



**HAL**  
open science

# Impact de l'activité sympathique dans l'aggravation de la cardiopathie ischémique causée par l'hypoxie intermittente

Maximin Détrait

► **To cite this version:**

Maximin Détrait. Impact de l'activité sympathique dans l'aggravation de la cardiopathie ischémique causée par l'hypoxie intermittente. Physiologie [q-bio.TO]. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2020. Français. NNT : 2020GRALV035 . tel-03690177

**HAL Id: tel-03690177**

**<https://theses.hal.science/tel-03690177>**

Submitted on 8 Jun 2022

**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'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : Physiologie-Physiopathologies-Pharmacologie

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

**Maximin DÉTRAIT**

Thèse dirigée par **Claire ARNAUD**

préparée au sein du **Laboratoire Hypoxie et Physiopathologie**  
dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

### **Impact de l'activité sympathique dans l'aggravation de la cardiopathie ischémique causée par l'hypoxie intermittente**

### **Impact of sympathetic activity on intermittent hypoxia-induced ischemic cardiomyopathy aggravation**

Thèse soutenue publiquement le **7 décembre 2020**,  
devant le jury composé de :

**Madame CAROLE PLANES**

PROFESSEUR DES UNIVERSITÉS - PRATICIEN HOSPITALIER,  
UNIVERSITÉ SORBONNE PARIS NORD, Rapporteur

**Monsieur GREGOIRE VANDECASTEELE**

DIRECTEUR DE RECHERCHE, INSERM DELEGATION PARIS,  
Rapporteur

**Monsieur JEREMY FAUCONNIER**

CHARGE DE RECHERCHE HDR, CNRS DELEGATION OCCITANIE  
EST, Examineur

**Monsieur JEAN-LOUIS PEPIN**

PROFESSEUR DES UNIVERSITÉS - PRATICIEN HOSPITALIER, CHU  
GRENOBLE ALPES, Président

**Madame ELISE BELAIDI**

MAITRE DE CONFERENCES HDR, UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES,  
Examinatrice

**Monsieur STEPHANE DOUTRELEAU**

MAITRE DE CONFERENCE DES UNIVERSITÉS - PRATICIEN  
HOSPITALIER, CHU GRENOBLE ALPES, Examineur





## REMERCIEMENTS

Je remercie Mmes **Carole Planes** et **Élise Belaïdi** ainsi que MM. **Grégoire Vandecasteele**, **Jeremy, Fauconnier, Stéphane Doutreleau** et **Jean-Louis Pépin** d'avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse. Je remercie particulièrement **Carole Planes** et **Grégoire Vandecasteele** pour leur travail en tant que rapporteurs.

À **Claire Arnaud**, de m'avoir encadré au cours de mon stage de master 2 et ces 4 années de thèse. Je te remercie pour la confiance que tu m'as accordé toutes ces années et pour toutes ces discussions professionnelles, scientifiques, sociétales, ou encore sportives toujours très enrichissantes. Merci d'avoir été présente pour me soutenir dans les moments les plus difficiles de la thèse et d'avoir également partagé les bons moments.

À **Élise Belaïdi**, d'avoir été ma co-encadrante officieuse non dissociable de ce travail de thèse. Merci pour ton avis toujours très pertinent et de te « faire l'avocat du diable » pour pousser toujours plus loin ma réflexion. Merci pour tes conseils et la confiance que tu m'as accordé afin de mener à bien ces nombreuses heures d'enseignements.

Merci **Élise** et **Claire** pour vos conseils sur l'après thèse et votre soutien dans les moments les plus difficiles. Merci pour vos multiples relectures de posters, de présentations, d'articles, de demandes de financement et de ce manuscrit.

À **Jean-Louis Pépin**, de m'avoir accueilli au sein du laboratoire HP2, d'avoir relu mes demandes de financement et de m'avoir conseillé entre autres dans la manière de présenter et communiquer mes résultats. Je garde un souvenir exemplaire de tes présentations à L'ERS.

À **Diane Godin-Ribuot**, de m'avoir accueilli au sein de la partie fondamentale du laboratoire HP2 et d'avoir participé à ces nombreuses discussions scientifiques toujours très instructives. Surtout merci pour cette idée de dénervation sympathique cardiaque, l'idée était brillante même si la réalisation était un peu plus compliquée.

À **Guillaume Bourdier**, de m'avoir formé aux techniques que tu maîtrisais : échocardiographie, ligature coronaire et bien d'autres. Merci pour nos discussions autour de nos résultats, dans le bureau comme autour d'une bonne bière.

À **Jonathan Gaucher**, de m'avoir communiqué tes expériences de post-doctorat, elles me permettent d'envisager l'après thèse plus sereinement. Et je ne parle pas de nos nombreux cafés scientifiques toujours enrichissants. Merci de m'avoir enseigné ta concision et ton esprit « californien » si je puis dire : une question simple une réponse simple. Pour ça et tout le reste merci.

À **Guillaume Vial**, de m'avoir prêté main forte pour certaines manip bien chargées. A toutes nos discussions sur l'après thèse, elles ont participé à la bonne finalisation de ma thèse.

À **Stéphane Doutreleau**, notre cardiologue de référence, toujours présent pour discuter de cardiologie, d'échographie et de physiopathologie. Merci pour tes encouragements tant professionnels que sportifs.

À **Anne Briançon Marjollet**, de m'avoir fait confiance pour les enseignements que tu dirigeais. Merci pour ces discussions, souvent autour de la montagne, qui permettent de s'évader et penser à autre chose que la thèse.

À **Sylvain Kotzki**, de m'avoir accompagné dans mes premiers enseignements. A nos discussions de tout horizon : sciences, statistiques, codage, crypto-monnaies, base de données et j'en passe.

À **Emeline, Sandrine, Thierry, Audrey et Sophie** pour m'avoir formé à certaines techniques de biochimie et pour votre soutien technique. Particulièrement à **Sophie** pour sa participation intensive lors de la rédaction et à **Audrey**, pour toutes ces commandes passées *in extremis* et ta gestion dans l'ombre de l'administratif qui participe au bon déroulement des projets.

À **tous mes co-thésards**, les docteurs **Yann, Guillaume, Jessica, Sophie, Raphael** et les futurs docteurs **Clément, Quentin, Axel, Bilgehan**, et **Emma**, pour leurs conseils, leur humour et leur soutien. Ne vous inquiétez pas on pourra toujours se retrouver autour d'un verre.

À **Thibault**, qui m'a accompagné toutes ces années sur les bancs de la fac. Merci pour ces défis sportifs qui ont jonché nos thèses. Tu feras un super docteur et ne t'inquiète pas : la neuro c'est pas mal non plus.

À **tous les stagiaires**, pour leur participation à mes travaux et à la vie sociale du laboratoire.

À **tous les membres du laboratoire HP2**, les cliniciens, les sportifs de l'hôpital Sud, et tous les autres.

À **mes amis, ma famille**, pour leur soutien au cours de ces nombreuses années.

À **Charlène**, pour la relecture de ce manuscrit et son soutien pendant ces nombreuses années, surtout sur la fin, à ce qu'il paraît j'étais plus difficile à vivre.

À **mes parents**, merci pour leur soutien sans faille, l'éducation qu'ils m'ont transmise et la force exemplaire dont ils font preuve pour affronter les combats de la vie. Merci

À tous, merci.

A la mémoire de mon père

## RESUME

L'association d'un trouble respiratoire au cours du sommeil (TRS) chez des patients présentant une cardiopathie ischémique est un facteur de mauvais pronostic. Au cours des TRS, les patients souffrent d'épisodes de désaturation-resaturation aussi appelés hypoxie intermittente (HI) et décrite comme l'une des caractéristiques des TRS la plus délétère sur le système cardiovasculaire. Les mécanismes induits par l'HI et responsables des complications cardiovasculaires ne sont pas totalement explicités et nécessitent d'être affinés afin de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Aujourd'hui, le traitement de référence des apnées du sommeil consiste à porter un support pressionnel pendant le sommeil. Seulement l'efficacité en regard de la morbi-mortalité cardiovasculaire est discutée.

L'objectif de cette thèse était d'étudier l'impact de l'HI sur le développement de la cardiopathie ischémique et les mécanismes impliqués, avec un focus particulier sur l'activité sympathique.

Nous avons utilisé un modèle d'ischémie coronaire permanente chez le rat, puis nous avons exposé les animaux à 12 semaines d'HI. Nous avons montré que l'HI précipite le remodelage (hypertrophie, fibrose, apoptose) et la dysfonction contractile cardiaque (fraction d'éjection). D'un point de vue mécanistique, nous avons mis en évidence une augmentation précoce et soutenue de l'activité sympathique, associée, dès 6 semaines d'exposition à l'HI, à une diminution de la réserve adrénergique cardiaque (moindres réponses à un agoniste  $\beta$ -adrénergique sur cardiomyocytes isolés).

L'inhibition de l'activité sympathique cardiaque par l'utilisation d'un modèle chirurgical de sympathectomie cardiaque spécifique, par ablation des ganglions moyen cervicale et stellaire gauche, nous a permis de mettre en évidence que l'activité sympathique induite par l'HI est en partie responsable de l'aggravation de la cardiopathie ischémique. En effet, la dénervation sympathique cardiaque rétablit la réserve adrénergique, diminue le remodelage cardiaque (hypertrophie, apoptose) et améliore la fonction cardiaque (fraction d'éjection).

Ces résultats de thèse mettent en évidence l'importance de diagnostiquer précocement les TRS chez les patients présentant une cardiopathie ischémique afin de prendre en charge l'hyperactivité sympathique comme facteur de risque.

Mots clés : Cardiomyopathie ischémique ; Hypoxie intermittente ; Activité sympathique ; Apnées du sommeil ; Dénervation sympathique cardiaque

## ABSTRACT

Sleep disordered breathing (SDB) is a factor of poor prognosis in patients suffering from ischemic cardiomyopathy. During sleep, SDB patients exhibit repetitive apneas causing chronic blood desaturation-resaturation, currently named intermittent hypoxia (IH). IH appears to be the most detrimental feature of SDB for the cardiovascular system; however, involved mechanisms are not fully understood. Thus, it seems necessary to determine them, in order to propose novel therapeutic strategies. Indeed, whereas positive airway pressure remains the gold standard treatment, the efficacy in regard of the cardiovascular mortality is not clear.

The aim of the present thesis was to assess the impact of IH on ischemic cardiomyopathy and the mechanisms involved, with a particular focus on sympathetic activity.

For that purpose, we used a model of ischemic cardiomyopathy induced by a permanent ligation of the left coronary artery in rats. Rats were then exposed to IH until 12 weeks. IH exposure induced cardiac remodeling (hypertrophy, fibrosis and apoptosis) and contractile dysfunction (ejection fraction). Mechanistically, IH exposure quickly raised sympathetic activity, which was associated with a decrease in cardiac adrenergic reserve (isolated cardiomyocyte response to adrenergic agonist decreases) after 6 weeks IH exposure. Cardiac sympathetic activity inhibition by surgical ablation of left middle cervical and stellate ganglions restored adrenergic reserve, limited cardiac remodeling (hypertrophy, apoptosis) and preserved cardiac function (ejection fraction) in our IH model.

These thesis results highlight the importance to diagnose SDB after myocardial infarction and to take care about sympathetic hyperactivity as a major risk factor.

Keywords: Ischemic cardiomyopathy; Intermittent hypoxia; Sympathetic activity; Sleep apnea; Cardiac sympathetic denervation



## SOMMAIRE

Remerciements .....	iii
Résumé .....	vi
Abstract .....	vii
Sommaire .....	viii
Liste des figures .....	xi
Liste des tables .....	xiv
Abréviations : .....	xv
Introduction .....	1
1. Physiopathologie des troubles respiratoires du sommeil .....	2
1.1. Syndrome d'apnées obstructif du sommeil .....	3
1.2. Syndrome d'apnées centrales du sommeil .....	6
1.3. Homéostasie et contrôle de la respiration .....	8
1.4. Conséquences physiopathologiques des apnées .....	12
1.5. Traitement des troubles respiratoires du sommeil .....	14
2. Impact des TRS et de l'hypoxie intermittente sur le système cardiovasculaire .....	18
2.1. Hypertension artérielle .....	18
2.2. Athérosclérose .....	18
2.3. Arythmies .....	18
2.4. Infarctus du myocarde .....	19
2.5. Cardiopathie ischémique – Insuffisance cardiaque .....	19
3. Physiopathologie de la cardiopathie ischémique .....	21
3.1. Rappel de physiologie cardiaque .....	22
3.2. Infarctus du myocarde .....	23
3.3. Cardiopathie ischémique .....	26
3.4. De la cardiopathie ischémique à l'insuffisance cardiaque .....	35

4. Mécanismes physiopathologiques de la cardiopathie ischémique et impact de l'hypoxie intermittente .....	40
4.1. L'homéostasie calcique .....	40
4.2. Système nerveux autonome – dérégulation de la balance sympatho-vagale .....	46
4.3. Système rénine angiotensine aldostérone .....	60
4.4. Stress Oxydant .....	63
4.5. Activation de HIF-1 .....	66
4.6. Stress du réticulum endoplasmique pro-apoptotique .....	69
5. Objectifs de la thèse .....	72
Matériels et Méthodes .....	74
1. Design des études .....	75
1.1. Impact de l'hypoxie intermittente sur la progression de la cardiopathie ischémique chez le rat (Étude 1) .....	75
1.2. Impact de la dénervation cardiaque sur la progression de la cardiopathie ischémique induite par l'hypoxie intermittente (Étude 2) .....	75
2. Animaux .....	78
3. Protocoles chirurgicaux .....	78
3.1. Modèle de cardiopathie ischémique par ligature permanente de l'artère coronaire gauche .....	78
3.2. Dénervation du système nerveux sympathique cardiaque .....	79
4. Exposition à l'hypoxie intermittente .....	81
5. Échographie cardiaque .....	82
6. Cathétérisme cardiaque .....	82
7. Isolation de cardiomyocytes de ventricule gauche .....	83
8. Acquisition des transitoires calciques .....	84
9. Acquisition ECG in-vivo .....	88
10. Activité du système nerveux sympathique .....	88
10.1. Analyse de la variabilité de la fréquence cardiaque .....	89

10.2.	Test ELISA des catécholamines plasmatiques .....	89
11.	Western blot .....	90
12.	RT qPCR .....	91
13.	Histologie .....	92
13.1.	Hématoxyline éosine (glandes surrénales) .....	93
13.2.	Rouge Sirius .....	93
13.3.	WGA .....	94
13.4.	TUNEL .....	94
14.	Analyse transcriptomique .....	95
15.	Statistiques .....	95
Résultats .....		96
1.	L'hypoxie intermittente précipite le remodelage cardiaque et la dysfonction contractile dans un modèle de cardiopathie ischémique chez le rat .....	97
2.	La dénervation sympathique cardiaque corrige l'aggravation de fonction cardiaque causée par l'hypoxie intermittente dans un modèle de cardiopathie ischémique chez le rat	
	113	
Discussion .....		137
1.	Principaux résultats .....	138
2.	Discussion autour du modèle animal .....	143
3.	Hypoxie intermittente et support ventilatoire dans la cardiopathie ischémique .....	146
4.	Conclusion .....	150
Bibliographie .....		151
Annexes .....		170
1.	Réponse cardiométabolique de souris maigres et obèses exposées à l'hypoxie intermittente .....	171
2.	Exportation des résultats de l'analyse statistique sur Rstudio .....	201
3.	Communications scientifiques – Présentations – Posters .....	206

## LISTE DES FIGURES

Figure 1. Top 10 des pays avec la plus haute prévalence d'apnées obstructives du sommeil <sup>8</sup> ..	3
Figure 2. Polysomnographie d'un patient SAOS souffrant d'hypopnée. ....	4
Figure 3. Polysomnographie d'un patient SACS souffrant de respiration de Cheyne-Stokes....	6
Figure 4. Patterns d'apnées du sommeil. ....	7
Figure 5. Apnées mixtes et intérêt de la pression œsophagienne .....	7
Figure 6. Homéostasie et contrôle respiratoire.....	9
Figure 7 Diagramme de l'équation des gaz alvéolaires. ....	10
Figure 8. Impact cardiaque des modifications de pression intra-thoracique au cours d'une apnée obstructive. ....	13
Figure 9. Association bidirectionnelle entre le SAOS et l'obésité <sup>32</sup> .....	14
Figure 10. Impact de la PPC sur la polysomnographie d'un patient SAOS.....	15
Figure 11. Kaplan–Meier de la survie des patients insuffisants cardiaques et apnéiques .....	20
Figure 12. Évolution des causes de mortalité entre 2005 et 2015 .....	21
Figure 13. Fonction cardiaque : notions de précharge et postcharge .....	22
Figure 14. Exemple d'infarctus de type 1 et 2 <sup>84</sup> .....	23
Figure 15. Ouverture du MPTP induite par un épisode d'ischémie-reperfusion. ....	24
Figure 16. Formation en 3 phases de la cicatrice après un infarctus du myocarde <sup>90</sup> . ....	25
Figure 17. Les mécanismes de compensation post-infarctus du myocarde (adaptatif en aiguë, mal-adaptatif au long court) .....	26
Figure 18. Remodelage cardiaque post infarctus du myocarde .....	27
Figure 19. Voies de signalisations impliquées dans l'hypertrophie ventriculaire. ....	29
Figure 20. Développement de la fibrose interstitielle et impact sur le cœur <sup>122</sup> .....	31
Figure 21. Remodelage de la matrice extracellulaire .....	32
Figure 22. Mécanismes de mort cellulaire conduisant l'apoptose ou la nécrose <sup>124</sup> .....	33
Figure 23. Schéma de synthèse de la compensation à la décompensation cardiaque : impact des mécanismes neuro-hormonaux et du remodelage ventriculaire sur le débit cardiaque.....	35
Figure 24. Évolution des traitements de l'insuffisance cardiaque <sup>98</sup> . ....	37
Figure 25. Conduction et phase de contraction du cœur.....	40
Figure 26. Couplage excitation contraction <sup>146</sup> . ....	41
Figure 27. Dérégulation de l'homéostasie calcique dans le cadre de l'insuffisance cardiaque <sup>155</sup> . .....	43

Figure 28. Couplage excitation transcription et développement de l'hypertrophie pathologique <sup>158</sup> .....	43
Figure 29. Désorganisation des tubules-T dans un contexte d'insuffisance cardiaque <sup>155</sup> . .....	44
Figure 30. Transitoire calcique et homéostasie calcique <sup>160</sup> .....	44
Figure 31. Organisation de la voie efférente du système nerveux autonome. ACH : acétylcholine ; Nora : noradrénaline ; SNC : système nerveux central.....	46
Figure 32. Planche anatomique du système nerveux autonome parasympathique <sup>166</sup> . .....	47
Figure 33. Planche anatomique du système nerveux autonome sympathique <sup>166</sup> . .....	49
Figure 34. Les différents types de récepteurs adrénérgiques <sup>170</sup> . .....	50
Figure 35. Impact de l'activité sympathique sur le couplage excitation contraction <sup>1</sup> . .....	51
Figure 36. Cercle vicieux de l'activation sympathique dans le développement de la cardiopathie ischémique <sup>180</sup> .....	55
Figure 37. Visualisation des projections du ganglion stellaire dans le coeur <sup>218</sup> .....	58
Figure 38. Régulation de la pression artérielle via le système rénine angiotensine aldostérone. ....	60
Figure 39. Stress oxydant et remodelage cardiaque <sup>239</sup> .....	64
Figure 40. Régulation de l'expression et de l'activité de HIF-1 en normoxie et en hypoxie <sup>252</sup> . ....	66
Figure 41. Hypoxie intermittente et activation d'HIF-1 <sup>249</sup> .....	67
Figure 42. Voies de signalisation de l'UPR après un stress du RE <sup>265</sup> .....	70
Figure 43. Rôle central de l'activité sympathique et hypothèse de l'impact de l'hypoxie intermittente dans la cardiopathie ischémique. ....	72
Figure 44 : Design de la première étude.....	76
Figure 45 : Design de la deuxième étude. ....	77
Figure 46. Planche anatomique de rat extraite de « Anatomy of the rat » de Eunice Chace Greene. ....	79
Figure 47. Plateforme HypE .....	81
Figure 48. Image extraite du logiciel Vevo Lab (Module « Auto LV »), acquise sur un animal ayant subi un infarctus du myocarde .....	82
Figure 49. PV Loop extraite du logiciel LabChart Pro v8.1 suite à une pression sur la veine cave inférieure. ....	83
Figure 50. Dynascope de la plateforme MicroCell de l'IAB de Grenoble.....	84
Figure 51. Cuve d'électrostimulation pour l'acquisition de transitoire calcique de cardiomyocytes de ventricule gauche.....	87

Figure 52. Images acquises en « line scan » au microscope confocale à l'aide du fluo-4 et de la lumière transmise. ....	87
Figure 53. DECRO gilet connecté développé par Etisense.....	88
Figure 54. Résultats de la première étude : l'hypoxie intermittente est délétère dans la progression de la cardiopathie ischémique .....	98
Figure 55. Résultats de la seconde étude : l'activité sympathique induite par l'hypoxie intermittente est responsable de l'aggravation de la cardiopathie ischémique. ....	114
Figure 56. Analyse GOBP, top 10 des gènes dérégulés par l'hypoxie intermittente et par la dénervation en condition d'hypoxie intermittente .....	136
Figure 57. L'activité sympathique induite par l'hypoxie intermittente est responsable de l'aggravation de la cardiopathie ischémique .....	141
Figure 58. Insulino-résistance et remodelage ventriculaire <sup>304</sup> .....	171
Figure 59. L'hypoxie intermittente induit une insulino-résistance et une fibrose cardiaque.	172
Figure 60. Aperçu du fichier .HTML généré (Données) .....	202
Figure 61. Aperçu du fichier .HTML généré (Homoscédasticité). ....	202
Figure 62. Aperçu du fichier .HTML généré (Normalité). ....	203
Figure 63. Aperçu du fichier .HTML généré (Test non-paramétrique). ....	203
Figure 64. Aperçu du fichier .HTML généré (Test paramétrique) .....	204
Figure 65. Aperçu du fichier .HTML généré (Graphiques). ....	205

## LISTE DES TABLES

Tableau 1. Récapitulatif des différents récepteurs adrénérgiques, des protéines G et de leurs effets cardiaques .....	50
Tableau 2. Caractéristiques des protocoles utilisés pour les 2 sondes fluorescentes Fluo-4 et Indo-1 lors de l'acquisition des transitoires calciques.....	86
Tableau 3. Liste des anticorps primaires utilisés.....	91
Tableau 4. Liste des couples d'amorces utilisés.....	92
Tableau 5. Nombre de gènes différentiellement exprimés entre les différents groupes. ....	135
Tableau 6. Matrice type, référençant l'emplacement des bases de données avec les variables à analyser .....	201
Tableau 7. Type de base de données interrogées par R.....	201

