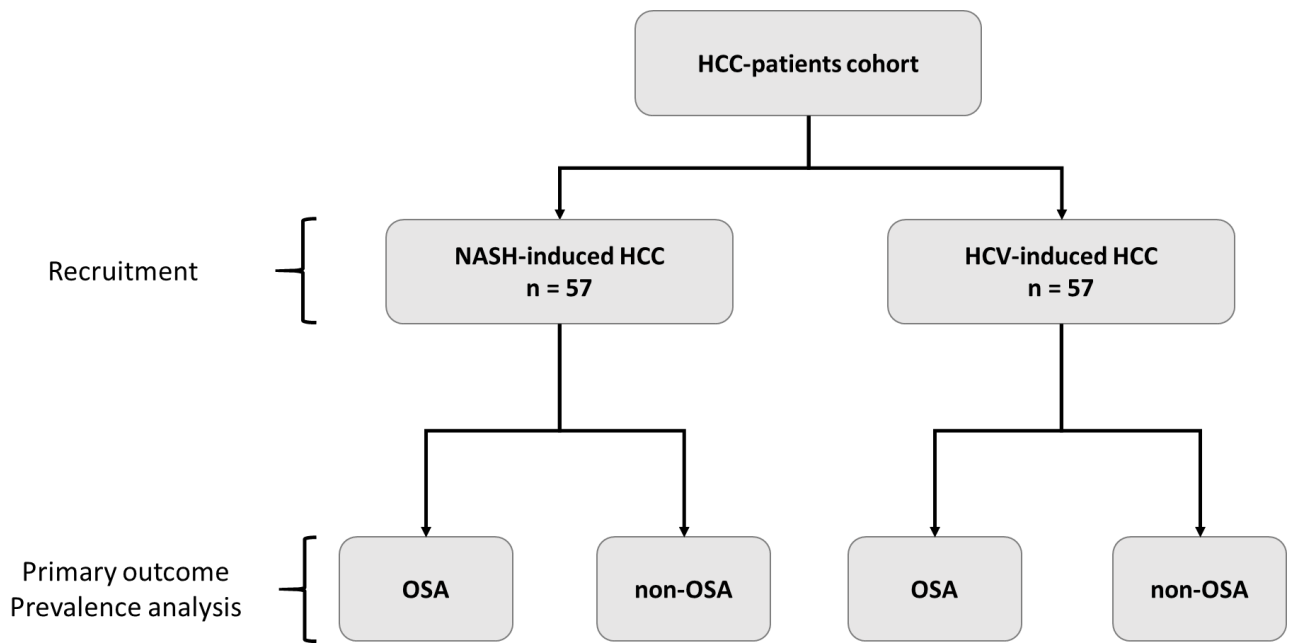
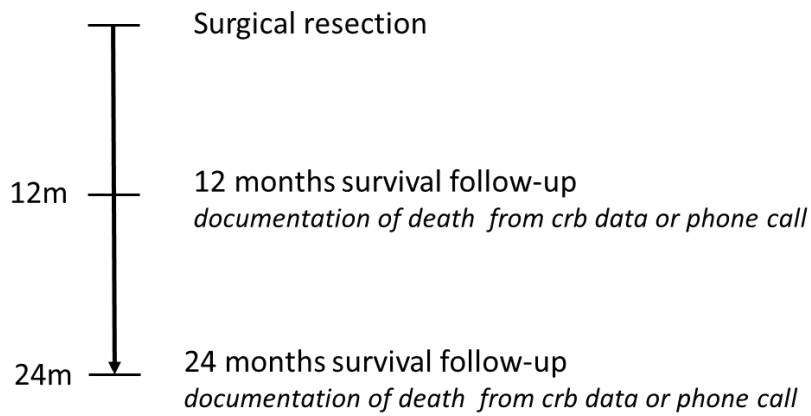