## ABBREVIATIONS :

<b>AMP</b>	Adénosine monophosphate	<b>DAVID</b>	<i>The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery</i>
<b>ANP</b>	<i>Atrial natriuretic peptide</i>	<b>ECG</b>	<i>Électrocardiogramme</i>
<b>AT<sub>1</sub>R</b>	<i>Angiotensine Receptor 1</i>	<b>EEG</b>	<i>Électroencéphalogramme</i>
<b>ATF</b>	<i>Activating transcription factor</i>	<b>eIF2</b>	<i>eukaryotic Initiation Factor 2</i>
<b>BNP</b>	<i>Brain natriuretic peptide</i>	<b>ERAD</b>	<i>ER-associated degradation</i>
<b>c-MyBP-C</b>	<i>Cardiac myosin-binding protein C</i>	<b>ERO</b>	Espèce réactive de l'oxygène
<b>CaMKII</b>	<i>Ca<sup>2+</sup> /calmodulin-dependent protein kinase II</i>	<b>ESS</b>	<i>Epworth Sleepiness Scale score</i>
<b>CANPAP</b>	<i>Canadian Continuous Positive Airway Pressure for Patients with Central Sleep Apnea and Heart Failure</i>	<b>FE</b>	Fraction d'éjection
<b>CEC</b>	Couplage excitation contraction	<b>FiO<sub>2</sub></b>	Fraction inspirée en dioxygène
<b>CET</b>	Couplage excitation transcription	<b>GO</b>	<i>Gene ontology</i>
<b>CHF</b>	<i>Chronic heart failure</i>	<b>GOBP</b>	<i>Gene ontology biological process</i>
<b>CHOP</b>	<i>C/EBP homologous protein</i>	<b>GPx</b>	<i>Glutathion peroxydase</i>
<b>CICR</b>	<i>Calcium induced calcium release</i>	<b>HDAC</b>	Histone désacétylase
<b>CSD</b>	Dénervation sympathique cardiaque	<b>HFD</b>	<i>High fat diet</i>
<b>CSR</b>	<i>Cheyne Stockes Respiration</i>	<b>HFmrEF</b>	<i>Heart failure with mid- range ejection fraction</i>
		<b>HFpEF</b>	<i>Heart failure with preserved ejection fraction</i>
		<b>HFrEF</b>	<i>Heart failure with reduced ejection fraction</i>
		<b>HI</b>	Hypoxie intermittente
		<b>HIF</b>	<i>Hypoxia inducible factor</i>



<b>HRV</b>	<i>Heart rate variability</i>	<b>NADPH</b>	<i>Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
<b>IAH</b>	Index apnée-hypopnée	<b>NCX</b>	Échangeur Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup>
<b>IL</b>	Interleukine	<b>NFAT</b>	Facteur nucléaire des lymphocytes T activés
<b>IRE</b>	<i>Inositol requirement enzyme</i>	<b>NFκB</b>	<i>Nuclear factor-κB</i>
<b>ISAACC</b>	<i>Impact of Sleep Apnea syndrome in the evolution of Acute Coronary syndrome. Effect of intervention with CPAP</i>	<b>NOS</b>	<i>Nitric oxide synthase</i>
<b>LFD</b>	<i>Low fat diet</i>	<b>PA</b>	Potentiel d'action
<b>LTCC</b>	L-type Ca <sup>2+</sup> channel	<b>PA</b>	<i>Pulmonary artery</i>
<b>LV</b>	<i>Left ventricle</i> ou ventricule gauche	<b>PDE</b>	Phosphodiesterase
<b>LV</b>	<i>Left ventricle</i>	<b>PERK</b>	<i>PKR (protein kinase RNA) –like ER kinase</i>
<b>MAPK</b>	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>	<b>PKA</b>	Protéine kinase A
<b>MCP</b>	<i>Monocyte chemoattractant protein</i>	<b>PMN</b>	Leucocyte polymorphonucléaire
<b>MEC</b>	Matrice extracellulaire	<b>PP</b>	Protéine phosphatase
<b>MEF2</b>	Myocyte enhancer factor-2	<b>PPC</b>	Pression positive continue
<b>MHC</b>	<i>Myosine Heavy Chain</i> ou chaîne de myosine lourde	<b>PTPm</b>	Pore de transition de perméabilité mitochondriale
<b>MI</b>	Infarctus du myocarde	<b>RCPG</b>	Récepteurs couplés aux protéines G
<b>MMP</b>	Métalloprotéinase matricielle	<b>RE</b>	Réticulum endoplasmique
<b>MSNA</b>	<i>Muscle sympathetic nerve activity</i>	<b>REG</b>	Réticulum endoplasmique granuleux
<b>mTOR</b>	<i>Mammalian target of rapamycin</i>	<b>REL</b>	Réticulum endoplasmique lisse
<b>N</b>	Normoxie	<b>RICCADA</b>	<i>Randomized Intervention with Continuous Positive</i>

	<i>Airway Pressure in CAD and OSA</i>
<b>RS</b>	Réticulum sarcoplasmique
<b>RV</b>	<i>Right ventricle</i>
<b>RyR</b>	Ryanodine receptor
<b>SACS</b>	Syndrome d'apnée centrale du sommeil
<b>SAOS</b>	Syndrome d'apnée obstructive du sommeil
<b>SAVE</b>	<i>Sleep Apnea Cardiovascular Endpoints</i>
<b>SERCA</b>	Sarco/endoplasmic reticulum Ca <sup>2+</sup> -ATPase
<b>SERVE-HF</b>	<i>The Treatment of Sleep-Disordered Breathing with Predominant Central Sleep Apnea by Adaptive Servo Ventilation in Patients with Heart Failure</i>
<b>SMAD</b>	SMA ("small" worm phenotype) & MAD ("Mothers Against Decapentaplegic")
<b>SNS</b>	Système nerveux sympathique

<b>SOD</b>	<i>Superoxyde dismutase</i>
<b>SRAA</b>	Système rénine angiotensine aldostérone
<b>TGFβ</b>	<i>Transforming growth factor beta</i>
<b>TIMP</b>	<i>Tissue inhibitors of metalloproteinases</i>
<b>TNFα</b>	<i>Tumor necrosis factor α</i>
<b>TRPC</b>	<i>Transient receptor potential cation channels</i>
<b>TRS</b>	Troubles respiratoires du sommeil
<b>TUDCA</b>	<i>Tauroursodeoxycholic acid</i>
<b>TUNEL</b>	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase-Mediated dUTP Nick End-Labeling</i>
<b>UA</b>	<i>Upper airways</i>
<b>UPR</b>	<i>Unfolded protein response</i>
<b>UPR</b>	<i>Unfolded protein response</i>
<b>VAA</b>	Ventilation auto-asservie
<b>VG</b>	Ventricule gauche
<b>WGA</b>	<i>Wheat germ agglutinin</i>

# **INTRODUCTION**

Les troubles respiratoires du sommeil (TRS) augmentent la mortalité des patients souffrant de cardiopathie ischémique<sup>1</sup>. Les mécanismes impliqués dans l'impact délétère de ces TRS sont méconnus et nécessitent d'être affinés afin de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques. L'hypoxie intermittente est la conséquence des troubles respiratoires du sommeil la plus délétère sur le système cardiovasculaire<sup>2</sup>.

C'est pourquoi mon projet de thèse mené au laboratoire HP2 s'est intéressé à l'impact de l'hypoxie intermittente sur le développement de la cardiopathie ischémique.

Au cours de cette thèse, je me suis particulièrement intéressé à l'activité du système nerveux sympathique. En effet, une augmentation de l'activité sympathique a été mise en évidence chez les patients souffrant de TRS<sup>3</sup>, tout comme chez des volontaires sains<sup>4</sup> ou encore des souris, soumis à l'hypoxie intermittente<sup>5</sup>. De plus, l'activité sympathique est bien connue pour être délétère dans le développement de la cardiopathie ischémique<sup>6</sup>.

## **1. PHYSIOPATHOLOGIE DES TROUBLES RESPIRATOIRES DU SOMMEIL**

Décrits pour la première fois au début du 19<sup>e</sup> siècle par Cheyne et Stokes, ce n'est que 150 ans plus tard que les TRS feront leur apparition dans la littérature médicale<sup>7</sup>. La recherche sur les TRS est « récente » avec en 1972 l'ouverture du premier laboratoire du sommeil à Stanford. Ce n'est qu'en 2019 que la prévalence du syndrome d'apnée obstructive du sommeil (SAOS), un type de TRS, est estimée à l'échelle mondiale. Un milliard de personnes seraient atteintes d'apnée obstructive du sommeil<sup>8</sup>. Les TRS sont maintenant reconnus comme une cause de mortalité et un facteur de risque de maladies cardiovasculaires indépendant, mais restent sous-diagnostiqués et les mécanismes impliqués nécessitent d'être affinés<sup>9</sup>.

Les TRS se caractérisent par des anomalies de la respiration pendant le sommeil, menant à des apnées ou des hypopnées (arrêts ou diminution de la ventilation). L'apnée est définie par une réduction du débit respiratoire d'au moins 90% pendant 10 secondes, l'hypopnée par une réduction du débit respiratoire d'au moins 30% pendant 10 secondes associée soit à une désaturation d'au moins 3% soit à un éveil<sup>10</sup>. L'IAH (index apnées-hypopnées) est le nombre d'apnées et d'hypopnées par heure, ce score permet d'évaluer la sévérité des TRS. Par convention, un patient ayant un IAH compris entre 5 et 14 événements par heure souffre d'un syndrome d'apnées du sommeil (SAS) léger, entre 15 et 29 un SAS modéré et supérieur à 30 un SAS sévère<sup>11</sup>.

Il existe deux types de SAS présentant des étiologies différentes : le SAOS et le syndrome d'apnées centrales du sommeil (SACS).

## 1.1. Syndrome d'apnées obstructif du sommeil

Le SAOS est le trouble respiratoire chronique le plus prévalent, un milliard de personnes en souffriraient<sup>8,12</sup> (Figure 1). En plus d'être le trouble respiratoire chronique le plus fréquent, le SAOS est largement sous diagnostiqué, 5% de la population des pays développés pourrait avoir un SAOS sans le savoir<sup>13</sup>.

En effet, il est difficile pour le patient d'identifier ces TRS puisqu'ils apparaissent au cours du sommeil. Le ou la conjoint(e) peut être alerté(e) en identifiant des signes caractéristiques comme les apnées ou les ronflements particulièrement intenses à la reprise de la respiration. Sinon les symptômes caractéristiques du SAOS comme la somnolence et la fatigue diurne peuvent également aiguiller le diagnostic<sup>14</sup>.

L'âge, l'obésité, le genre masculin, le tabac et la consommation d'alcool sont des facteurs de risques du SAOS<sup>12</sup>. Le vieillissement de la population, l'augmentation de l'obésité, la consommation de tabac et d'alcool croissante dans les pays développés pourrait expliquer la prévalence importante du SAOS.

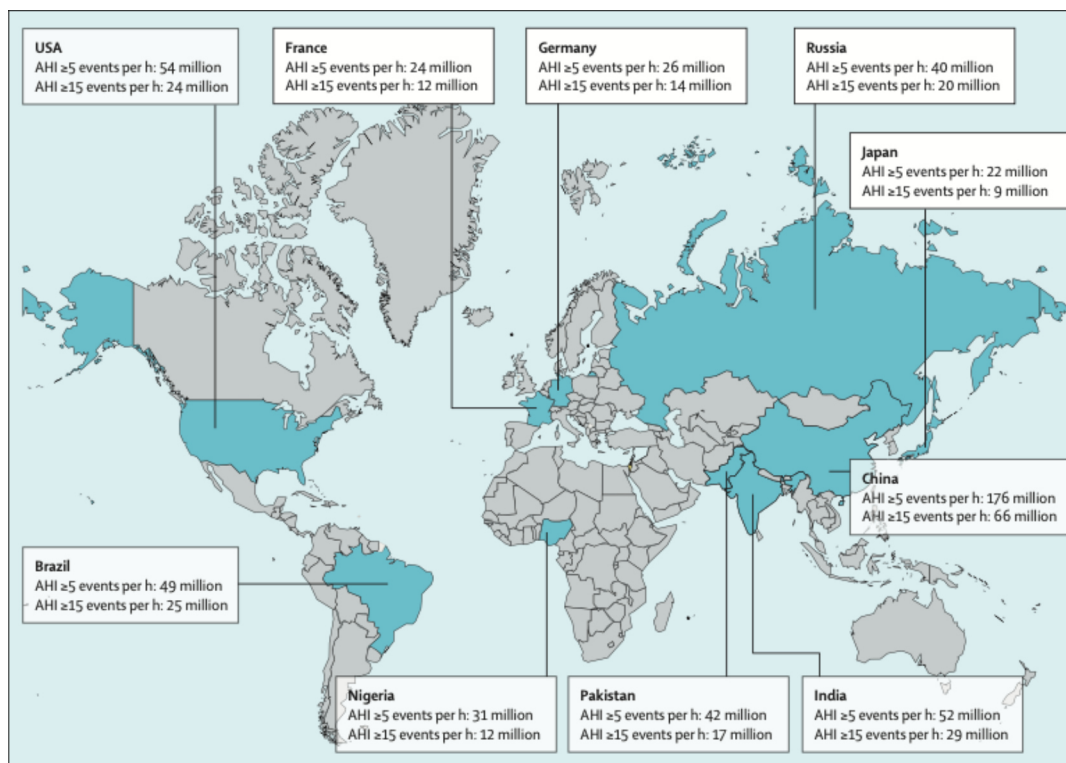


Figure 1. Top 10 des pays avec la plus haute prévalence d'apnées obstructives du sommeil<sup>8</sup>.

AHI : IAH index apnée-hypopnée.

Les apnées obstructives du sommeil se caractérisent par des obstructions répétées des voies aériennes supérieures au cours du sommeil<sup>15</sup>. Ces obstructions peuvent être multifactorielles, anatomiques ou fonctionnelles (obésité, structure maxillo-faciale particulière, diminution du réflexe de contraction des muscles dilatateurs du pharynx)<sup>16</sup>.

L'examen de référence du SAOS est la polysomnographie (Figure 2). Cet examen permet la surveillance et l'enregistrement de données physiologiques pendant le sommeil mais nécessite un appareillage complexe dans un laboratoire du sommeil et une nuit d'hospitalisation.

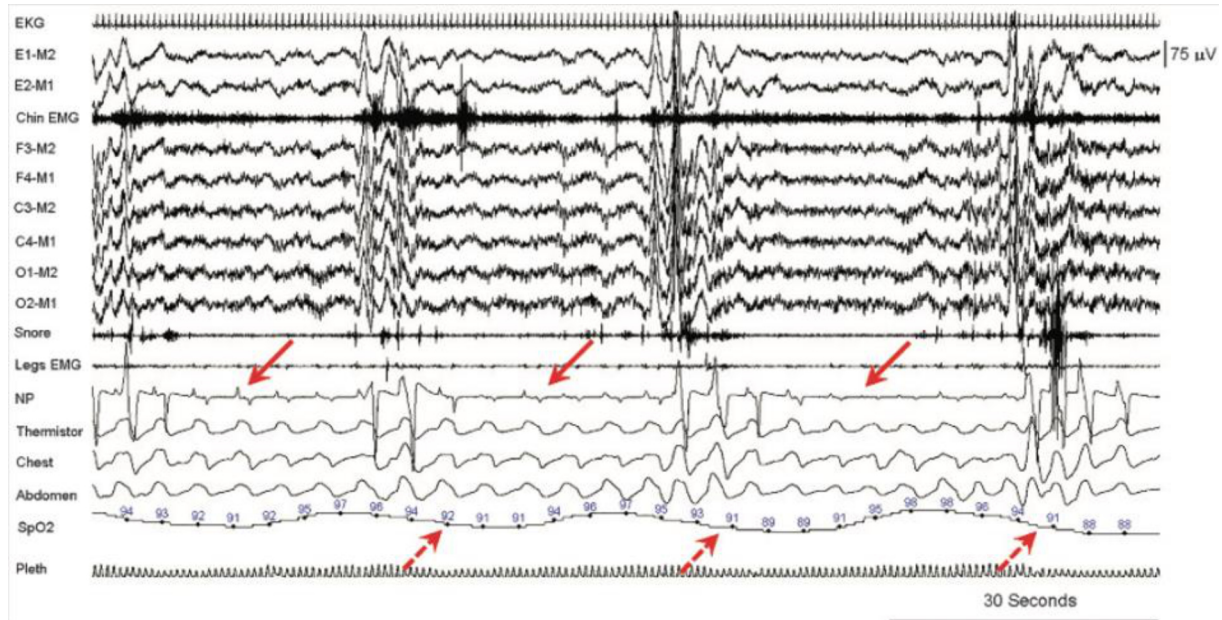


Figure 2. Polysomnographie d'un patient SAOS souffrant d'hypopnée.

L'EKG représente l'électrocardiogramme (ECG) ; les 9 lignes suivantes de E1-M2 à O2-M1 : l'électroencéphalogramme (EEG) ; Snore : les ronflements ; Legs EMG : l'électromyogramme des jambes ; NP : la pression nasale ; Thermistor, Chest et Abdomen : la résistance de la cage thoracique et de l'abdomen ; SpO2 : la saturation ; Pleth : pléthysmographie<sup>11</sup>.

Sur la polysomnographie, du haut vers le bas, nous pouvons observer que les tracés des EEG gagnent en amplitude, ce qui témoigne d'une activité cérébrale plus importante que l'on qualifie de micro-éveils. De manière synchrone les micro-éveils sont associés à des ronflements attestant de la reprise de la respiration. En effet, sur la pression nasale (NP) nous pouvons observer périodiquement une forte diminution des volumes respiratoires (au niveau des flèches rouges) sans que cette diminution ne soit totale (hypopnée).

Durant l'hypopnée, les mouvements de la cage thoracique et de l'abdomen persistent (*Chest, Abdomen*) ce qui est caractéristique d'une apnée obstructive. Les voies aériennes sont obstruées et les mouvements de la cage thoracique luttent contre l'obstruction.

Pour finir, nous observons une désaturation, la saturation passe de 98% à 88%. Nous sommes bien en présence d'hypopnées puisque les diminutions de volume respiratoire sont associées à une désaturation supérieure à 3% et à des micro-éveils. L'IAH est à évaluer sur la nuit pour valider la présence d'un SAOS mais sur ce court enregistrement l'occurrence des apnées semble très fréquente.

Pour confirmer le diagnostic du SAOS léger (IAH<15), les apnées-hypopnées doivent être associées aux symptômes du SAOS, à savoir : somnolence, fatigue diurne, ronflement ou encore à des troubles médicaux tels que l'hypertension, les maladies coronariennes, la fibrillation atriale, l'insuffisance cardiaque, les accidents vasculaires cérébraux, le diabète, les dysfonctions cognitives, les troubles de l'humeur<sup>14</sup>.

L'inconvénient majeur de la polysomnographie est qu'elle est coûteuse et laborieuse à réaliser, ce qui peut être une des raisons du sous-diagnostic des TRS<sup>17</sup>.

Heureusement aujourd'hui pour améliorer le dépistage des TRS il est possible de réaliser des polygraphies, mesurant certes moins de signaux (paramètres neurophysiologiques), mais pouvant être réalisées plus facilement et à domicile. Des dispositifs innovants sont également en cours de développement et permettrait de diagnostiquer plus facilement et à moindre coût les TRS. Par exemple, notre laboratoire travaille actuellement en collaboration avec la start-up Sunrise sur SENSAPNEA, un petit capteur à placer sur le menton au cours de la nuit qui serait capable, associé à une application, de détecter les TRS (Projet financé par l'Institut européen d'innovation et de technologie (EIT)).

## 1.2. Syndrome d'apnées centrales du sommeil

La prévalence du SACS est très faible dans la population générale (inférieur à 1%)<sup>18</sup>. L'étiologie des apnées centrales est multiple. L'étiologie peut être physiologique, les apnées centrales peuvent survenir chez des personnes saines qui séjournent en altitude (> 3000m), mais aussi pharmacologique, chez des patients qui consomment des opiacés de manière chronique, ou encore chez des patients souffrant d'une dysfonction ventriculaire gauche. Dans de très rares cas, il existe des d'apnées centrales idiopathiques<sup>19</sup>. Dans la population des insuffisants cardiaques la prévalence du SACS est bien plus importante que dans la population générale et peut atteindre les 40%<sup>20</sup>.

Dans le cadre des apnées centrales, ce n'est pas une obstruction qui est à l'origine de l'apnée mais une altération du contrôle respiratoire. Les apnées centrales sont caractérisées par un arrêt de tout effort respiratoire. Nous retrouvons sur la polysomnographie d'un patient SACS, comme pour celles d'un patient SAOS, les micro-éveils, les ronflements à la reprise de la respiration, l'arrêt du flux respiratoire lors de l'apnée et les désaturations (Figure 3). Par contre, l'apnée étant déclenchée par le système nerveux central et non par une obstruction, nous n'observons pas au cours de l'apnée de mouvements thoraciques<sup>11</sup>.

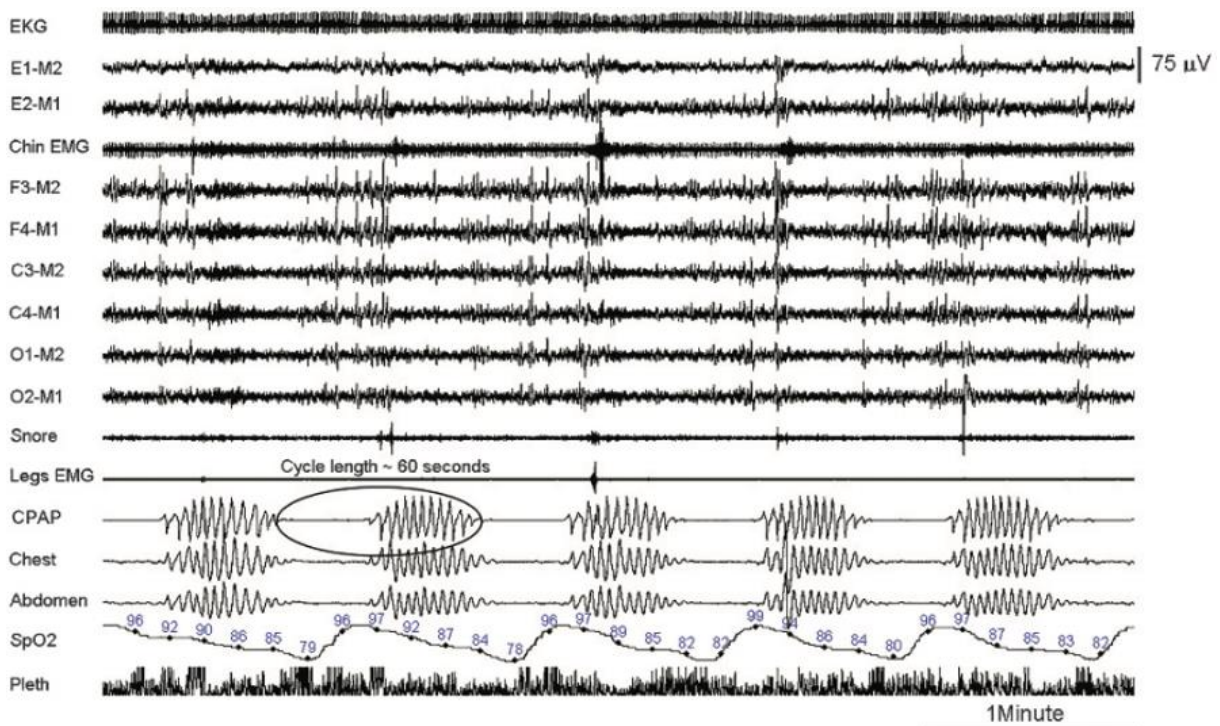


Figure 3. Polysomnographie d'un patient SACS souffrant de respiration de Cheyne-Stokes.

L'EKG représente l'électrocardiogramme ; les 9 lignes suivantes de E1-M2 à O2-M1 : l'électroencéphalogramme ; Snore : les ronflements ; Legs EMG : l'électromyogramme des jambes ; CPAP : Flux enregistré par la CPAP (pression positive continue) ; Chest et Abdomen : Volume de la cage thoracique et de l'abdomen ; SpO2 : la saturation ; Pleth : pléthysmographie<sup>11</sup>.



Si au cours d'une apnée obstructive les mouvements de la cage thoracique perdurent, ça ne sera pas le cas pendant l'apnée centrale (Figure 4). Les mouvements de la cage thoracique à la reprise de la respiration permettent également d'identifier un type d'apnée centrale particulier retrouvé chez les patients insuffisants cardiaques : la respiration de Cheyne Stockes (*Cheyne-Stockes Respiration* : CSR). Cette CSR est caractérisée par un pattern de respiration particulier, l'amplitude de respiration va crescendo decrescendo, la reprise de la respiration après l'apnée est progressive tout comme l'interruption de la respiration (Figure 4).

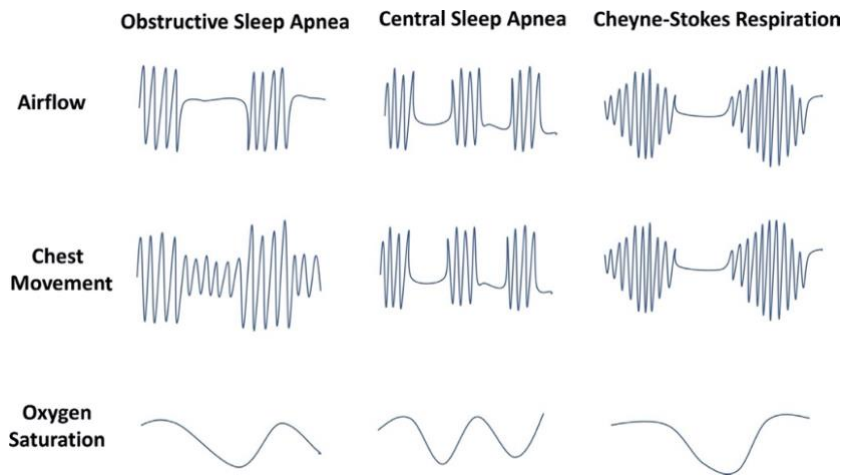


Figure 4. Patterns d'apnées du sommeil.

Cette figure récapitule simplement les différents types d'apnées du sommeil<sup>9</sup>.

Il existe également des apnées mixtes qui associent les 2 types d'apnées. Souvent, dans le cas d'apnées mixtes, un évènement obstructif survient à la levée de l'apnée centrale. Dans ce cas, la pression œsophagienne est un paramètre plus discriminant que les mouvements de la cage thoracique et permet de bien distinguer les périodes d'apnées centrales de celles d'apnées obstructives<sup>21</sup>. Sur la Figure 5, nous observons une première phase d'hypopnée centrale avec une diminution du flux associée à une pression œsophagienne proche de zéro. Puis, dans un deuxième temps, une pression œsophagienne qui augmente fortement sans augmentation du flux, indiquant le passage d'une hypopnée centrale à une hypopnée obstructive.

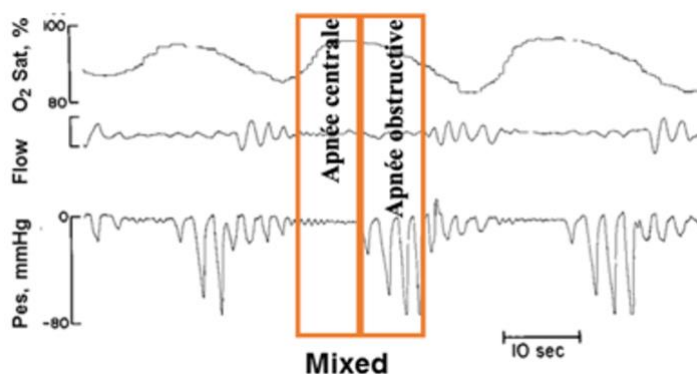


Figure 5. Apnées mixtes et intérêt de la pression œsophagienne.

Flow : flux respiratoire ; Pes : pression œsophagienne. Adaptée de Dempsey JA., 2019<sup>21</sup>.

### 1.3. Homéostasie et contrôle de la respiration

L'étiologie du SACS est plus complexe que celle du SAOS. Il est nécessaire de faire un rappel sur le contrôle de la respiration et sur le seuil d'apnée, afin de comprendre comment sont déclenchées les apnées centrales et plus généralement comment les apnées impactent le contrôle de la respiration.

En physiologie, nous distinguons 2 types de respirations : l'externe et l'interne. La respiration externe permet l'échange d'O<sub>2</sub> et de CO<sub>2</sub> entre l'air alvéolaire et le sang pulmonaire. L'O<sub>2</sub> passe des alvéoles vers le sang afin de l'oxygéner, le CO<sub>2</sub> du sang vers les alvéoles pour être expiré. La respiration interne est la respiration de toutes les cellules de l'organisme. Les cellules consomment de l'O<sub>2</sub> et rejettent du CO<sub>2</sub> dans de la circulation systémique. En effet, la respiration interne, en plus de produire de l'énergie, produit des protons (des ions H<sup>+</sup>). Afin de ne pas acidifier le milieu (diminution du pH), les protons sont tamponnés par le bicarbonate (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) à l'aide de l'anhydrase carbonique et génère du CO<sub>2</sub> et de l'eau :



Ces équations chimiques sont bidirectionnelles. Si la PaCO<sub>2</sub> (pression partielle en CO<sub>2</sub> artérielle) est trop élevée (hypercapnie) cela favorise l'apparition de protons qui entraînent une acidose, à l'inverse, une hypocapnie entraîne une alcalose. A PaCO<sub>2</sub> physiologique on parle d'eucapnie.

La respiration externe permet d'alimenter les cellules en O<sub>2</sub>, d'éliminer le CO<sub>2</sub> produit par la respiration interne et ainsi participer à la régulation du pH.

L'objectif du contrôle de la respiration est de conserver l'homéostasie, une saturation en O<sub>2</sub> proche de 100%, une eucapnie et un pH physiologique (pH 7,4).

Pour ce faire, des chémorécepteurs périphériques (situés dans les corpuscules carotidiens) et centraux (situés à la surface du bulbe rachidien) sensibles à la PaO<sub>2</sub>, à la PaCO<sub>2</sub> et au pH, informent les centres respiratoires bulbaires qui à leurs tours contrôlent les muscles respiratoires modulant *in fine* la PaO<sub>2</sub>, la PaCO<sub>2</sub> et le pH (Figure 6).

Par exemple, si la PaCO<sub>2</sub> est importante (acidose), les centres respiratoires bulbaires augmentent la fréquence respiratoire (hyperventilation). L'hyperventilation, en augmentant l'élimination du CO<sub>2</sub>, conduira *in fine* à une diminution de la PaCO<sub>2</sub> et une augmentation du pH. A l'inverse une PaCO<sub>2</sub> faible (alcalose) entrainera une hypoventilation, une augmentation de la PaCO<sub>2</sub> et une diminution du pH. De la même manière une hypoxémie entraîne une hyperventilation.

## Homéostasie et contrôle respiratoire

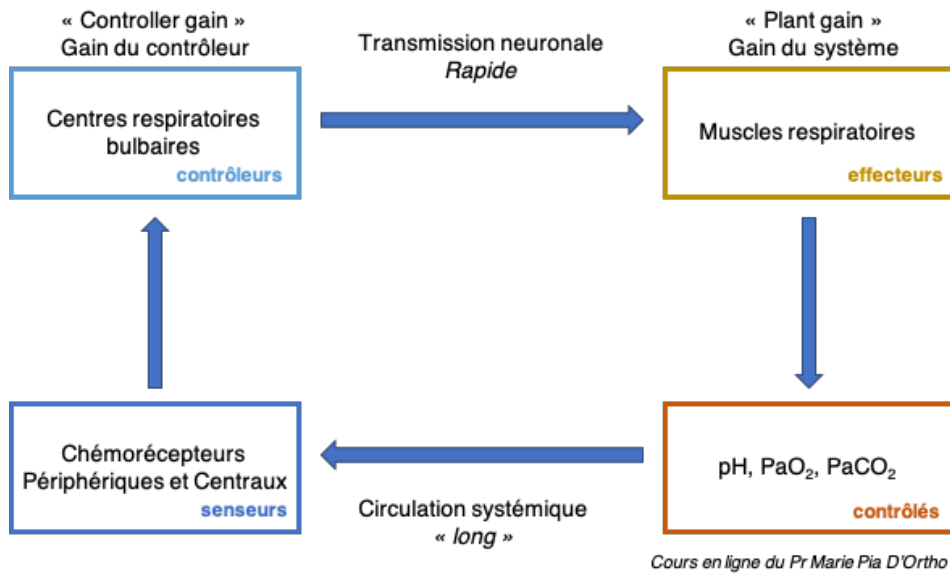


Figure 6. Homéostasie et contrôle respiratoire.

Loop gain = controller gain \* plant gain. Figure adaptée du cours en ligne du Professeure Marie Pia D'Ortho.

Dans le cadre des apnées centrales, la diminution de la fréquence respiratoire peut être importante, au point de déclencher une apnée. La PaCO<sub>2</sub> joue un rôle central dans la régulation de la respiration et détermine ce que l'on appelle le seuil d'apnée. Le seuil d'apnée est la PaCO<sub>2</sub> limite sous laquelle les contrôleurs déclenchent une apnée.

Si l'on hyper-ventile mécaniquement des sujets sains, la PaCO<sub>2</sub> descend sous le seuil d'apnée, entraînant un arrêt de la ventilation et donc une apnée centrale<sup>22</sup>. Seulement, ce seuil d'apnée n'est pas une valeur absolue, il varie en fonction des conditions et des pathologies<sup>18,23,24</sup>.

L'apparition de l'apnée dépend du gain du système (*plant gain*) et du gain du contrôleur (*controller gain*). Le controller gain représente l'intensité de réponse des contrôleurs (il est entre autres dépendant de la sensibilité des chémorécepteurs) et le plant gain représente l'efficacité de la réponse (état et efficacité des muscles respiratoires) (Figure 6). Le loop gain est le produit du plant gain et du controller gain. Une personne avec un loop gain important répondra rapidement et efficacement à un stimulus, alors que la réponse sera plus lente et faible pour un loop gain moins important.

La réponse ventilatoire dépend de la capacité de réponse des muscles respiratoires, de la sensibilité des chémorécepteurs mais aussi de l'état physiopathologique du sujet. La Figure 7 représente des diagrammes de l'équation des gaz alvéolaires, est représenté en abscisse la P<sub>A</sub>CO<sub>2</sub> (Pression partielle en CO<sub>2</sub> dans les alvéoles, la pression partielle en CO<sub>2</sub> est identique dans l'air alvéolaire et dans le sang artériel (PaCO<sub>2</sub>)) et en ordonnées l'intensité de ventilation

( $V_A$  ventilation alvéolaire). La courbe est l'hyperbole-iso-métabolique, elle donne la correspondance physiologique entre  $P_{ACO_2}$  et  $V_A$ . Si l'on s'éloigne de cette courbe le système va tout faire pour s'en rapprocher. Les flèches en pointillées pointent vers le seuil d'apnée mesuré expérimentalement en ventilant mécaniquement des patients ou des animaux.

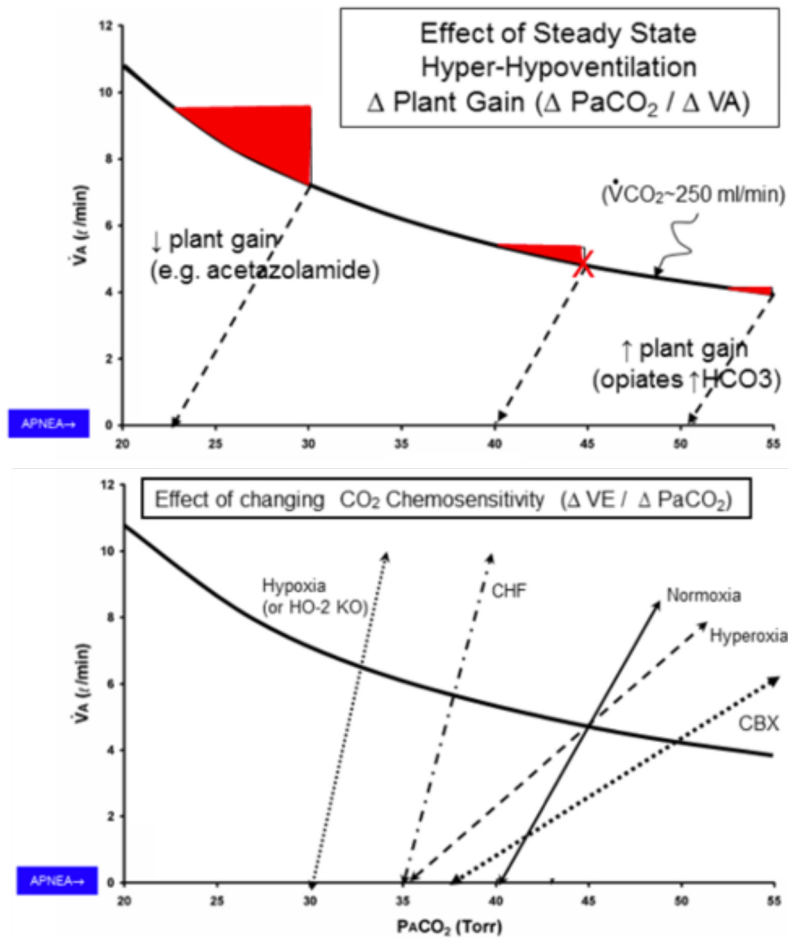


Figure 7 Diagramme de l'équation des gaz alvéolaires.

$V_A$  : ventilation alvéolaire ;  $VE$  : ventilation ;  $P_{ACO_2}$  : Pression partielle en  $CO_2$  dans les alvéoles ; CHF : chronique heart failure ou insuffisance cardiaque chronique ; CBX : carotid body denervation <sup>21</sup>.

Sur la partie haute de la Figure 7, lors d'une eupnée (respiration normale), un sujet sain à une  $P_{ACO_2}$  de 45 mmHg et il faudra augmenter artificiellement sa ventilation d'environ 1 L/min pour atteindre le seuil d'apnée de 40 mmHg. Le *plant gain* est alors de 5 ( $\frac{\Delta P_{ACO_2}}{\Delta V_A} = \frac{45-40}{1}$ ). En situation d'hyperventilation, le *plant gain* est diminué, il faudra augmenter la ventilation d'environ 2 L/min pour passer d'une  $P_{ACO_2}$  de 30 mmHg à 23 mmHg et atteindre le seuil d'apnée (*plant gain* = 3,5).

Comme nous pouvons le voir sur la partie basse de la Figure 7, dans un contexte d'hypoxie ou d'insuffisance cardiaque, les patients hyperventilent ( $V_A$  plus importante que pour la condition normoxie). De plus, le controller gain est également modifié, la chémosensibilité est augmentée à l'hypoxie ou à l'insuffisance cardiaque, la différence de  $P_{ACO_2}$  entre l'eucapnie

et le seuil d'apnée est plus faible<sup>21</sup>. En effet, le coefficient directeur des flèches en pointillées est plus important à l'hypoxie ou à l'insuffisance cardiaque qu'en normoxie. Une petite modification de  $P_{ACO_2}$  induit une réponse de  $V_A$  importante. A l'opposé, chez les animaux CBX (*carotid body denervation*) où les corps carotidiens ont été supprimés, la sensibilité à la  $P_{ACO_2}$  est fortement réduite comme en témoigne la diminution du coefficient directeur de la flèche.

Dans le cadre du SACS, la chémosensibilité est plus importante, augmentant le loop gain et entraînant une réponse excessive aux stimuli facilitant le déclenchement des apnées<sup>21</sup>.

Comme cité précédemment, physiologiquement, un séjour en altitude peut entraîner un SACS. En altitude, la fraction inspirée en  $O_2$  est réduite (hypoxie), ce qui entraîne une diminution de la saturation en dioxygène ( $PaO_2$ ). En réponse à cette faible  $PaO_2$ , les contrôleurs entraînent une hyperventilation afin d'améliorer l'oxygénation. L'hyperventilation, comme nous venons de le voir, diminue le plant gain et donc le loop gain ce qui est plutôt protecteur. Cependant, l'hypoxie sensibilise également les chémorécepteurs, augmentant le controller gain et donc le loop gain et favorise l'apparition d'apnées centrales. De plus, au cours du sommeil la sensibilité à la  $PaCO_2$  est plus forte, le passage de l'état éveillé à l'état endormi associé à une sensibilité à la  $PaCO_2$  accrue, peut déclencher une apnée.

Une fois l'apnée centrale déclenchée, la  $PaCO_2$  remonte. Cependant, la  $PaO_2$  diminue à nouveau, entraînant à la reprise de la respiration une hyperventilation, qui peut à nouveau diminuer la  $PaCO_2$  sous le seuil d'apnée. Ces boucles de rétrocontrôles, associées à une chémosensibilité accrue, sont à l'origine des apnées centrales du sommeil observées en altitude<sup>19</sup>.

En condition pathologique, comme dans le cas du patient insuffisant cardiaque, la dysfonction cardiaque diminue la perfusion, augmente la congestion pulmonaire induisant une diminution de l'oxygénation périphérique (cf. Physiopathologie de la cardiopathie ischémique page 21). Ce qui nous ramène dans les mêmes conditions que l'exemple précédent de l'altitude. A cela, il faut ajouter que le patient insuffisant cardiaque a un débit cardiaque diminué, ce qui allonge le temps de réponse entre la modification de la ventilation et la perception de cette modification par les chémorécepteurs. Cet allongement du temps de réponse prolonge l'apnée et intensifie les hypocapnies, hypercapnies et hypoxies associées à chaque apnée (Figure 6).

Les TRS sont composés des apnées obstructives, centrales et mixtes et sont associés à des conséquences physiopathologiques importantes qui font l'objet du prochain chapitre.

## **1.4. Conséquences physiopathologiques des apnées**

Comme décrit précédemment sur les tracés polysomnographiques, au cours du sommeil, chaque apnée a des répercussions physiopathologiques importantes.

### ***1.4.1. Hypoxie intermittente***

Rythmée par les apnées, qu'elles soient obstructives ou centrales, la saturation des patients apnéiques oscille au cours de la nuit. Ces cycles de désaturations-resaturations sont communément appelés hypoxie intermittente. L'hypoxie intermittente est la conséquence des apnées du sommeil la plus délétère sur le système cardiovasculaire<sup>2,25</sup> (cf. Impact des TRS et de l'hypoxie intermittente sur le système cardiovasculaire page 18). De nombreux modèles ont été mis au point afin d'étudier les mécanismes physiopathologiques de l'hypoxie intermittente sans autre facteur confondant<sup>2</sup>.

Au sein de notre laboratoire, nous avons développé une plateforme d'exposition à l'hypoxie intermittente qui permet d'exposer des Hommes, des souris, des rats ou encore des cellules à des cycles d'hypoxie intermittente (cf. Exposition à l'hypoxie intermittente page 81).

### ***1.4.2. Fragmentation du sommeil***

Après chaque apnées (obstructives et centrales), des micro-éveils surviennent lors de la reprise de la respiration. Les micro-éveils fragmentent le sommeil et sont à l'origine d'une fatigue excessive qui engendre une somnolence diurne et une diminution de la qualité de vie des patients<sup>26,27</sup>. Différents modèles de fragmentation du sommeil ont permis de montrer que la fatigue excessive augmente le risque d'accidents de la route<sup>28</sup>, induit des conséquences métaboliques délétères<sup>29</sup> et provoque un désalignement de l'horloge circadienne<sup>29</sup>.

Cependant, l'impact de la fragmentation du sommeil sur le système cardiovasculaire est limité. Par exemple, la fragmentation du sommeil n'aggrave pas la fonction ventriculaire gauche, de souris saines et de souris insuffisantes cardiaques<sup>30</sup>.

### ***1.4.3. Modification de pression intra-thoracique***

A cours des apnées obstructives, les mouvements de la cage thoracique persistent, les efforts respiratoires pendant l'obstruction sont à l'origine d'une modification de pression intrathoracique<sup>16</sup>. Pendant l'obstruction, une pression négative s'instaure dans la cage thoracique. La pression négative augmente la pression transmurale et favorise le retour veineux augmentant respectivement la post-charge et la pré-charge (Figure 8). Cependant, le SAOS

cause également une vasoconstriction des artères pulmonaires. La vasoconstriction pulmonaire associée à l'augmentation du retour veineux distendent anormalement le ventricule droit. La distension du ventricule droit empiète sur le ventricule gauche et limite son remplissage diminuant ainsi le débit cardiaque<sup>31</sup>.

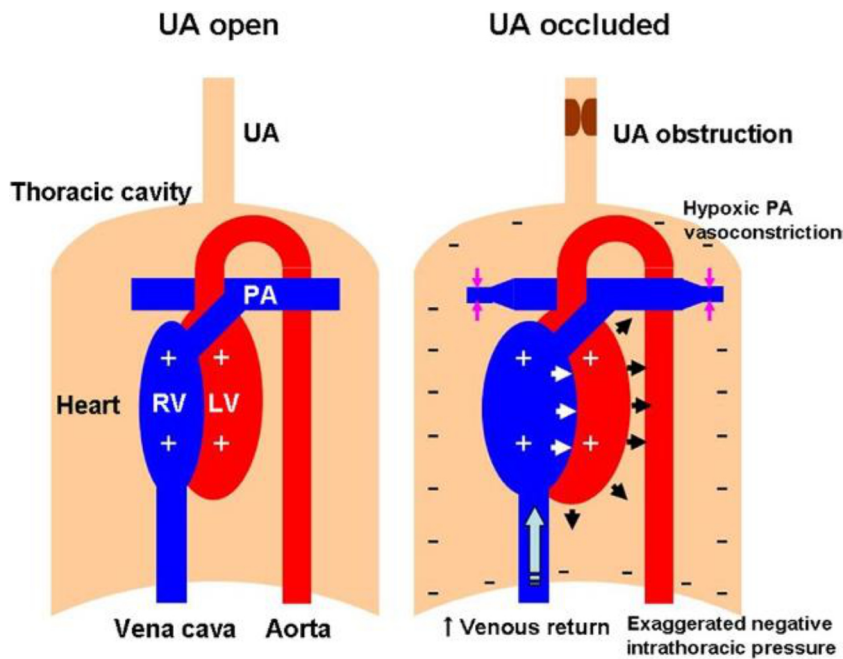


Figure 8. Impact cardiaque des modifications de pression intra-thoracique au cours d'une apnée obstructive.

UA : upper airways ; RV : right ventricle ; LV : left ventricle ; PA : pulmonary artery<sup>31</sup>.

Le SAOS et le SACS partagent des caractéristiques similaires dont l'hypoxie intermittente qui est la composante la plus délétère sur le système cardiovasculaire, et c'est celle-ci que j'ai étudié au cours de ma thèse.

## 1.5. Traitement des troubles respiratoires du sommeil

### 1.5.1. Traitement du SAOS

Parce que la majorité des patients SAOS sont en surcharge pondérale (70%) favorisant l'obstruction des voies aériennes supérieures, la prise en charge doit absolument passer par un changement de mode de vie<sup>32</sup>. De plus l'association SAOS - obésité est bidirectionnelle : l'obésité favorise l'obstruction des voies aériennes supérieures et le SAOS de par son impact sur la fatigue diurne et la somnolence change les habitudes du patient et diminue son activité physique (Figure 9). Il faut rompre ce cercle vicieux et sensibiliser le patient afin d'adapter son alimentation et son activité.

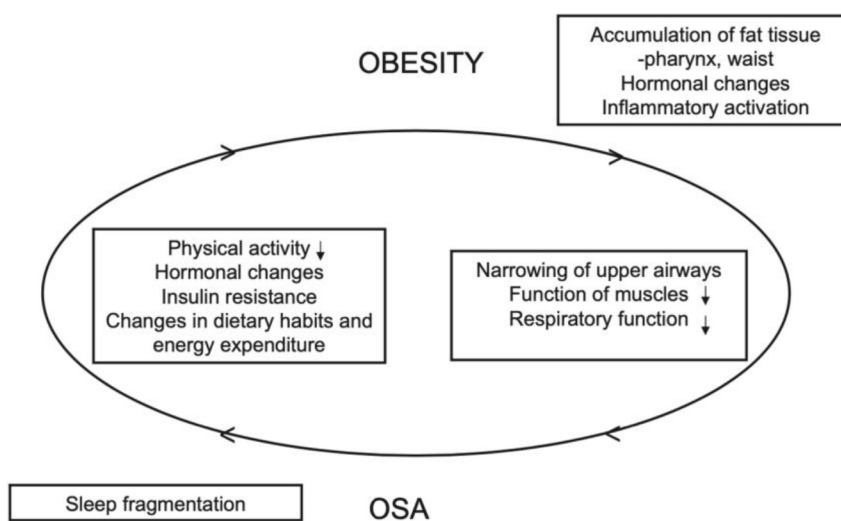


Figure 9. Association bidirectionnelle entre le SAOS et l'obésité<sup>32</sup>.