Figure 3: Anticipated flowchart



Supplementary Figure 2: Survival assessment



Effets délétères de l'hypoxie intermittente associée au syndrome d'apnées obstructives du sommeil sur la croissance et la dissémination métastatique du cancer du sein : implication de la voie HIF1/VEGF/Endothéline

Le syndrome d'apnées obstructives du sommeil (SAOS) est une pathologie fréquente caractérisée par la survenue d'épisodes nocturnes d'apnées répétées à l'origine de cycles récurrents d'hypoxieréoxygénation appelés hypoxie intermittente. L'hypoxie intermittente, stimulus chronique et systémique, est à présent reconnue comme le principal facteur responsable d'effets délétères du SAOS au niveau cardiovasculaire et métabolique. De récentes études cliniques ont identifié le SAOS comme étant associé à une surmortalité par cancer tandis que des études précliniques ont confirmé qu'il pouvait promouvoir le développement tumoral. Chez l'animal il a été démontré que l'exposition à l'hypoxie intermittente favorise la croissance tumorale primaire et métastatique notamment sur modèles murins de mélanome. A ce jour aucune étude n'a évalué l'impact de l'hypoxie intermittente sur le développement et la dissémination métastatique du cancer du sein.

L'objectif principal de ce travail de thèse est d'explorer l'impact de l'hypoxie intermittente sur le SAOS développement du cancer du sein et de comprendre comment le déséquilibre induit par l'hypoxie intermittente à l'échelle du macro-environnement contribue au développement tumoral. L'évaluation de l'implication de la voie de l'endothéline sur les effets observés a été menée par l'utilisation d'un antagoniste des récepteurs à l'ET-1.

Le protocole expérimental a été mené sur un protocole expérimental associant un modèle murin de tumeur mammaire orthotopique et deux modèles de culture cellulaire. Cette approche mixte a été rendue possible grâce à la mise au point, au cours de cette thèse, d'un dispositif *in vitro* d'exposition cellulaire à l'hypoxie intermittente.

Ce travail transversal a permis de montrer que l'hypoxie intermittente induite par le SAOS conduit à une accélération de la croissance tumorale et favorise la dissémination tumorale chez les animaux exposés et que ce phénomène engage la voie de l'endothéline 1.

Mots-clés : SAOS, hypoxie intermittente, cancer du sein, endothéline 1, macitentan, études précliniques

Obstructive Sleep Apnea Syndrome (OSA) is a prevalent disease characterised by the occurrence of repeated nocturnal episodes of apnea leading to recurrent cycles of hypoxia-reoxygenation called intermittent hypoxia. Intermittent hypoxia is a chronic and systemic stimulus which is considered as the main factor responsible for the deleterious cardiovascular and metabolic effects induced by OSA. Recent clinical studies have showed OSA is associated with excess mortality due to cancer and preclinical studies have confirmed that OSA promote tumour development. In animals, exposure to intermittent hypoxia has been shown to promote primary and metastatic tumour growth, particularly in murine models of melanoma. To date, no study has evaluated the impact of intermittent hypoxia on growth and metastatic power of breast cancer in a preclinical study.

The main objective of this thesis was to explore the impact of intermittent hypoxia on the development of breast cancer and to understand how the imbalance induced by intermittent hypoxia at the macroenvironmental scale contributes to tumour development. Involvement of the endothelin pathway was evaluated by an ET-1 receptor antagonist.

The experimental protocol was carried out on preclinical models combining a mouse model of orthotopic mammary tumour and two additional cell culture models. This mixed approach has been carried out thanks to the development of an *in vitro* device for cellular exposure to intermittent hypoxia.

This cross-sectional work has shown that intermittent hypoxia induced by OSA leads to accelerated tumour growth and favours tumour dissemination in exposed animals and that this phenomenon involved the endothelin 1 pathway.

Keywords: OSA, intermittent hypoxia, breast cancer, endothelin 1, macitentan, macroenvironment preclinical studies