Après le changement de mode de vie, le traitement de référence du SAOS est la ventilation par pression positive continue (PPC). La PPC est constituée d'un masque, buccal ou naso-buccal, relié à un dispositif qui permet d'imposer une pression sur les voies aériennes supérieures, empêchant le collapsus et donc l'apnée. Le niveau de pression efficace est déterminé individuellement lors de l'instauration de la PPC. Il est bien démontré que la PPC diminue le nombre d'évènements apnéiques (IAH) au cours du sommeil et de ce fait améliore la saturation, la somnolence diurne et les performances cognitives<sup>11,15,33,34</sup>. Sur la polysomnographie (Figure 10), nous observons la diminution du nombre d'apnées-hypopnées après l'activation de la PPC, diminuant l'IAH, les désaturations et les micro-éveils.

Cependant, les effets bénéfiques de la PPC concernant les évènements cardiovasculaires sont controversés<sup>35-37</sup>.



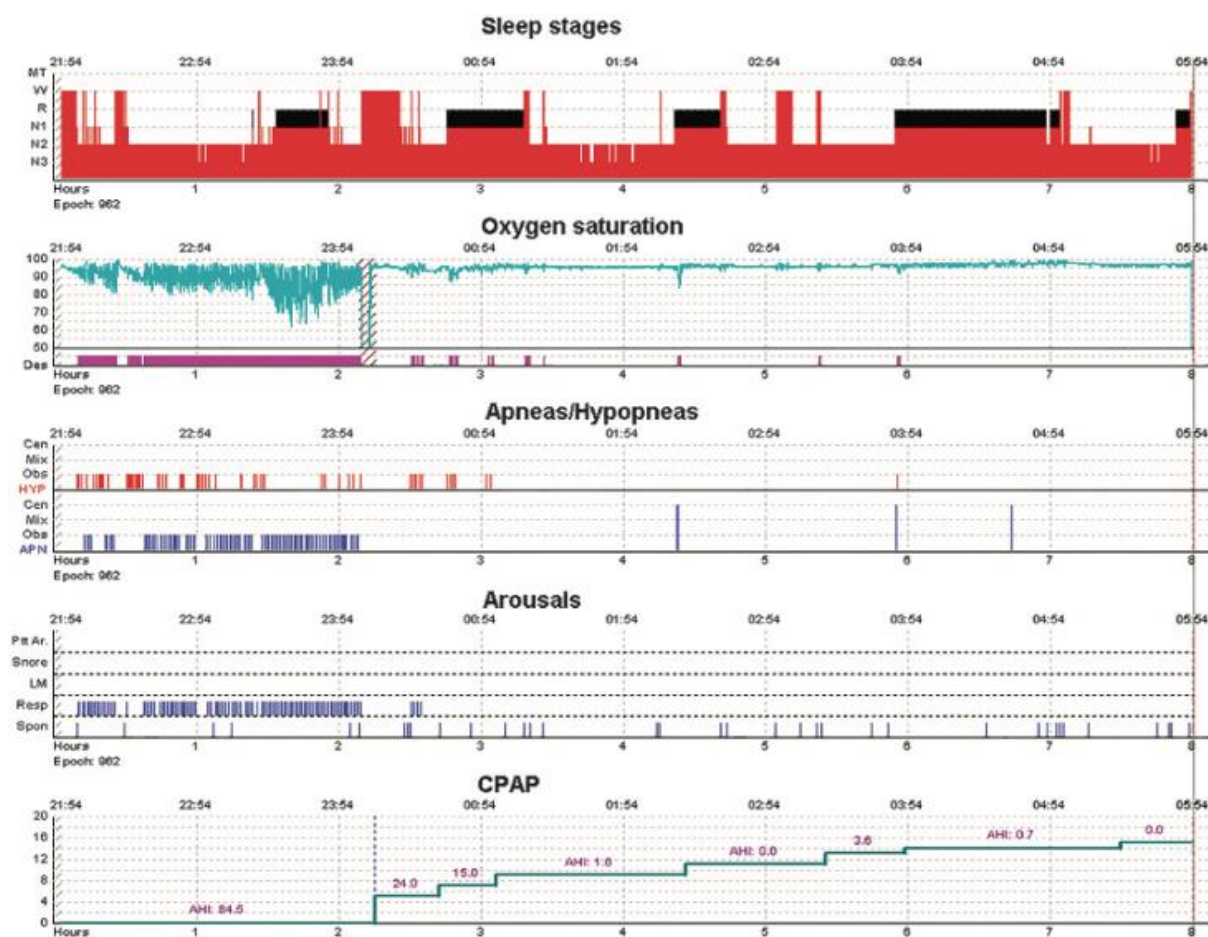


Figure 10. Impact de la PPC sur la polysomnographie d'un patient SAOS.

CPAP : continuous positive airway pressure ou PPC<sup>11</sup>.

L'observance est un paramètre important de l'efficacité de la PPC et peut être prédite en fonction des différentes sous-populations. La sévérité de la pathologie ou encore le fait d'être passé par un laboratoire du sommeil pour être appareillé sont des facteurs prédictifs de l'observance<sup>38,39</sup>.

Lorsque la PPC n'est pas tolérée et que l'obstruction est causée par une anatomie maxillo-faciale particulière, l'utilisation d'orthèse ou le recours à la chirurgie peuvent être envisagés. Les orthèses permettent de limiter les obstructions en repositionnant la mandibule, en retenant la langue ou encore en remontant le palais mou<sup>40</sup>.

Tout comme les orthèses, le recours à la chirurgie a pour objectif d'améliorer le débit des voies aériennes supérieures. L'uvulo-palato-pharyngoplastie est la chirurgie la plus couramment pratiquée. Cette chirurgie consiste en la résection d'une partie du palais mou, du pilier amygdalien et de la luette afin d'élargir les voies aériennes oropharyngiennes<sup>40</sup>.

### 1.5.2. Traitement du SACS

Les thérapies de références pour le SACS sont la ventilation auto-asservie (VAA) et la stimulation du nerf phrénique<sup>38</sup>. La VAA permet de détecter les arrêts respiratoires et de moduler la pression imposée au cours du sommeil. Cette ventilation permet de diminuer le nombre d'apnées centrales, et d'améliorer la qualité du sommeil<sup>41</sup>.

Comme décrit précédemment, la dysfonction cardiaque des patients insuffisants cardiaques est susceptible de déclencher des apnées centrales<sup>42</sup>. D'ailleurs la prévalence des apnées centrales est corrélée à la sévérité de l'insuffisance cardiaque<sup>20</sup>. Si ces apnées sont souvent considérées comme une manifestation de l'aggravation de la cardiopathie, elles participent également à l'aggravation de la fonction cardiaque<sup>43</sup>. Il est alors difficile de définir si les apnées sont à l'origine ou si elles sont la cause de l'aggravation de la cardiopathie cependant, un IAH supérieur à 30 évènements par heure est de mauvais pronostic chez ces patients<sup>44</sup>.

Traiter au mieux la cardiopathie pourrait diminuer la sévérité du SACS et interrompre le cercle vicieux SACS – insuffisance cardiaque<sup>45</sup>. Sinon des études cliniques ont essayé de traiter les apnées à l'aide de la PPC ou de la VAA.

L'étude « *Canadian Continuous Positive Airway Pressure for Patients with Central Sleep Apnea and Heart Failure* » (CANPAP) a montré que l'utilisation de la PPC chez des patients insuffisants cardiaques diminue l'IAH, augmente la saturation et la fraction d'éjection entre 3 mois et 2 ans. Cependant, cette étude manquait de puissance statistique et n'a pas mis en évidence d'effet bénéfique de la PPC sur la mortalité<sup>46</sup>.

L'étude « *Adaptive Servo Ventilation in Patients with Heart Failure* » (SERVE-HF) a traité des patients insuffisants cardiaques (fraction d'éjection inférieur à 45%) avec la VAA. L'utilisation de la VAA n'a pas amélioré la qualité de vie de ces patients. Au contraire, l'essai clinique a été stoppé brutalement puisque la mortalité était plus importante de 34% dans le groupe traité avec la VAA par rapport au groupe non traité<sup>47</sup>.

La stimulation du nerf phrénique pourrait être une bonne alternative pour la prise en charge de ces patients, elle permet de restaurer un *pattern* de respiration physiologique pendant le sommeil, elle est bien tolérée, elle améliore l'oxygénation et la qualité de vie des patients<sup>48,49</sup>. Cependant, il n'y a pour le moment pas d'étude sur l'impact de la stimulation du nerf phrénique chez les insuffisants cardiaques.

Dans le cas particulier des apnées centrales causées par l'altitude, un traitement pharmacologique peut être envisagé. L'acétazolamide, en inhibant l'anhydrase carbonique, crée une acidose métabolique, éloignant le sujet de son seuil d'apnée et diminuant les apnées centrales<sup>50,51</sup>.

Alors que les supports pressionnelle (PPC / VAA) sont les traitements de référence des TRS, aucune étude à ce jour n'a mis en évidence une amélioration du pronostic des patients souffrants d'apnée du sommeil et de maladie cardiovasculaire. C'est pourquoi, il est important d'étudier les mécanismes impliqués afin de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour la prise en charge de ces patients.

## **2. IMPACT DES TRS ET DE L'HYPOXIE INTERMITTENTE SUR LE SYSTEME CARDIOVASCULAIRE**

### **2.1. Hypertension artérielle**

Les TRS en dehors de tout facteurs confondants augmentent la pression artérielle de manière proportionnelle à l'IAH et ce même chez des apnéiques légers et modérés<sup>52,53</sup>. En effet, l'hypoxie intermittente causée par les apnées entraînent une augmentation de la pression artérielle au cours de la nuit et cette augmentation persiste également la journée, à distance des apnées<sup>52</sup>.

L'hypoxie intermittente joue un rôle clé dans l'hypertension causée par les TRS. L'exposition de volontaires sains ou de rats 14 jours à l'hypoxie intermittente, augmente la pression artérielle<sup>4,54</sup>.

### **2.2. Athérosclérose**

Les patients apnéiques présentent des signes précoces de développement de l'athérosclérose, une inflammation de bas grade et une augmentation de l'épaisseur de la paroi artérielle (épaisseur intima-média), associée à une vitesse d'onde de pouls plus importante<sup>55</sup>. Des angiogrammes de patients coronariens ont révélé que la sévérité de l'athérosclérose coronaire est corrélée aux désaturations nocturnes<sup>56</sup>. Les apnées du sommeil en accélérant le développement de l'athérosclérose, en induisant une inflammation de bas grade et une hypertension artérielle, augmentent ainsi le risque d'infarctus du myocarde.

Des études chez l'animal ont montré que 2 semaines d'hypoxie intermittente induisent une inflammation systémique de bas grade et une inflammation vasculaire associée à une dyslipidémie et un remodelage vasculaire<sup>57,58</sup>. Cette inflammation participerait à l'accélération du développement de l'athérosclérose observée après une exposition à l'hypoxie intermittente<sup>58</sup>.

### **2.3. Arythmies**

Les TRS augmentent également le risque d'arythmie provoquant des fibrillations auriculaires ou encore des arythmies ventriculaires<sup>59</sup>. Les arythmies causées par les TRS ont été corrélées avec l'augmentation de la fréquence de mort subite au cours du sommeil, elles-mêmes corrélées aux désaturations nocturnes en dehors de tout facteur confondant<sup>60</sup>.

Des études récentes ont montré avec des durées d'expositions différentes, de une et six semaines, que l'hypoxie intermittente induit un remodelage auriculaire et augmente le risque d'arythmie<sup>61,62</sup>.

Plusieurs mécanismes pro-arythmogènes ont été décrits chez les patients apnéiques tels que la diminution de la période réfractaire auriculaire, une prolongation de l'intervalle QT ou encore une automaticité anormale (dépolarisations précoces ou retardées)<sup>63</sup>. La prolongation de l'intervalle QT a été retrouvée chez des rats exposés 2 semaines à l'hypoxie intermittente, associée à une augmentation des fibrillations ventriculaires létales lors d'un épisode d'ischémie-reperfusion<sup>64</sup>.

#### **2.4. Infarctus du myocarde**

Non seulement les TRS sont un facteur de risque indépendant de développer un infarctus du myocarde<sup>65</sup>, mais, pour une même zone à risque (même zone ischémisée), la zone infarctée est plus importante et ce même 3 mois après l'infarctus<sup>66</sup>. En effet lors de l'infarctus du myocarde les patients apnéiques présentent une ischémie myocardique prolongée, une moins bonne récupération myocardique et une altération du remodelage des ventricules droit et gauche comparés aux patients non apnéiques<sup>67</sup>.

Sur des modèles de rongeurs l'hypoxie intermittente reproduit l'augmentation de la taille de l'infarctus, en augmentant la sensibilité du myocarde à un épisode d'ischémie reperfusion, notamment via l'augmentation de l'activité de HIF-1 et du stress du réticulum endoplasmique pro-apoptotique<sup>68,69</sup>.

#### **2.5. Cardiopathie ischémique – Insuffisance cardiaque**

Un suivi longitudinal de patients post-infarctus du myocarde a permis de mettre en évidence que les TRS augmentent les admissions pour insuffisance cardiaque compensée<sup>70</sup>. Nakashima *et al.* observent une moindre récupération fonctionnelle 21 jours après un infarctus du myocarde chez les patients souffrants de SAOS<sup>71</sup>. De plus, plusieurs études cliniques ont montré une augmentation de la mortalité chez les patients souffrant d'insuffisance cardiaque et d'apnées du sommeil, qu'elles soient centrales ou obstructives<sup>1,72-75</sup> (Figure 11).

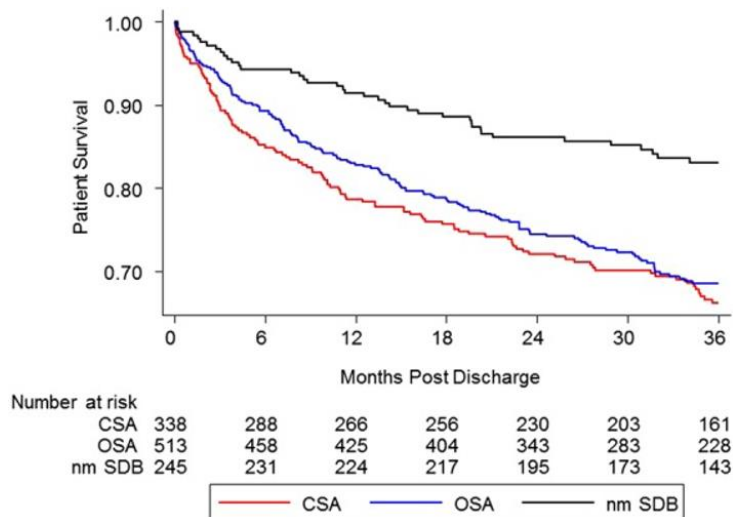


Figure 11. Kaplan–Meier de la survie des patients insuffisants cardiaques et apnéiques.

Sans ou avec peu d'apnée du sommeil (nmSDB: no or minimal sleep disordered breathing), avec des apnées centrales (CSA, central sleep apnea), avec des apnées obstructives (OSA: obstructive sleep apnea)<sup>1</sup>.

Une seule étude très récente de Du Yunhui *et al.*, s'est intéressée à l'impact de l'hypoxie sur la cardiopathie ischémique et a montré que l'hypoxie intermittente aggrave la cardiopathie<sup>76</sup>, étude sur laquelle nous reviendrons dans la discussion de ce travail de thèse.

Quelques études se sont intéressées à l'impact de l'hypoxie intermittente sur le développement de l'insuffisance cardiaque non ischémique et les effets sont controversés. Nagshin *et al.*, avec un modèle particulier d'insuffisance cardiaque chez la souris (surexpression du TNF $\alpha$ : tumor necrosis factor  $\alpha$ ), ont montré que 4 semaines d'hypoxie intermittente induisaient une réponse adaptative en améliorant la fonction cardiaque<sup>77</sup>. Au contraire, à Li *et al.*, en utilisant un modèle de rat préalablement insuffisant cardiaque (12 semaines de constriction aortique), ont montré qu'une exposition de 4 semaines à l'hypoxie intermittente induit une inflammation persistante et aggrave la dysfonction cardiaque<sup>78</sup>.

Les TRS sont un facteur de risque cardiovasculaire important, augmentant l'hypertension, le développement de l'athérosclérose, les arythmies, la taille de l'infarctus du myocarde et la mortalité post-infarctus du myocarde. L'hypoxie intermittente est une composante majeure des TRS responsable des effets cardiovasculaires. Cependant, l'implication de l'hypoxie intermittente dans le développement de la cardiopathie ischémique ainsi que les mécanismes mis en jeu restent peu connus et ont fait l'objet de ma thèse.

### 3. PHYSIOPATHOLOGIE DE LA CARDIOPATHIE ISCHEMIQUE

La cardiopathie ischémique représente la première cause de mortalité dans le monde avec une augmentation de 16,6% entre 2005 et 2015 pour atteindre 9,1 millions de mort par an<sup>79</sup> (Figure 12).

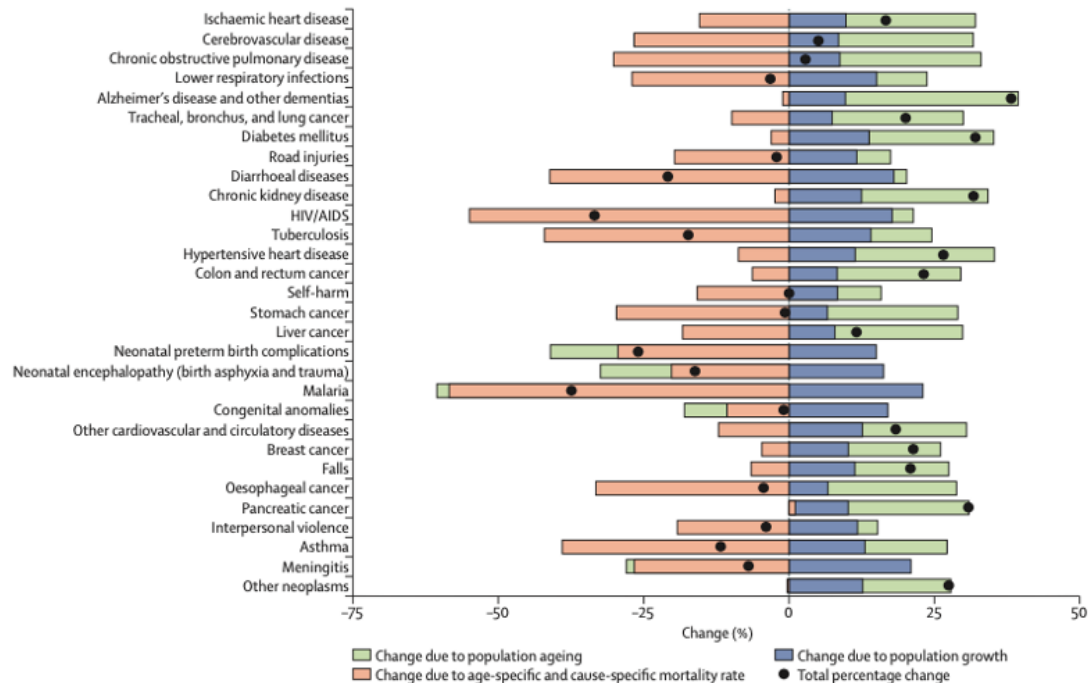


Figure 12. Évolution des causes de mortalité entre 2005 et 2015.

Classé par ordre décroissant du mortalité<sup>79</sup>.

L'augmentation de la prévalence des facteurs de risques cardiovasculaires tels que le vieillissement de la population, l'obésité, l'hypertension artérielle, l'hypercholestérolémie ou encore le diabète contribue à l'augmentation de l'incidence des cardiopathies ischémiques<sup>80</sup>. L'amélioration des traitements après un infarctus du myocarde entre 1970 et 1999 a diminué la mortalité post-infarctus (de 41,1% à 17,3%). Cependant, le nombre de patients vivant avec un infarctus du myocarde a augmenté et le développement de la cardiopathie ischémique peut conduire à l'insuffisance cardiaque (l'incidence de l'insuffisance cardiaque post-infarctus du myocarde est passé de 27,6% à 31,8%)<sup>81</sup>. Une études rétrospective entre 1998 et 2012 n'a pas montré d'amélioration de la survie, 50 % des patients décèdent 5 ans après le diagnostic de leurs insuffisances cardiaques<sup>82</sup>.

Nous avons vu précédemment que les apnées du sommeil augmentent la mortalité des patients insuffisants cardiaques et que les TRS touchent environ 50% des patients insuffisants cardiaques<sup>83</sup>. C'est pourquoi il semble important de diagnostiquer les TRS chez les patients après un infarctus du myocarde et de bien comprendre la physiopathologie de la cardiopathie ischémique afin d'améliorer la prise en charge de ces patients.

### 3.1. Rappel de physiologie cardiaque

Pour plus de clarté dans la suite du manuscrit, il est nécessaire de redéfinir quelques notions de physiologie cardiaque afin de mieux interpréter l'impact du remodelage cardiaque et de l'activation des mécanismes neuro-hormonaux dans le contexte physiopathologique de la cardiopathie ischémique.

En situation physiologique le débit cardiaque (DC) dépend du volume éjecté à chaque contraction (VES : volume d'éjection systolique) et de la fréquence cardiaque (FC) :

$$\text{DC} = \text{VES} \times \text{FC}.$$

Le débit cardiaque impacte la pression artérielle (PA) et donc la perfusion systémique. Le diamètre des artérioles, les résistances périphériques totales (RPT) participent à la régulation de la pression artérielle :  $\text{PA} = \text{DC} \times \text{RPT}$ .

Le débit cardiaque dépend (Figure 13) :

- De la précharge, ou remplissage des ventricules. Le remplissage dépendra du retour veineux, du tonus veineux et de la volémie. Selon la loi de Franck-Starling plus le volume en fin de diastole (volume télé-diastolique) est important plus la contraction et donc le VES sera important.
- De la contractilité du myocarde (inotropisme).
- De la postcharge, les forces qui s'opposent à l'éjection du ventricule, par exemple la PA et le RPT.

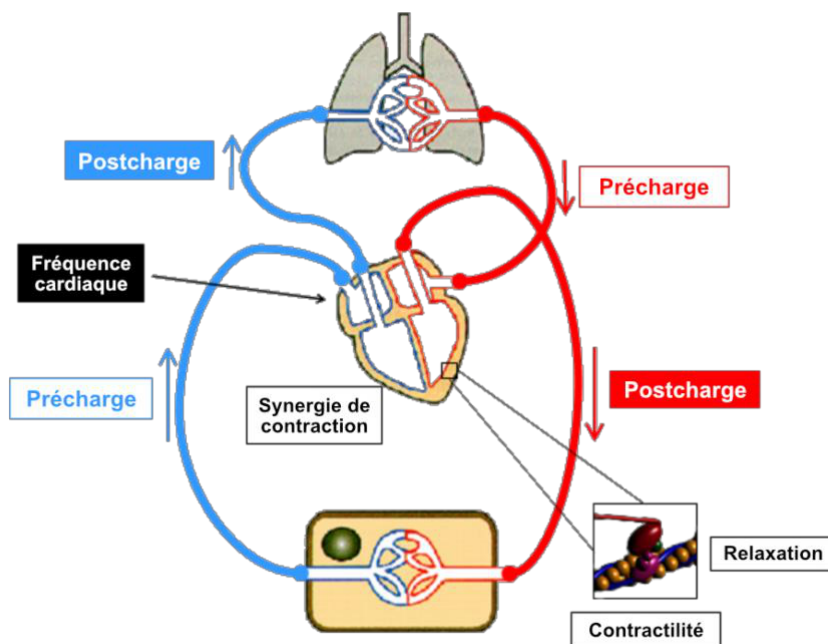


Figure 13. Fonction cardiaque : notions de précharge et postcharge.

Pour finir, selon la loi de Laplace : 
$$\text{Tension pariétale} = \frac{\text{Pression du VG} \times \text{rayon du VG}}{\text{Epaisseur de la paroi du VG}}$$



### 3.2. Infarctus du myocarde

L'infarctus du myocarde est défini comme étant une destruction partielle du myocarde causée par une ischémie myocardique<sup>84</sup>. L'ischémie est définie comme un déséquilibre entre l'apport en dioxygène et nutriments, et les besoins du tissu. L'infarctus du myocarde sera classifié en 5 différents types en fonction de l'ischémie et du pronostic clinique.

L'infarctus du myocarde de type 1 est le plus commun, c'est l'infarctus du myocarde spontané qui survient généralement suite à la rupture d'une plaque athéromateuse, qui vient occlure l'artère menant à la mort cellulaire de la zone non perfusée (Figure 14).

Dans le cas du type 2, c'est un déséquilibre entre les apports et les besoins du tissu qui se met en place. Par exemple, une augmentation des besoins, suite à une stimulation catécholaminergique importante non compensée par un apport plus important (dysfonction endothéliale, présence d'une plaque d'athérome), ce qui entraîne la mort cellulaire (Figure 14).

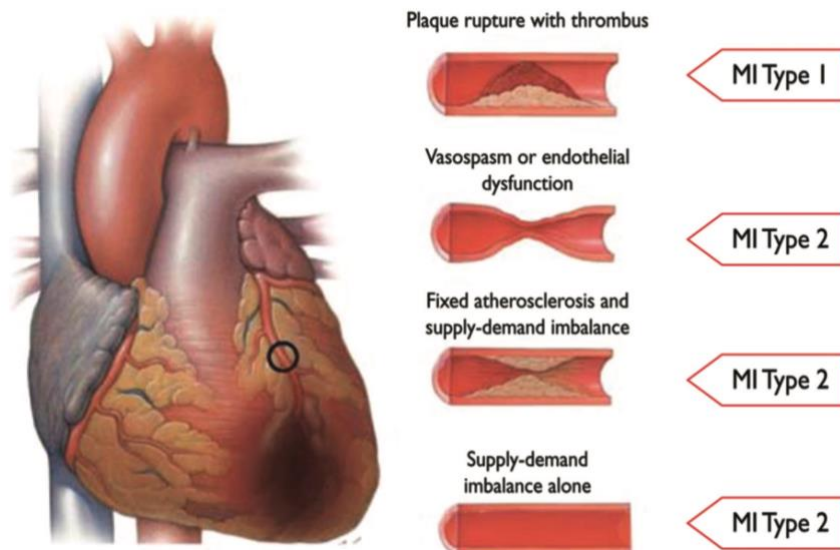


Figure 14. Exemple d'infarctus de type 1 et 2<sup>84</sup>.

Le type 3 est fonction du pronostic clinique, c'est un décès causé par un infarctus du myocarde. En ce qui concerne le type 4 et 5, l'ischémie est liée à des procédures de revascularisation<sup>84</sup>.

La taille de l'infarctus étant un facteur de mauvais pronostic<sup>85</sup>, il est important qu'elle soit la plus petite possible. Plusieurs paramètres conditionnent la taille de l'infarctus du myocarde, la taille du territoire ischémié (la zone à risque) et la durée de l'ischémie. Plus la zone à risque est grande, plus l'ischémie est longue et plus la taille de l'infarctus sera importante<sup>86</sup>. C'est pourquoi il faut prendre en charge rapidement les patients lors d'un accident

ischémique et lever l'ischémie, c'est-à-dire reperfuser le myocarde par une intervention coronarienne percutanée.

Seulement, la reperfusion, en apportant de nouveau le dioxygène, les ions, les cellules circulantes, induit un stress oxydatif, une augmentation intracellulaire de calcium, un rétablissement du pH et une inflammation entraînant l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale (PTPm). L'ouverture du PTPm permet le passage de grosses molécules <1,5 kDa comme les cytochromes c et conduit à l'apoptose de la cellule. L'ouverture prolongée du PTPm laisse également entrer des solutés et de l'eau dans la mitochondrie pouvant entraîner sa lyse et le relargage de facteurs pro-apoptotiques ainsi que de nombreux ions conduisant à l'apoptose ou la nécrose du cardiomyocyte (l'unité cellulaire contractile du cœur)<sup>87,88</sup> (Figure 15).

Les lésions d'ischémies et de reperfusion participent à la taille finale de l'infarctus du myocarde.

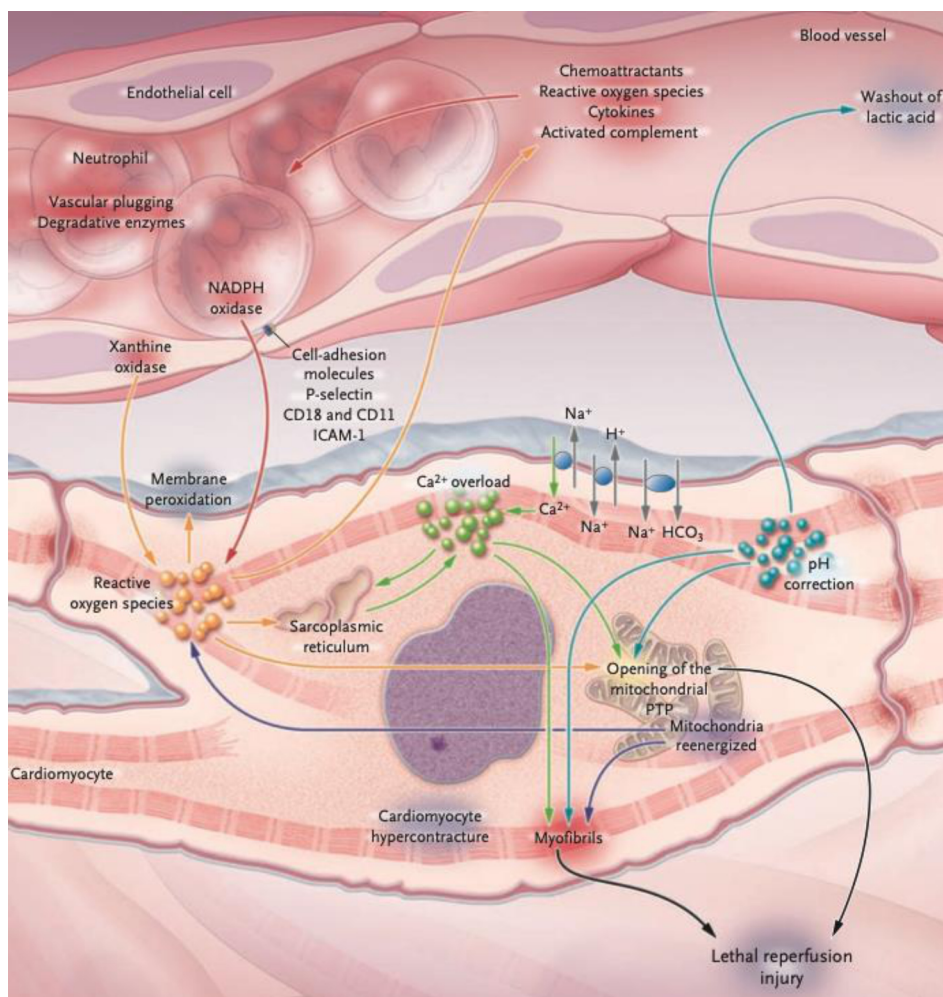


Figure 15. Ouverture du MPTP induite par un épisode d'ischémie-reperfusion.

L'inhibition du MPTP par la cyclosporine-A permet de réduire de 50% la taille de l'infarctus du myocarde<sup>87,89</sup>.

Lors de l'ischémie-reperfusion un nombre important de cardiomyocytes nécrosent ou entrent en apoptose dans la zone à risque. La mort des cardiomyocytes est irréversible et cela a des répercussions sur le myocarde au niveau structurel et fonctionnel.

Au niveau structurel, dans la zone infarctée, les cardiomyocytes nécrosés vont être remplacés par une cicatrice. En effet, lors de la nécrose, les cellules relarguent des alarmines, des molécules endogènes qui stimulent l'inflammation ce qui permet d'éliminer les débris cellulaires. Afin de conserver l'intégrité du cœur, les cardiomyocytes sont remplacés par de la matrice extracellulaire (MEC) riche en collagène. Les fibroblastes prolifèrent, se différencient en myofibroblastes et sécrètent la MEC nécessaire à la formation de la cicatrice. Une fois la cicatrice formée et les protéines de collagène liées entre elles, les fibroblastes deviennent quiescents ou rentrent en apoptose<sup>90</sup> (Figure 16).

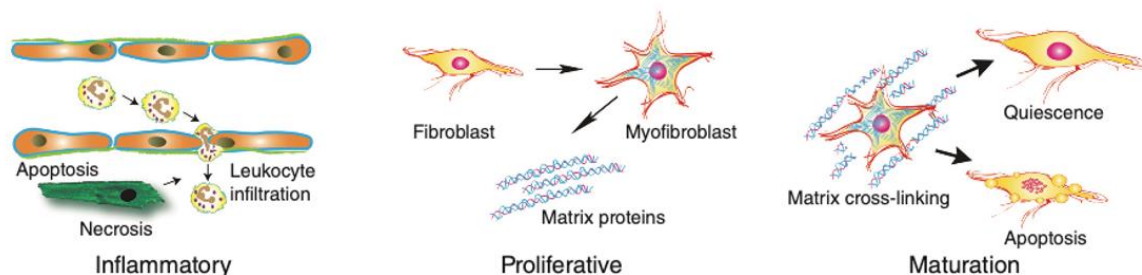


Figure 16. Formation en 3 phases de la cicatrice après un infarctus du myocarde<sup>90</sup>.

Si cette cicatrice néoformée est indispensable pour empêcher la rupture du ventricule, elle est non fonctionnelle que ce soit en termes de conduction du courant ou de contractilité, favorisant ainsi les arythmies ventriculaires et amenant une dysfonction contractile<sup>91</sup>.

Au niveau fonctionnel, la perte de contractilité engendrée par le déficit de cardiomyocytes diminue le débit cardiaque et active des mécanismes neuro-hormonaux compensatoires, tels que l'activité du système nerveux sympathique et/ou du système rénine angiotensine aldostérone (SRAA) (ces mécanismes sont abordés plus en détails dans la partie 4 page 40). Ces mécanismes neuro-hormonaux vont augmenter la précharge, la postcharge, la contractilité et donc le débit cardiaque.

Brièvement, l'activité sympathique permet d'augmenter la contractilité (effet inotrope positif), la fréquence (effet chronotrope positif), la vitesse de conduction (effet dromotrope positif) et l'excitabilité (effet bathmotrope positif) cardiaque afin de maintenir un débit cardiaque suffisant en post-infarctus du myocarde<sup>92</sup>. Le SRAA, par l'action de l'angiotensine II et de l'aldostérone, augmente la vasoconstriction, la volémie et *in fine* la pression artérielle, afin d'améliorer la perfusion systémique.

### 3.3. Cardiopathie ischémique

Le terme cardiopathie ischémique regroupe un grand nombre d'anormalités cardiaques causées par un infarctus du myocarde<sup>93</sup>.

Suite à l'infarctus du myocarde, la fine cicatrice de collagène qui remplace les cardiomyocytes augmente les contraintes pariétales du myocarde et diminue la contractilité et donc le débit cardiaque. La diminution du débit cardiaque entraîne une activation des mécanismes neuro-hormonaux pour compenser la chute de débit et de pression artérielle.

Les contraintes pariétales importantes et l'activation des mécanismes neuro-hormonaux initient un remodelage cardiaque. Le remodelage correspond à une modification de la géométrie globale du cœur, des cellules et de la composition de la matrice extracellulaire<sup>94</sup>. Le remodelage ne se restreint pas à la zone infarctée, il a également lieu à distance de l'infarctus dans la partie saine du myocarde. Nous verrons dans la suite de ce chapitre qu'au cours du remodelage, le ventricule gauche se dilate, devient sphérique, s'hypertrophie et des phénomènes de fibrose et d'apoptose et/ou nécrose s'installent.

La physiopathologie du remodelage post-infarctus du myocarde est complexe, multifactorielle et une description exacte des toutes les voies de signalisations et des cellules impliquées dans le remodelage du ventricule gauche n'est pas connue<sup>95</sup>.

Cependant, si le remodelage permet de limiter la perte de fonction cardiaque en post-infarctus du myocarde, un remodelage excessif pourra contribuer à la décompensation cardiaque<sup>96</sup> (Figure 17).

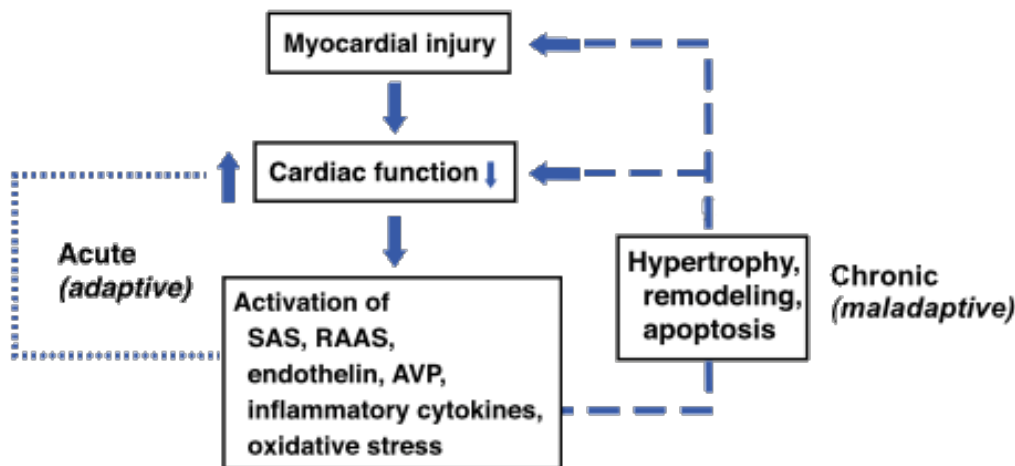


Figure 17. Les mécanismes de compensation post-infarctus du myocarde (adaptatif en aiguë, mal-adaptatif au long court)

Adapté de Braunwald 2013<sup>96</sup>. SAS : sympathetic adrenal system ; RAAS : renin angiotensine aldosterone system. Le SAS et RAAS font partie de la réponse neuro-hormonale.

Si le remodelage cardiaque est initialement adaptatif, la prise en charge actuelle cherche à ralentir voir à reverser le remodelage mal-adaptatif cardiaque<sup>95</sup>.

### 3.3.1. Dilatation ventriculaire

La dilatation ventriculaire correspond à un élargissement de la cavité du ventricule. Physiologiquement, des fibres de collagène sont présentes au sein du ventricule et permettent de maintenir sa structure et son intégrité. Comme décrit précédemment, la phase inflammatoire en post-infarctus du myocarde permet l'élimination des débris cellulaires dans la zone ischémisée. Cependant, l'inflammation participe également, via la sécrétion de métalloprotéinases matricielles à la dégradation du squelette de collagène et ce, même à distance de l'infarctus. La dégradation du squelette de collagène initie la dilatation du ventricule et le rend sphérique<sup>97,98</sup> (Figure 18). Plus l'infarctus du myocarde initial est important plus la dilatation du ventricule est importante<sup>99,100</sup>.

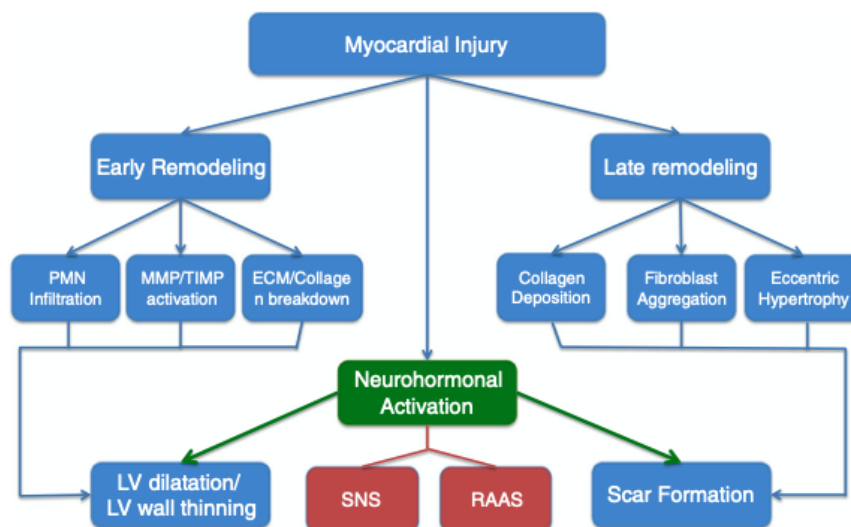


Figure 18. Remodelage cardiaque post infarctus du myocarde.

*Early Remodeling* : remodelage précoce ; *PMN infiltration* : infiltrat de leucocytes polymorphonucléaire ; *MMP* : métalloprotéinase matricielle (dégrade la matrice extracellulaire) ; *TIMP* : tissue inhibitors of metalloproteinases (inhibe les MMP) ; *ECM* : matrice extracellulaire (MEC) ; *LV* : Left ventricle ou ventricule gauche ; *SNS* : Système nerveux sympathique ; *RAAS* ou *SRAA* : Système rénine angiotensine aldostérone<sup>98</sup>.

La dilatation ventriculaire permet de maintenir un débit cardiaque suffisant. En effet, Pfeffer et Braunwald ont montré que la fraction d'éjection diminue de manière proportionnelle à la taille de l'infarctus du myocarde, pourtant ce n'est pas le cas du débit cardiaque. La fraction d'éjection représente le pourcentage de volume éjecté à chaque cycle cardiaque. Le débit cardiaque représente le volume de sang éjecté par minute. La dilatation et la sphéricité du ventricule permet d'augmenter le volume télédiastolique (le remplissage du ventricule) et comme décrit précédemment, selon la loi de Frank-Starling plus le volume télédiastolique est grand plus la contraction et donc le débit cardiaque est important<sup>101</sup>. Malgré un défaut de contractilité et une fraction d'éjection plus faible, la dilatation ventriculaire permet de limiter la chute du débit cardiaque.

Cependant, la dilatation ventriculaire est également associée à un taux de survie plus faible<sup>102,103</sup>. En effet, l'augmentation du volume ventriculaire et l'amincissement des parois induits par la dilatation augmentent les tensions pariétales (loi de Laplace), dilatant d'avantage le ventricule et induisant une hypertrophie afin de compenser ces tensions pariétales<sup>104,105</sup>.

### **3.3.2. Hypertrophie pathologique**

L'hypertrophie se caractérise par une augmentation du volume des cardiomyocytes augmentant l'épaisseur des parois du ventricule et permettant la diminution des tensions pariétales.

Si l'hypertrophie peut être physiologique et adaptative, lors de la croissance, de la grossesse ou chez le sportif entraîné, dans le cas de cardiopathie, cette hypertrophie est pathologique et difficilement réversible. L'hypertrophie pathologique se caractérise par une réexpression des gènes du programme fœtal et est associée à une diminution de fonction cardiaque, à une augmentation de la fibrose interstitielle et à une nécrose ou apoptose des cardiomyocytes<sup>106</sup>. L'hypertrophie pathologique prolongée augmente le risque d'arythmies, de morts subites, de cardiopathies dilatées et d'insuffisances cardiaques<sup>107</sup>.

L'activation neuro-hormonale, associée au stress pariétale causée par l'infarctus du myocarde et la dilatation induisent une hypertrophie pathologique<sup>108</sup>. Comme le montre la Figure 19, adaptée de la publication de van Berlo *et al.*, de nombreuses voies de signalisations sont impliquées dans l'hypertrophie pathologique et sont décrites ci-dessous. Ces voies de signalisation activent *in fine* les facteurs de transcriptions, facteur nucléaire des lymphocytes T activés (NFAT), *myocyte enhancer factor-2* (MEF2) et GATA4, entraînant la réexpression des gènes du programme fœtal comme MYH7 et Acta1 codant pour les protéines  $\beta$ -MHC et  $\alpha$ -actine squelettique, non exprimées physiologiquement à l'âge adulte et favorisant l'hypertrophie<sup>107,109,110</sup>.

L'activation neuro-hormonale, comprenant l'activation sympathique et l'activation du SRAA, active les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques et les récepteurs à l'angiotensine II, respectivement. Cette activation neuro-hormonale modifie les concentrations intracellulaires de calcium, activant la calmoduline la calcineurine, la CamKII (Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II), augmentant l'expression de NFAT et de HDAC (histone désacétylase)<sup>107</sup>.

Différents facteurs neuroendocrines, comme l'angiotensine II, l'endothéline-I, les catécholamines peuvent également se fixer sur des RCPGs (récepteurs couplés aux protéines G) et activer la voie des MAPK (*Mitogen-activated protein kinases*)<sup>111</sup>. La voie des MAPK participe à l'hypertrophie pathologique en induisant également la transcription des gènes du programmes fœtal via l'activation de NFAT, MEF2 et GATA4<sup>107</sup>.

Le stress pariétal, via les TRPC (*transient receptor potential cation channels*) 3 et 6 (canaux cationiques mécano-sensibles), participe également à l'entrée de calcium dans les cardiomyocytes et favorise l'hypertrophie pathologique<sup>112</sup>. En effet, l'élévation de calcium intracellulaire active NFAT par déphosphorylation via la voie TRPC6-calmoduline-calcineurine-NFAT, augmentant ainsi la transcription du gène du programme fœtal MYH7 et la traduction de  $\beta$ -MHC (*Myosine Heavy Chain* ou chaîne de myosine lourde)<sup>107,113,114</sup>.

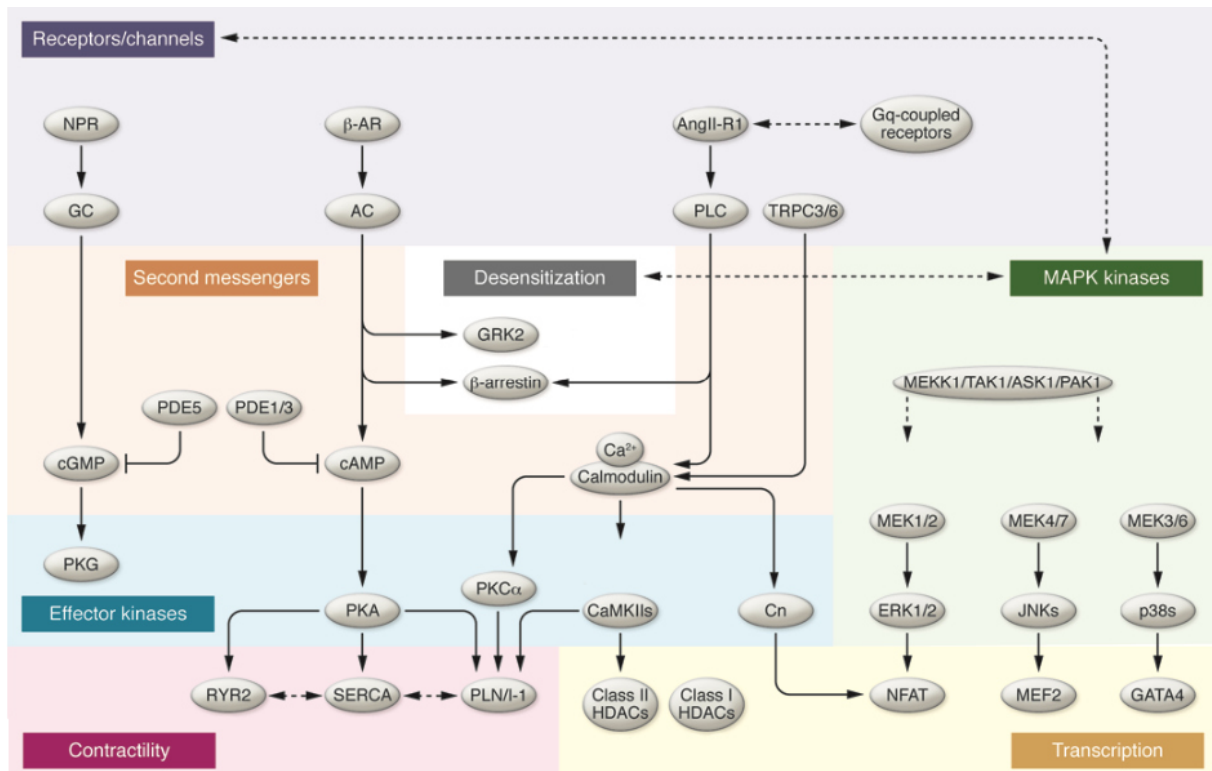


Figure 19. Voies de signalisations impliquées dans l'hypertrophie ventriculaire.

NFAT, MEF2, and GATA4 sont des facteurs de transcription connu pour être activés en conditions pathologiques. GPCR-BA, G-protein coupled receptor biased agonist ou RCPG, biased toward G-protein signaling;  $\beta$ -arrestin-BA,  $\beta$ -arrestin biased agonist. AC, adenylyl cyclase; ACE, angiotensin-converting enzyme;  $\beta$ -AR,  $\beta$ -adrenergic receptor; ARB, angiotensin receptor blocker; GC, guanylate cyclase;  $\beta$ -ARK-CT,  $\beta$ -adrenergic receptor kinase carboxyl terminus; NPR, natriuretic peptide receptor; PLC, phospholipase C; PLN, phospholamban; I-1, PPI inhibitor 1; RYR2, ryanodine receptor 2; SERCA, sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  ATPase. Les lignes en pointillés indiquent des voies indirectes<sup>107</sup>.

Des modèles animaux d'hypertrophie par augmentation de la post-charge (constriction aortique) permettent d'étudier les mécanismes de l'hypertrophie pathologique. Ces modèles chez le rat, ont permis de mettre en évidence que la forme  $\alpha$ -MHC est majoritaire dans le cœur

sain, alors qu'à l'hypertrophie pathologique on observe un shift de la transcription pour le gène *MYH7* qui code pour la forme  $\beta$ -MHC<sup>115</sup>. Cette modification structurelle du sarcomère impacte la fonction, la forme  $\beta$ -MHC a une vitesse de raccourcissement plus lente mais une contraction plus importante<sup>116</sup>.

La réexpression des gènes du programme fœtal n'entraîne pas que des modifications des protéines de la contractilité, tels que  $\beta$ -MHC ou encore l' $\alpha$ -actine squelettique, mais aussi des peptides natriurétique comme ANP (peptide natriurétique atrial) et BNP (brain natriuretic peptide)<sup>108,116,117</sup>. ANP et BNP sont des facteurs diurétiques ré-exprimés de manière chronique dans la cardiopathie et permettent, par leur action de diurèse et de vasodilatation, de diminuer les tensions pariétales<sup>117</sup>.

C'est pourquoi le BNP et son précurseur le NT-ProBNP, qui a une demi-vie plus longue, sont utilisés comme biomarqueur de la sévérité et de la qualité de prise en charge de l'insuffisance cardiaque<sup>118</sup>. La troponine est aussi utilisé comme marqueur de souffrance des cardiomyocytes, c'est une protéine des sarcomères qui ne se retrouve dans le plasma qu'en cas de mort cellulaire, d'infarctus du myocarde et d'insuffisance cardiaque avancée<sup>119</sup>.

### ***3.3.3. Fibrose interstitielle***

La fibrose est une accumulation de MEC, composée majoritairement de collagène de type I et III<sup>108</sup>. La fibrose n'est pas présente uniquement au niveau de la zone infarctée lors de l'ischémie (fibrose réactive ou cicatricielle), on la retrouve aussi autour des vaisseaux (fibrose péri-vasculaire) et dans le tissu cardiaque à distance de l'infarctus (fibrose interstitielle)<sup>120</sup>.

Comme décrit précédemment dans l'infarctus aigu du myocarde, les fibroblastes se différencient en myofibroblastes et sécrètent de la MEC. La matrice extracellulaire permet de maintenir l'intégrité du myocarde, de transmettre les signaux électriques et les forces mécaniques entre la systole et la diastole. Cependant, la fibrose interstitielle, par l'accumulation de collagène dans la MEC, altère l'élasticité du ventricule diminuant le remplissage du ventricule (dysfonction diastolique) et altère la conductivité et la contractilité (arythmies et dysfonction systolique)<sup>108,121</sup>.



La fibrose interstitielle est bien décrite pour être caractéristique d'une mal-adaptation pathologique et est de mauvais pronostic dans la progression de la cardiopathie ischémique<sup>122</sup> (Figure 20).

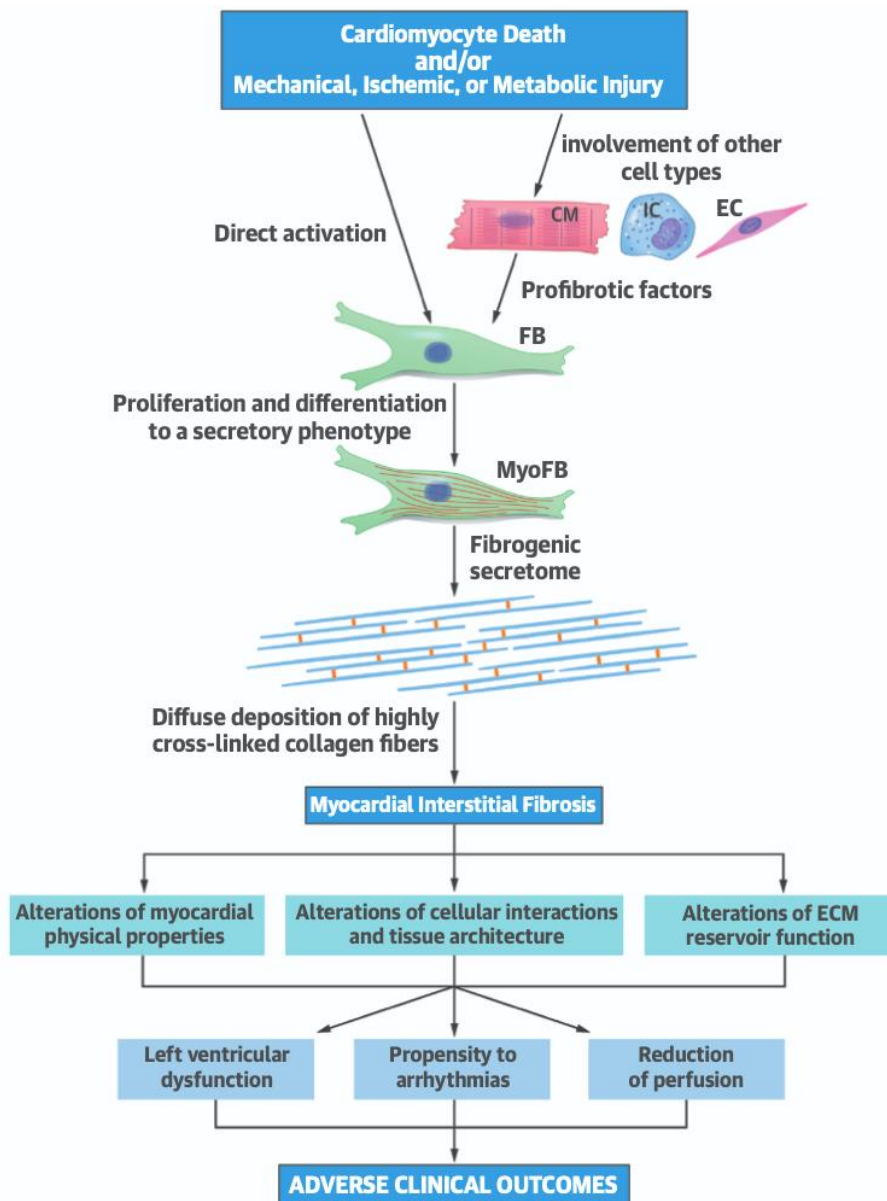


Figure 20. Développement de la fibrose interstitielle et impact sur le cœur<sup>122</sup>.

Le TGF- $\beta$  (Transforming growth factor beta) est une cytokine fibrogénique qui participe au développement de la fibrose cardiaque<sup>121</sup>. En effet, l'angiotensine II, les tensions pariétales et l'endothéline I augmentent l'expression du TGF- $\beta$ . Via la voie des SMAD (SMA ("small" worm phenotype) & MAD ("Mothers Against Decapentaplegic")), le TGF- $\beta$  transforme les fibroblastes en myofibroblastes, augmente la synthèse de MEC et diminue la dégradation, de cette dernière en augmentant la synthèse des TIMPs (*Tissue inhibitors of metalloproteinases*) et en inhibant celle des MMPs (Métalloprotéinase matricielle)<sup>108,121</sup> (Figure 21).

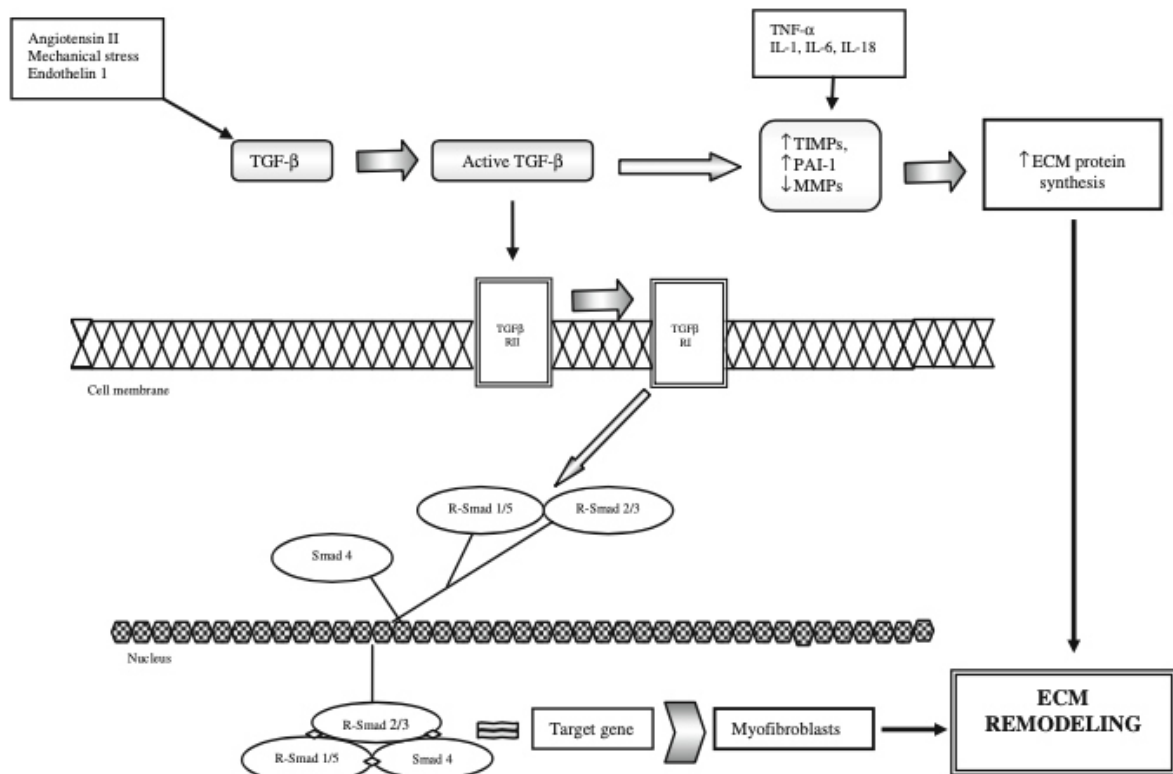


Figure 21. Remodelage de la matrice extracellulaire.

PAI-1 : plasminogen activator inhibitor<sup>121</sup>.

Comme nous le verrons dans la partie suivante, la mort cellulaire aggrave la cardiopathie ischémique. La nécrose stimule le système immunitaire et les cytokines pro-inflammatoires (TNF-α, IL-1 (Interleukine), IL-6, and IL-18) et ces cytokines, conjointement avec le TGF-β, participent aux modifications de la MEC.

Le TNF-α, lorsqu'il est surexprimé dans un modèle de souris transgénique, favorise la dilatation du ventricule en augmentant l'activité des MMPs mais à plus long terme, augmente la quantité de fibrose interstitielle<sup>123</sup>.

### 3.3.4. Apoptose - nécrose

Lors de la nécrose, l'intégrité des membranes de la cellule et des organites est compromise. Le contenu de la cellule exposée au milieu extracellulaire déclenche une réponse inflammatoire qui participe, entre autres, au phénomène de fibrose décrit précédemment<sup>124,125</sup>.

Lors de l'apoptose, les brins d'ADN se fragmentent, la cellule se rétrécit et se fragmente en plusieurs corps apoptotiques, pris en charge par les macrophages sans déclencher de réponse inflammatoire, contrairement à la nécrose<sup>124</sup>.

Effectivement, à la différence de la nécrose, l'apoptose active des caspases en cascade. Celles-ci existent sous leurs formes inactives, ou pro-caspases, et sont ensuite clivées pour être activées. L'activation des caspases conduit à la destruction des protéines et *in fine* à la destruction de la cellule, sans exposer le contenu de la cellule à l'extérieur (Figure 22).

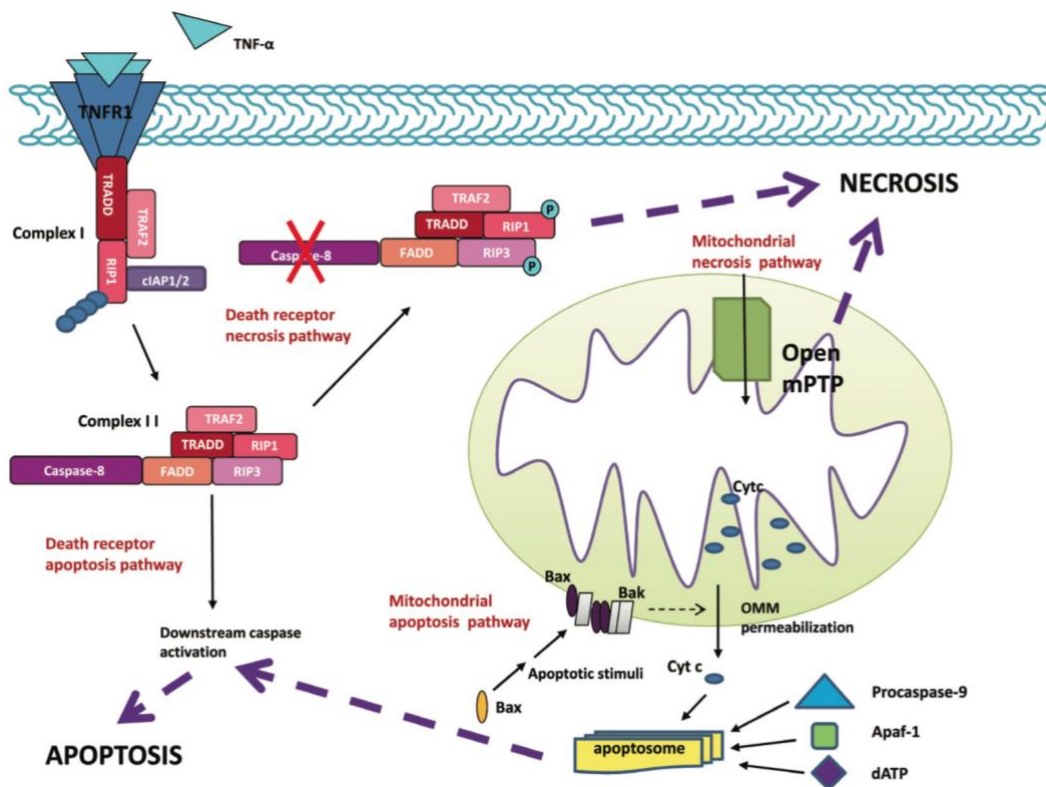


Figure 22. Mécanismes de mort cellulaire conduisant l'apoptose ou la nécrose<sup>124</sup>.

Si au cours de l'épisode d'ischémie reperfusion, lors de l'infarctus aigu du myocarde, la mort cellulaire est importante, la zone à risque n'est pas la seule concernée. Au cours de la cardiopathie ischémique les cardiomyocytes, à distance de l'infarctus, entrent également en apoptose ou nécrose<sup>126</sup>.

Il existe des voies de signalisation extrinsèque et intrinsèque menant à l'apoptose ou la nécrose. Dans le cas de la signalisation extrinsèque, la fixation de ligand (TNF- $\alpha$ , Fas) sur des récepteurs de mort (« *death receptors* ») initie la mort cellulaire. En ce qui concerne la voie intrinsèque, c'est le réticulum endoplasmique et la mitochondrie qui sont à l'origine de la mort cellulaire<sup>124</sup>. Un ligand peut stimuler la signalisation intrinsèque et conduire à la mort cellulaire.

L'inhibition des caspases pourraient limiter l'apoptose mais par conséquent la mort cellulaire. Vercaemmen *et al.*, montre que des cellules L929 stimulées par le TNF- $\alpha$  ont une sensibilité accrue pour la nécrose lors de l'inhibition des caspases<sup>127</sup>.

L'augmentation de l'activité sympathique en post infarctus du myocarde amène à des dérégulations de l'homéostasie calcique (cf. partie 4.1 page 40) qui peuvent aller jusqu'à une surcharge calcique de la cellule et de ses mitochondries<sup>128</sup>. Cette surcharge calcique ou encore la présence d'un stress oxydant ouvre le PTPm et conduisent à la nécrose ou à l'apoptose du cardiomyocyte<sup>129</sup>.

Le cœur humain était considéré jusqu'à peu comme un organe post-mitotique, les cardiomyocytes sont des cellules différenciées et n'ont pas la possibilité de se différencier pour se multiplier et se redifférencier afin d'augmenter le nombre de cardiomyocytes. Ces dernières années, plusieurs équipes ont montré que le cœur avait une forte capacité de régénération<sup>130</sup>. Seulement les techniques utilisées comportaient de nombreux biais. Une étude utilisant la datation au carbone 14 et les accidents nucléaires a montré que le cœur avait bien une capacité de régénération mais elle reste faible : environ 1% des cardiomyocytes sont remplacés chaque année pendant les 20 premières années de vie, ce pourcentage diminue à 0,5 après la vingtaine<sup>131</sup>. C'est moins de 40% des cardiomyocytes qui sont remplacés au cours de la vie d'un être humain<sup>130</sup>.

Que ce soit par l'apoptose ou la nécrose, la mort cellulaire est importante dans la zone non infarctée du myocarde après un infarctus et ce même plusieurs mois après l'accident ischémique<sup>126</sup>. La perte des cardiomyocytes impacte directement et de manière irréversible la contractilité du myocarde et participe à la progression de la cardiopathie ischémique.

### 3.4. De la cardiopathie ischémique à l'insuffisance cardiaque

Comme nous l'avons détaillé tout au long de la partie 3.3 : le remodelage cardiaque, la dilatation, l'hypertrophie, la fibrose et les stimulations neuro-hormonales sont des mécanismes présents après un infarctus du myocarde. Bien qu'ils soient adaptatifs à court terme, ils favorisent la mort cellulaire et le développement de l'insuffisance cardiaque à long terme.

De plus, ces mécanismes sont interconnectés, ils s'auto-entretiennent et participent à la progression de la cardiopathie ischémique vers l'insuffisance cardiaque (Figure 23).

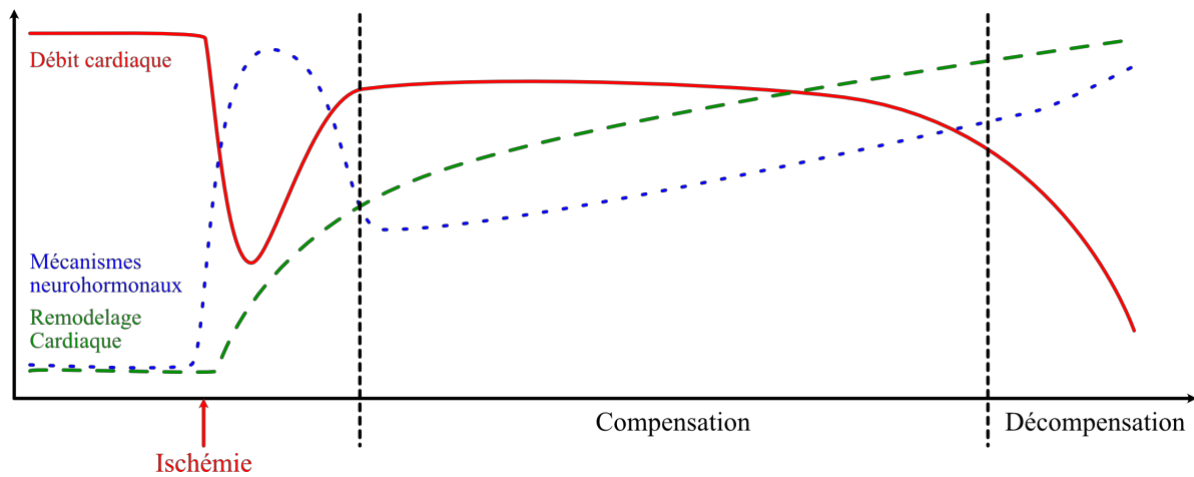


Figure 23. Schéma de synthèse de la compensation à la décompensation cardiaque : impact des mécanismes neuro-hormonaux et du remodelage ventriculaire sur le débit cardiaque.

Le développement de l'insuffisance cardiaque n'est pas systématique, mais reste néanmoins fréquent, 25% des patients développent une insuffisance cardiaque 1 an après leur infarctus du myocarde, 75% 5 ans après<sup>132</sup>.

### **3.4.1. Définition de l'insuffisance cardiaque**

Le groupe de travail ACC/AHA (American College of Cardiology/American Heart Association) a défini l'insuffisance cardiaque comme un syndrome clinique complexe, qui peut résulter de tout problème cardiaque structurel ou fonctionnel et qui entrave la capacité du ventricule à se remplir de sang ou à l'éjecter<sup>133</sup>.

L'insuffisance cardiaque se manifeste par la dyspnée et la fatigue, qui peuvent limiter la tolérance à l'effort, provoquer de la rétention d'eau, entraîner une congestion pulmonaire et un œdème périphérique. Certains patients présentent une intolérance à l'exercice mais peu de signes de rétention d'eau, tandis que d'autres se plaignent principalement d'œdème et signalent peu de symptômes de dyspnée ou de fatigue. La NYHA a classifié l'insuffisance cardiaque en fonction du degré de limitation fonctionnelle. Les patients sont symptomatiques : lors d'efforts exceptionnels (Classe I), lors d'efforts importants (Classe II), lors d'efforts modérés (Classe III), au repos (Classe IV)<sup>133</sup>.

L'insuffisance cardiaque peut faire suite à une cardiopathie ischémique. L'aggravation de la cardiopathie ischémique engendre l'apparition progressive de symptômes, que l'on nomme insuffisance cardiaque chronique. Celle-ci est différente de l'insuffisance cardiaque aiguë, où les symptômes d'insuffisance cardiaque apparaissent brutalement, par exemple lors d'un infarctus aigu du myocarde ou d'une insuffisance cardiaque chronique décompensée.

### **3.4.2. HFrEF - HFpEF**

Parmi les patients qui souffrent d'insuffisance cardiaque, la fraction d'éjection du ventricule gauche permet de séparer les patients insuffisants cardiaques à fraction d'éjection réduite (HFrEF : *heart failure with reduced ejection fraction*,  $EF \leq 40\%$ ) des patients à fraction d'éjection préservée (HFpEF : *heart failure with preserved ejection fraction*,  $EF \geq 50\%$ ). Les patients se trouvant entre 41 et 49 % de fraction d'éjection sont considérés comme étant HFmrEF (*heart failure with-mid range ejection fraction*).

Dans le cas de l'HFpEF, l'insuffisance cardiaque est causée par une dysfonction diastolique diminuant le débit cardiaque, malgré une fonction systolique correcte<sup>134,135</sup>. Comme expliqué précédemment, la fonction d'éjection du ventricule gauche n'est pas toujours liée au débit cardiaque. Si le remplissage du ventricule n'est pas efficace, peu importe la fonction systolique le débit cardiaque sera diminué.

L'HFpEF représente selon les études environ la moitié des insuffisants cardiaques, c'est une pathologie complexe et multimorbide (hypertension, obésité, diabète, coronaropathie)<sup>136</sup>. D'ailleurs, les TRS augmentent la rigidité artérielle dans le cas de l'HFpEF et pourrait contribuer à la progression de la pathologie<sup>137</sup>.

Dans un contexte de cardiopathie ischémique, l'infarctus du myocarde induit une grosse perte de fonction cardiaque et donc une dysfonction systolique, ce qui correspond à un modèle d'HFrEF. Dans une HFrEF, la dysfonction systolique est présente et est souvent associée à une dysfonction diastolique causée par l'hypertrophie et ou la fibrose interstitielle.

### 3.4.3. Le traitement de l'insuffisance cardiaque chronique post-infarctus du myocarde

Comme décrit précédemment, après un infarctus du myocarde la stratégie initiale est de rapidement reperfusionner la zone ischémisée, afin de limiter au maximum l'ampleur des lésions, c'est la première procédure de prise en charge post-infarctus<sup>98</sup> (Figure 24).

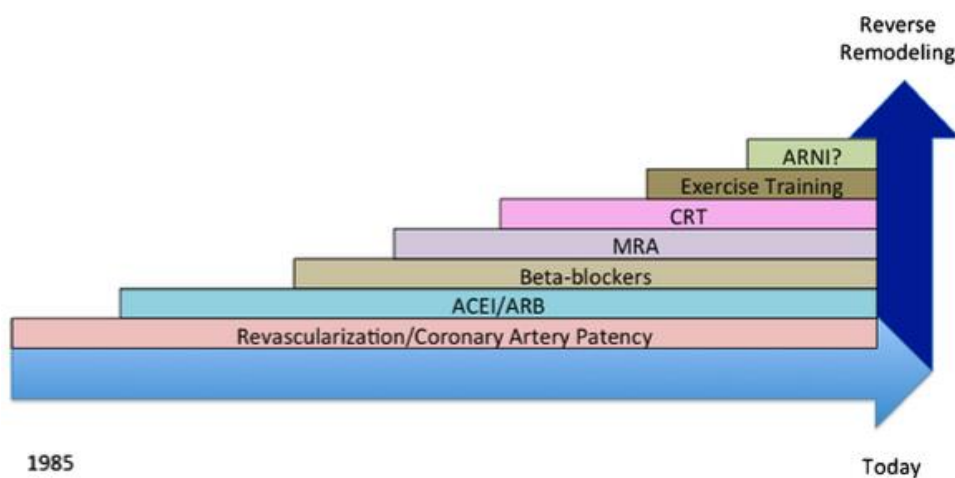


Figure 24. Évolution des traitements de l'insuffisance cardiaque<sup>98</sup>.

ACEI: angiotensin-converting enzyme inhibitor; ARB: angiotensin receptor blocker; ARNI: angiotensin receptor-neprilysin inhibitor; CRT cardiac resynchronization therapy; MRA mineralocorticoid receptor antagonists.

Une fois l'accident coronarien passé, le but des traitements actuels de l'insuffisance cardiaque est de diminuer les facteurs de risques afin d'éviter la récurrence d'un infarctus du myocarde. Ensuite, les traitements instaurés ont pour objectif de limiter la charge du cœur et le remodelage, en diminuant notamment l'action des mécanismes compensateurs neuro-hormonaux, délétères sur le long terme. L'objectif final étant d'augmenter la survie, la qualité de vie, la capacité à faire de l'exercice et de diminuer les symptômes de l'insuffisance cardiaque.

Le traitement de l'insuffisance cardiaque post infarctus du myocarde repose sur le concept B.A.S.I.C :

- B pour  $\beta$ -bloquants. De nombreuses études ont montré que l'utilisation de  $\beta$ -bloquants améliore la survie des patients insuffisants cardiaques chroniques stables<sup>138</sup>. Cela peut paraître contre intuitif de diminuer l'activité sympathique qui stimule la fonction cardiaque chez un patient insuffisant cardiaque. En 1965, les  $\beta$ -bloquants étaient d'ailleurs contraindiqués dans l'insuffisance cardiaque parce qu'ils augmentaient la mortalité dans le cas d'insuffisance cardiaque aiguë et ce n'est qu'en 1999 avec l'étude CIBIS que leurs utilisation en chronique a révélé leurs effets bénéfiques<sup>139</sup>. En effet, l'utilisation des  $\beta$ -bloquants lors d'un épisode de décompensation ou dans les heures qui suivent l'infarctus du myocarde augmentent le risque de choc cardiogénique et de décès<sup>140</sup>, mais en chronique ils permettent de limiter le remodelage pathologique décrit précédemment. Le développement et l'utilisation de marqueurs biologiques est essentiel pour caractériser les patients souffrant de cardiopathie ischémique afin de déterminer si il faut initier ou arrêter un traitement à base de  $\beta$ -bloquants<sup>119</sup>.
- A pour antiagrégants plaquettaires. Les antiagrégants plaquettaires permettent de fluidifier le sang et de prévenir l'apparition de caillots sanguins et donc de prévenir d'une récurrence d'un infarctus du myocarde.
- S pour Statine. Les statines sont des hypolipémiants, ils baissent la cholestérolémie et diminuent le risque d'athérosclérose, de rétrécissement artériel et de thrombose, diminuant également la récurrence d'un infarctus du myocarde.
- I pour inhibiteur de l'enzyme de conversion. Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion ou du récepteur à l'angiotensine sont des antihypertenseurs, ils permettent de diminuer la post-charge, de diminuer les tensions pariétales et de ce fait le remodelage pathologique. De plus, l'angiotensine II joue un rôle direct dans le développement du remodelage pathologique (cf. Hypertrophie pathologique Figure 19 et Fibrose Figure 21), son inhibition permet de limiter la progression de la cardiopathie. D'ailleurs, l'utilisation de ces inhibiteurs dans le cadre de la cardiopathie ischémique diminue le nombre d'évènements cardiovasculaires et la mortalité<sup>141</sup>.



- C pour contrôle des facteurs de risque. Au même titre que les antiagrégants plaquettaires et les statines, il est important que les patients soient sensibilisés aux facteurs de risque (tabagisme, l'obésité, manque d'exercice physique) afin de limiter la récurrence d'un infarctus du myocarde.

Hors protocole BASIC, d'autres traitements pharmacologiques sont parfois utilisés dans le contexte de l'insuffisance cardiaque chronique. Notamment, les antagonistes des récepteurs aux minéralocorticoïdes (antiminéralocorticoïdes ou antagoniste de l'aldostérone) qui sont des diurétiques, la diminution de la volémie diminue la charge du cœur (pré-charge, post-charge). Associés à une thérapie optimale les antagonistes de l'aldostérone diminuent la mortalité post-infarctus du myocarde<sup>142</sup>.

L'étude rétrospective et observationnelle très récente de Wirtz *et al.*, sur 17 106 patients insuffisants cardiaques a mis en évidence qu'un traitement optimisé post-infarctus du myocarde (double, triple thérapie ;  $\beta$ -bloquants, inhibiteur de l'enzyme de conversion ou du récepteur à l'angiotensine, antagoniste minéralocorticoïde pour la triple thérapie), réduit la mortalité et le nombre de réadmission à l'hôpital. Pourtant, l'utilisation de ce type de thérapie reste faible<sup>143</sup> malgré les recommandations de l'*American College of Cardiology Foundation* et de l'*American Heart Association*<sup>144</sup>.

Les traitements actuels permettent de limiter le remodelage, la progression de la cardiopathie et la mortalité de l'insuffisance cardiaque. Cependant, inverser le remodelage est aujourd'hui difficile et la mortalité de l'insuffisance cardiaque à 5 ans reste très élevée<sup>82</sup>. De plus, les patients insuffisants cardiaque souffrent souvent de comorbidités associées, tels que les TRS qui pourraient participer à la progression de la pathologie. C'est pourquoi il est nécessaire de bien diagnostiquer les TRS chez ces patients et de continuer d'optimiser les traitements et la prise en charge.

## 4. MECANISMES PHYSIOPATHOLOGIQUES DE LA CARDIOPATHIE ISCHEMIQUE ET IMPACT DE L'HYPOXIE INTERMITTENTE

Après avoir décrit la physiopathologie de la cardiopathie ischémique, de l'infarctus du myocarde à l'insuffisance cardiaque, je vais maintenant aborder un certain nombre de mécanismes, bien décrits pour être impliqués dans le cadre de la cardiopathie ischémique, mais également décrits comme induits par l'hypoxie intermittente. En effet, par effet additif ou synergique, ces mécanismes pourraient participer à l'aggravation de la cardiopathie ischémique chez des patients présentant des TRS.

### 4.1. L'homéostasie calcique

Le calcium est un élément indispensable à la contraction des cellules musculaires, il joue également un rôle dans pléthore de signalisations, comme l'activation de la transcription de gènes ou encore l'initiation de la mort cellulaire.

#### 4.1.1. Couplage excitation contraction

Au niveau de l'oreillette droite du cœur, le nœud sinusal est doué d'automatisme, les cellules pacemaker se dépolarisent spontanément générant des potentiels d'actions (PA). Les PA sont transmis de proche en proche, ils activent la contraction des oreillettes, puis ils atteignent le nœud auriculo-ventriculaire et sont conduits par le tronc du faisceau de His, les branches du faisceau de His, les fibres de Purkinje pour *in fine* être transmis aux cardiomyocytes ventriculaires et les dépolariser (Figure 25).

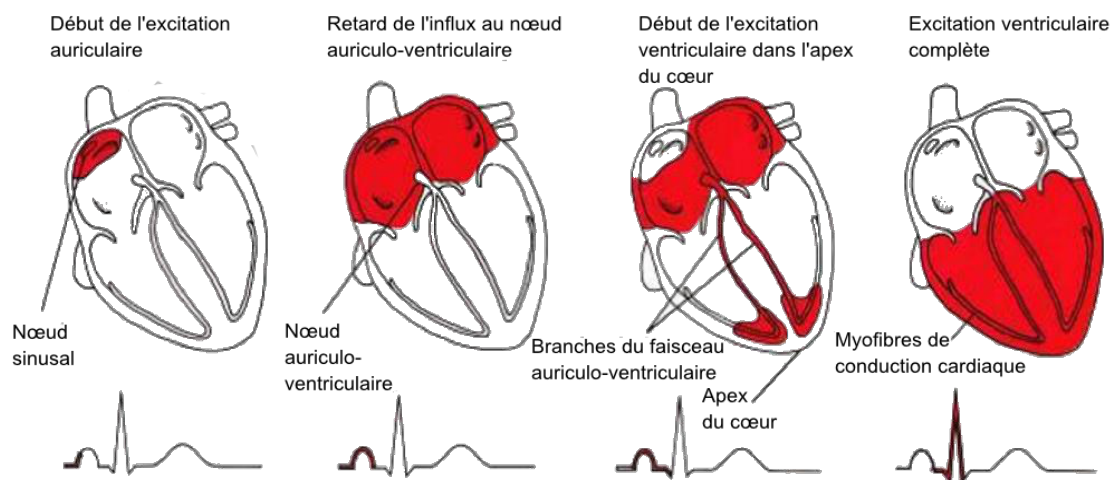


Figure 25. Conduction et phase de contraction du cœur.

(Source : <http://univ.ency-education.com>)

La dépolarisation des cardiomyocytes entraîne une contraction, c'est le couplage excitation contraction (CEC). En effet, le potentiel d'action dépolarise la cellule, le potentiel de membrane du cardiomyocyte passe de  $-80\text{mV}$  à  $+20\text{mV}$ <sup>145</sup>. Les canaux calciques voltages-dépendants, sensibles à la dépolarisation, appelés *L-Type  $\text{Ca}^{2+}$  channel* (LTCC) s'ouvrent et laissent entrer les ions  $\text{Ca}^{2+}$  dans le sarcoplasme (cytoplasme des cardiomyocytes).

Le cardiomyocyte a une structure et une organisation particulière, sa membrane plasmique (sarcolemme) s'invagine dans la cellule pour former des tubules transverses (tubules-T). Les tubules-T permettent d'augmenter la surface de contact avec le réticulum sarcoplasmique (RS). Les tubules-T sont en contact avec une citerne du RS formant une diade, contrairement à la cellule musculaire striée qui est en contact avec deux citernes et forme une triade.

Cette configuration spatiale permet au calcium entrant via les LTCC, d'activer l'ouverture des récepteurs à la ryanodine (RyR2) présents à la surface du RS. A leur tour, les RyR2 relarguent du calcium du RS vers le sarcoplasme. Ce phénomène est appelé *calcium-induced calcium release* (CICR).

Le calcium sarcoplasmique se fixe sur la troponine-C des myofilaments, permettant l'interaction entre les filaments d'actine et de myosine entraînant le raccourcissement des sarcomères : la contraction du cardiomyocyte (Figure 26). La relaxation est permise par une diminution de la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  sarcoplasmique, dissociant le  $\text{Ca}^{2+}$  de la troponine-C.

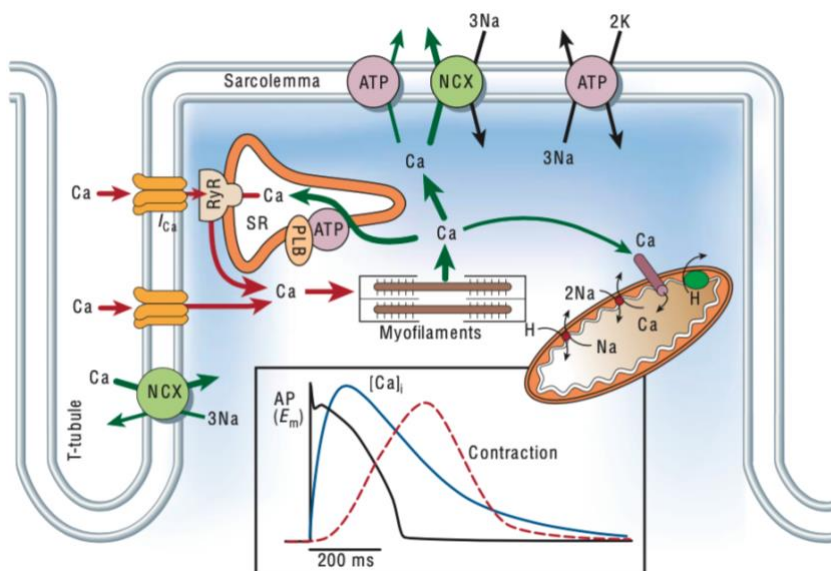


Figure 26. Couplage excitation contraction<sup>146</sup>.

Dans l'encadré de la figure nous observons un potentiel d'action en noir (AP), un transitoire calcique en bleu (augmentation transitoire de la concentration de calcium dans le sarcoplasme), et la contraction du cardiomyocyte en rouge.

Les ions  $\text{Ca}^{2+}$  sont recapturés dans le RS via la pompe sarco/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA2a). L'activité de SERCA2a est modulée par le phospholamban (PLN).

En effet, la forme déphosphorylée du PLN se fixe à SERCA2a et inhibe la recapture du  $\text{Ca}^{2+}$ , alors que les 2 formes phosphorylées (Ser-16 et Thr-17) ne se fixent pas à SERCA2a.

Les ions  $\text{Ca}^{2+}$  sont aussi expulsés de la cellule par l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX-1) et par le *plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase* (PCMA) ou encore ils sont recaptés par la mitochondrie via l'uniport mitochondrial. Au cours du couplage excitation contraction, la concentration en calcium du sarcoplasme est multipliée par 10 elle passe de 100nM à environ  $1\mu\text{M}$ <sup>147</sup>.

#### ***4.1.2. Cardiopathie ischémique et homéostasie calcique***

Dans des conditions d'insuffisance cardiaque, l'homéostasie calcique est perturbée. Une modification d'expression et/ou d'activité des différents acteurs de l'homéostasie calcique conduisent à une fuite de  $\text{Ca}^{2+}$  du RS vers le sarcoplasme et à une moindre recapture de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le RS. Cette moindre récupération et les fuites du RS entraînent une élévation du  $\text{Ca}^{2+}$  diastolique et une déplétion en  $\text{Ca}^{2+}$  du RS. Les stocks de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le RS disponible pour la prochaine contraction sont alors réduits induisant une diminution de la contractilité<sup>148,149</sup>.

En effet, l'expression de SERCA2a et/ou son activité (inhibition par le PLN) est diminuée à l'insuffisance cardiaque. SERCA2a étant responsable de la recapture de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le RS, une diminution de la recapture conduit à une augmentation de la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  diastolique, une déplétion des stocks de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le RS et une dysfonction systolique (moins de  $\text{Ca}^{2+}$  disponible dans le RS pour la prochaine contraction)<sup>150,151</sup>.

Dans ce contexte pathologique, des fuites de calcium sont également observées au niveau de RyR2, la répartition du  $\text{Ca}^{2+}$  de part et d'autre du RS ou encore la phosphorylation du récepteur peuvent expliquer ces fuites. Ces fuites participent également à la dysfonction diastolique, la déplétion du RS en  $\text{Ca}^{2+}$  et à la dysfonction systolique<sup>152</sup>.

L'expression de NCX-1 est augmentée dans l'insuffisance cardiaque<sup>153</sup>. NCX-1 en expulsant le  $\text{Ca}^{2+}$  du sarcoplasme présent en quantité plus importante dans ce contexte pathologique, fait rentrer des ions sodium qui peuvent favoriser la création d'un potentiel d'action et déclencher des arythmies. NCX-1 est un échangeur pouvant fonctionner dans les 2 sens<sup>154</sup>, il peut faire sortir 3 ions sodium et faire rentrer un ion  $\text{Ca}^{2+}$ . De la même manière que pour les LTCC, l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  par NCX-1 peut déclencher une ouverture des RyRs, augmentant ainsi le risque d'arythmie (Figure 27).

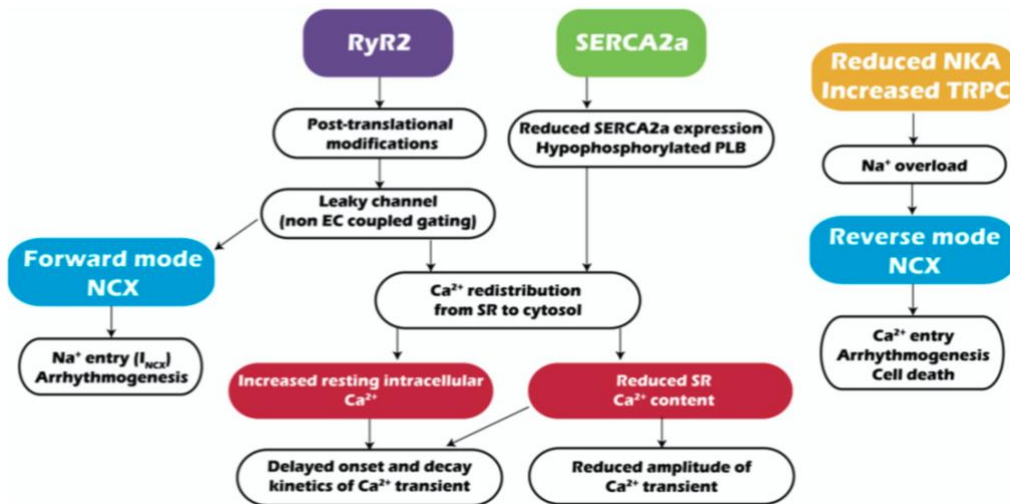


Figure 27. Dérégulation de l'homéostasie calcique dans le cadre de l'insuffisance cardiaque<sup>155</sup>.

Le calcium est également impliqué dans la transcription, c'est le couplage excitation transcription (CET). Comme décrit précédemment, dans le contexte de l'insuffisance cardiaque, le calcium joue un rôle important dans l'activation de plusieurs voies de signalisation qui participent au remodelage pathologique du myocarde. En effet, l'élévation du calcium sarcoplasmique que nous venons de décrire, active la calcineurine et induit un changement de conformation de la calmoduline qui se dissocie de la CaMKII. Les CaMKII une fois dissociées de la calmoduline s'autophosphorylent entre elles et avec la calcineurine activent les facteurs de transcriptions, NFAT, MEF2, GATA<sup>156</sup>, induisant de l'hypertrophie pathologique et l'insuffisance cardiaque (Figure 28). L'augmentation importante du calcium diastolique favorise également la nécrose<sup>128</sup> et l'activation des calpains qui initient l'apoptose<sup>157</sup>.

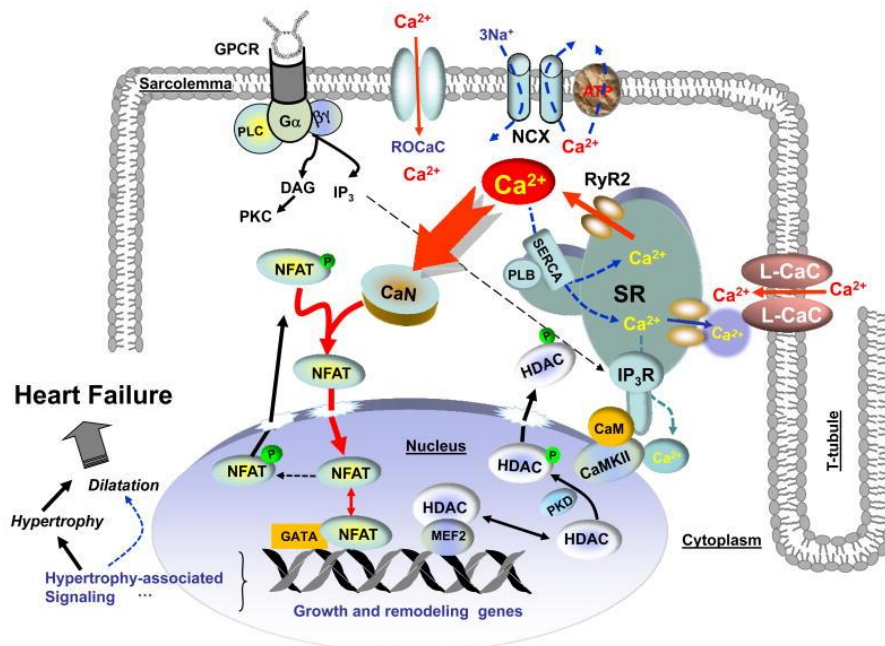


Figure 28. Couplage excitation transcription et développement de l'hypertrophie pathologique<sup>158</sup>.

Les mécanismes moléculaires de l'homéostasie calcique dans le cardiomyocyte sont finement régulés mais dépendent également de l'organisation structurale de la cellule. En effet, la présence des tubules-T et la localisation des différents acteurs est primordiale. L'invagination du sarcoplasme en rapprochant les LTCC et les RyRs à seulement 12 nm de distance permet la formation d'une unité fonctionnelle : la diade<sup>159</sup>, facilitant le CEC mais limitant aussi le risque d'arythmie. En effet, une fois ouverts les RyRs ont une période d'inactivation, pendant laquelle les canaux ne peuvent pas s'ouvrir de nouveau, et donc réinitier une contraction indépendante d'un potentiel d'action. Seulement, si tous les RyRs ne sont pas stimulés de manière synchrone, le Ca<sup>2+</sup> sortant d'un groupe de RyRs peut venir en stimuler un autre (RyRs « *orphelins* ») et alors altérer la contraction ou déclencher des arythmies. Dans l'insuffisance cardiaque, les tubules-T sont déstructurés ce qui augmente le nombre de RyRs orphelins et participe à la diminution de contractilité cardiaque et à l'apparition d'arythmies<sup>155</sup> (Figure 29).

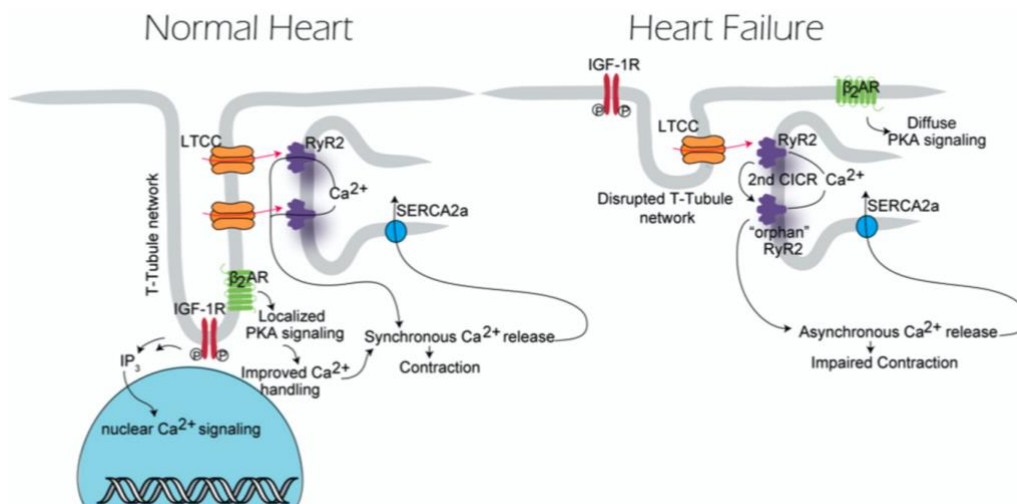


Figure 29. Désorganisation des tubules-T dans un contexte d'insuffisance cardiaque<sup>155</sup>.

Le CEC est extrêmement complexe et dynamique, il met en jeu de nombreux acteurs imbriqués dans une configuration spatiotemporelle particulière. Il est difficile en étudiant la dérégulation d'un des acteurs d'extrapoler les répercussions que cela aurait sur l'homéostasie calcique. Cependant l'étude des transitoires calciques permet d'avoir une vue d'ensemble de la fonctionnalité d'un cardiomyocyte isolé (Figure 30).

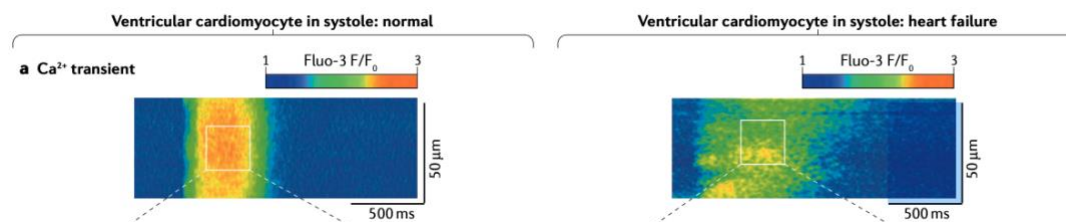


Figure 30. Transitoire calcique et homéostasie calcique<sup>160</sup>.

Sur cette figure nous observons facilement la plus faible amplitude et l'étalement du transitoire calcique en condition d'insuffisance cardiaque.

### ***4.1.3. Hypoxie intermittente et homéostasie calcique***

Très peu d'études se sont intéressées à l'impact de l'hypoxie intermittente sur l'homéostasie calcique et, à ma connaissance, aucune dans un contexte de cardiopathie ischémique. Hors contexte de cardiopathie ischémique, Chen L *et al.*, ont montré chez la souris, que 8 semaines d'hypoxie intermittente augmente l'expression de NCX-1, diminue la fraction d'éjection, induit une hypertrophie ventriculaire et augmente l'apoptose. La délétion de NCX-1 abolie les altérations cardiaques induites par l'hypoxie intermittente<sup>161</sup>. Dans une autre étude, les mêmes auteurs ne montrent pas de différence sur le raccourcissement des sarcomères de cardiomyocytes isolés de rats exposés 6 semaines à l'hypoxie intermittente<sup>162</sup>.

D'autres ont montré que 4 semaines d'hypoxie intermittente chez le rat induisent un stress oxydatif important, associé à une diminution de l'expression et de l'activité de SERCA2a et de NCX-1<sup>163</sup>.

Au laboratoire nous avons montré que 2 semaines d'hypoxie intermittente augmente la charge calcique du RS, modifie les échanges calciques entre les organites et induit un stress du réticulum endoplasmique pro-apoptotique<sup>68</sup>.

Un article très récent confirme la diminution d'expression et d'activité de SERCA2a, montre une augmentation de l'expression de NCX-1, associé à une augmentation du remodelage et une diminution de fonction cardiaque chez le rat exposé 4 semaines à l'hypoxie intermittente<sup>164</sup>.

Même si les résultats de la littérature sont peu nombreux, l'hypoxie intermittente semble déréguler des acteurs clés de l'homéostasie calcique et pourrait participer à la progression de la cardiopathie ischémique.

## 4.2. Système nerveux autonome – dérégulation de la balance sympatho-vagale

Le système nerveux sympathique (ou orthosympathique) fait partie du système nerveux autonome (SNA) avec le système nerveux parasympathique. Le système nerveux autonome gère toutes les actions non volontaires et permet de conserver l'homéostasie sans intervention de la conscience. Il régule de nombreux processus physiologiques, comme le rythme respiratoire, le rythme cardiaque, la pression artérielle, la filtration rénale, la digestion, la température corporelle etc.

Il se compose de voies afférentes afin de récupérer de l'information (ex. hypertension périphérique), intégrée dans le système nerveux central au niveau du tractus solitaire, et de voies efférentes effectrices (ex. vasodilatation artérielle).

La voie efférente est composée du système nerveux sympathique et parasympathique, elle est divisée en 2 neurones. Le premier (neurone pré-ganglionnaire) a son corps cellulaire dans le système nerveux central (SNC), son axone vient former une synapse au contact du corps cellulaire du deuxième neurone dans un ganglion (neurone ganglionnaire). L'axone du neurone ganglionnaire vient former une synapse avec son organe cible.

Du corps cellulaire aux synapses le message est véhiculé par une dépolarisation. Dans la synapse, la dépolarisation est convertie en stimulus biochimique, via la sécrétion de vésicules dans la fente synaptique (Figure 31).

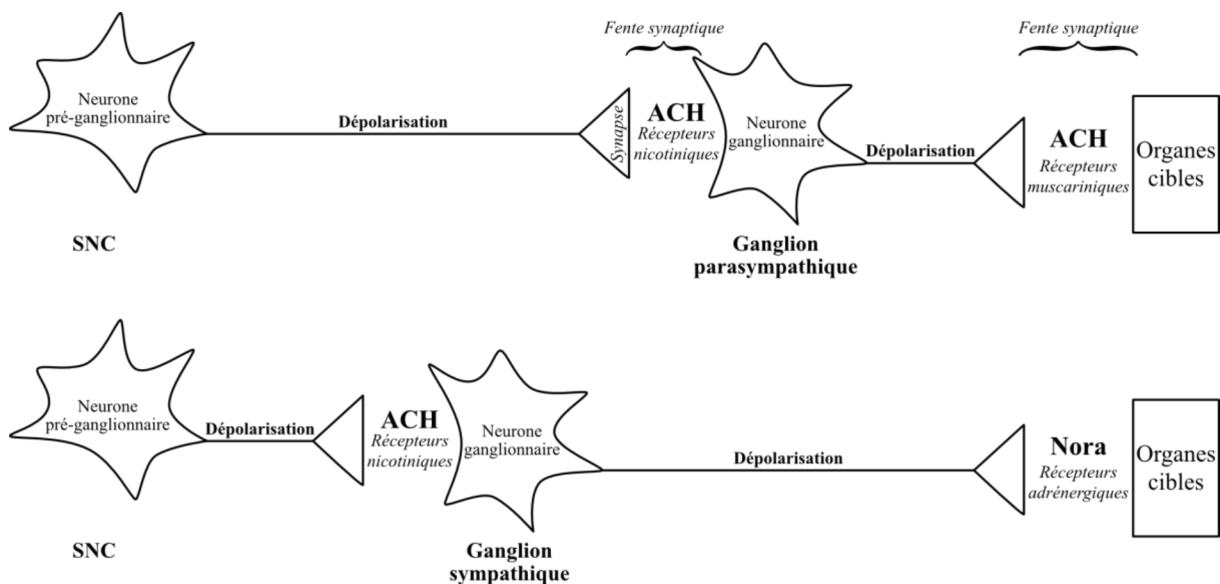


Figure 31. Organisation de la voie efférente du système nerveux autonome. ACH : acétylcholine ; Nora : noradrénaline ; SNC : système nerveux central.

La synapse de l'axone présynaptique sécrète de l'acétylcholine qui stimule le corps neurone ganglionnaire en se fixant sur des récepteurs nicotiniques. Au niveau de la synapse du



neurone ganglionnaire, le contenu des vésicules sécrétées dépend du système nerveux parasympathique ou sympathique<sup>165</sup>.

#### 4.2.1. Système nerveux parasympathique

Dans le cas du système parasympathique, c'est l'acétylcholine qui est sécrétée dans la fente synaptique du neurone ganglionnaire et qui stimule l'organe cible en se fixant sur les récepteurs muscariniques. Les neurones pré-ganglionnaire partent du tronc cérébral (nerf crâniens) et du sacrum (nerfs sacrés) pour aller dans les ganglions proches des organes effecteurs (Figure 32).

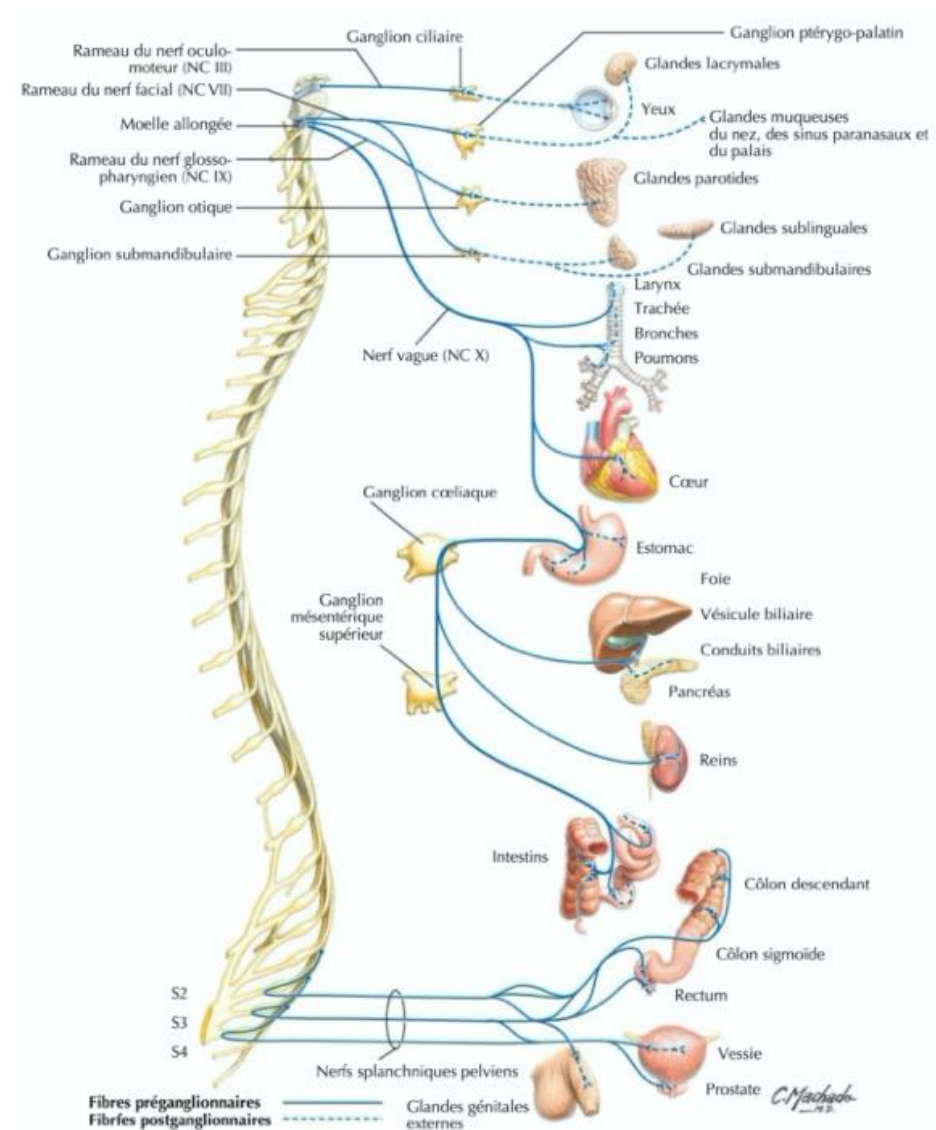


Figure 32. Planche anatomique du système nerveux autonome parasympathique<sup>166</sup>.

En ce qui concerne le système cardiovasculaire, c'est le nerf vague qui innerve le cœur (nerf crânien X droit et gauche), les vaisseaux sont très peu innervés par le système parasympathique. L'activation du système nerveux parasympathique cardiaque, via le nerf

vague, relargue de l'acétylcholine au niveau du myocarde activant les récepteurs muscariniques. Ceci se traduira par un effet inotrope négatif, lusitrope négatif, chronotrope négatif, dromotrope négatif, bathmotrope négatif<sup>165</sup>. Cependant, les fibres du système nerveux parasympathique sont moins présentes après le nœud sino atrial. L'innervation des ventricules est alors plus faible que celle des oreillettes, ainsi l'effet chronotrope négatif du système nerveux parasympathique est bien plus important que l'effet inotrope négatif<sup>167,168</sup>.

#### ***4.2.2. Système nerveux sympathique***

En ce qui concerne le système nerveux sympathique, c'est la noradrénaline qui est sécrétée dans la fente synaptique du neurone ganglionnaire et qui stimule l'organe cible en se fixant sur les récepteurs adrénergiques, à l'exception des glandes sudoripares où le neurone ganglionnaire est cholinergique.

Pour la glande surrénale, il n'y a pas de neurone ganglionnaire, la glande fait elle-même office de « neurone ganglionnaire ». Les glandes surrénales sont stimulées via les neurones pré-ganglionnaires par l'acétylcholine et sécrètent de l'adrénaline dans la circulation systémique.

Contrairement au système nerveux parasympathique, les ganglions sympathiques sont proches du rachis et non des organes effecteurs (Figure 33). Ils forment 2 chaînes de part et d'autre du rachis (chaînes para-vertébrales).

En ce qui concerne le système cardiovasculaire, le cœur est innervé par les ganglions sympathique du ganglion cervical supérieur au 5<sup>e</sup> ganglion thoracique, qui sont innervés par des neurones post-ganglionnaires qui sortent des vertèbres thoraciques entre la T1 et la T5<sup>166</sup>.

L'activation du système nerveux sympathique au niveau cardiaque a un effet inotrope positif, lusitrope positif, chronotrope positif, dromotrope positif, bathmotrope positif. Au niveau des vaisseaux, l'augmentation du tonus sympathique conduit à une vasoconstriction des muscles lisses des vaisseaux périphériques. En ce qui concerne les glandes surrénales, l'activité sympathique libère à 80% de l'adrénaline et à 20% de la noradrénaline dans la circulation systémique<sup>165,169</sup>.

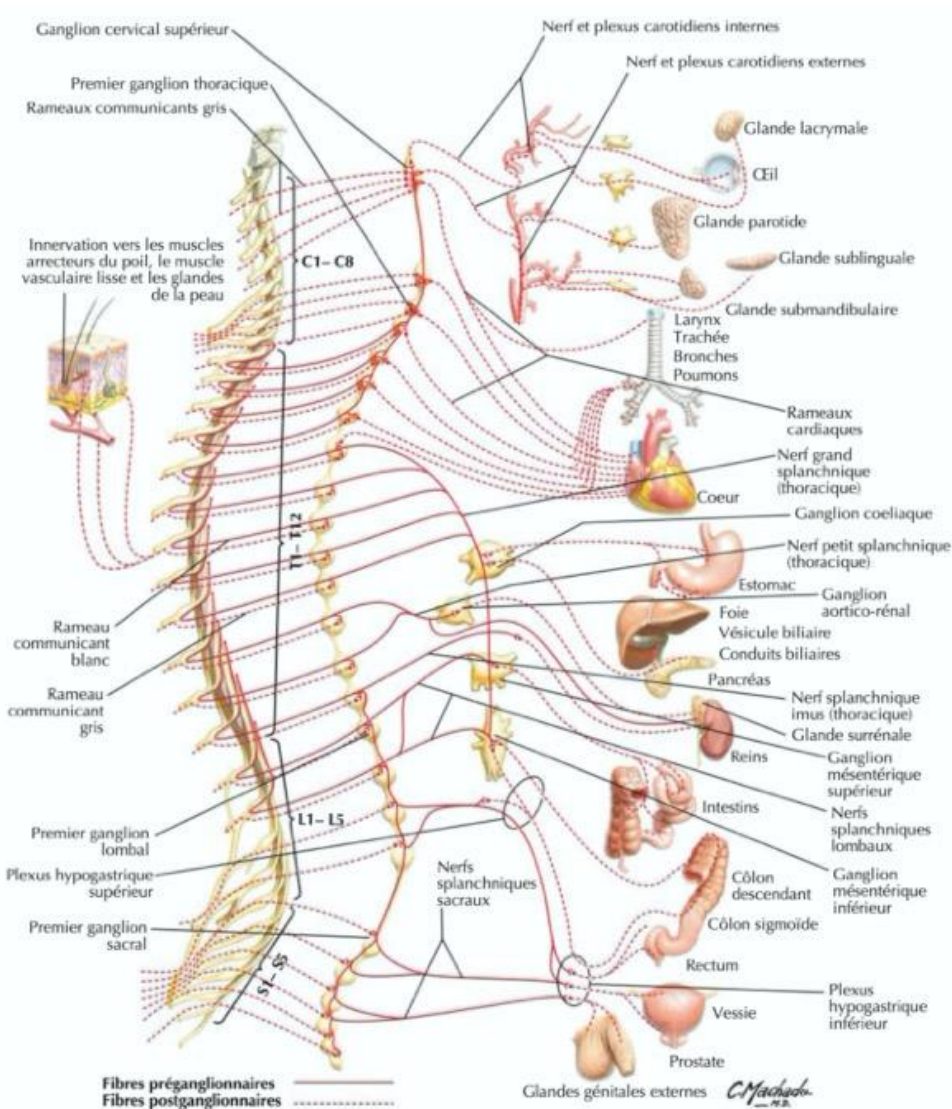


Figure 33. Planche anatomique du système nerveux autonome sympathique<sup>166</sup>.

Les systèmes nerveux sympathique et parasympathique ayant des rôles opposés sur la fonction cardiaque, la réponse fonctionnelle dépendra du tonus de chacun des acteurs, on parle de balance sympatho-vagale.

#### 4.2.3. Signalisation adrénérique

Au niveau de la synapse du neurone ganglionnaire, c'est sur les récepteurs adrénériques que se fixent les catécholamines, il en existe différents types : les récepteurs  $\alpha$ -adrénériques ( $\alpha_{1S}$ ,  $\alpha_{2S}$ ) et les  $\beta$ -adrénériques ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ )<sup>165</sup>. Ces récepteurs adrénériques sont des RCPGs et ont des réponses spécifiques en fonction de leur localisation et en fonction des petites protéines G avec lesquelles ils sont couplés ( $G_s$ ,  $G_i$ ,  $G_q$ ,  $G_{11}$ ...) (Figure 34).

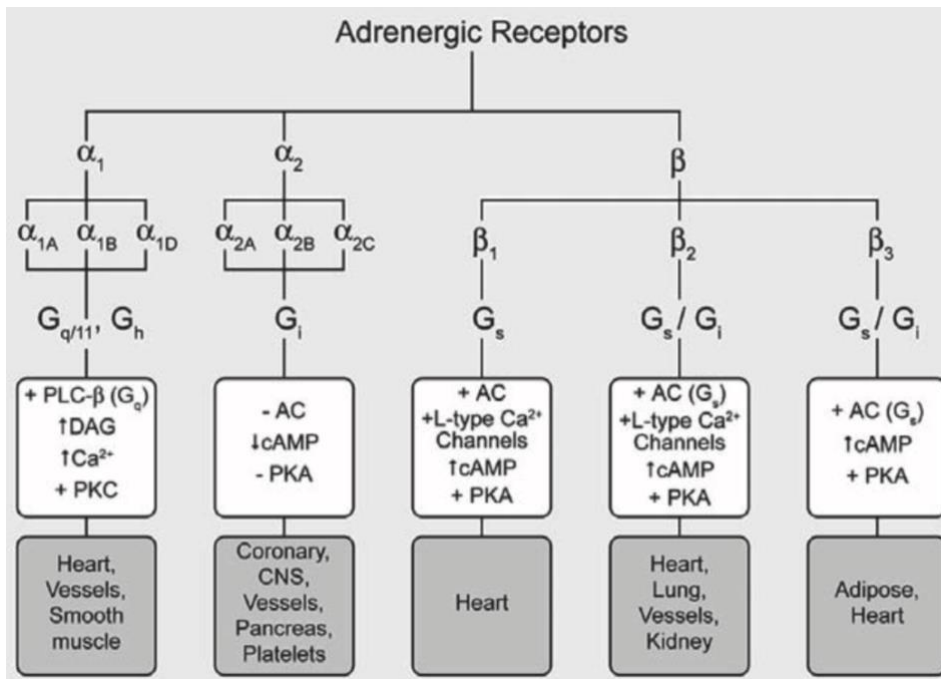


Figure 34. Les différents types de récepteurs adrénergiques<sup>170</sup>.

En situation physiologique, les récepteurs adrénergiques  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ , et  $\alpha_1$  sont exprimés dans le cœur. Les  $\beta_3$  sont peu exprimés en situation physiologique. En ce qui concerne l'expression des récepteurs  $\beta$ , 70% sont des  $\beta_1$ , 30% des  $\beta_2$ . Les récepteurs  $\alpha_{1A}$  et  $\alpha_{1B}$  comptent pour 20% des récepteurs adrénergiques cardiaques<sup>171</sup>.

Le tableau suivant récapitule les différents types de récepteurs adrénergiques cardiaques, leurs protéines G associées, leurs effecteurs et *in fine* leurs actions sur le myocarde (Tableau 1).

Récepteurs	$\beta_1$	$\beta_2$	$\beta_3$	$\alpha_1$
Protéines G	$G_s$	$G_s, G_i$	$G_i$	$G_q$
Effecteurs	- Stimulation de l'adénylate cyclase - Augmentation du $Ca^{2+}$ intracellulaire par phosphorylation des acteurs de l'homéostasie calcique	- Stimulation de l'adénylate cyclase	- Inhibition de l'adénylate cyclase - Synthèse de NO	- Activation de la phospholipase $C_\beta$
Effet	Cardiostimulation	Cardiostimulation	Cardioinhibition	Cardiostimulation

Tableau 1. Récapitulatif des différents récepteurs adrénergiques, des protéines G et de leurs effets cardiaques.

Adapté de Myslivecek<sup>172</sup>.

En condition physiologique, la stimulation adrénergique des cardiomyocytes ventriculaires active majoritairement les protéines  $G_s$ , augmentant la force de contraction (effet inotrope positif) et accélérant la relaxation (effet lusitrope positif) cardiaque. En effet, les

récepteurs  $\beta$ -adrénergiques stimulés par l'activité sympathique activent majoritairement l'adénylate cyclase, qui synthétise de l'AMPc à partir d'ATP. L'AMPc active la PKA et Epac (*exchange protein directly activated by cAMP*) qui, via la PLC et la PKC, phosphorylent une grande partie de acteurs de l'homéostasie calcique, augmentant la contractilité et la relaxation des cardiomyocytes (Figure 35)<sup>173,174</sup>.

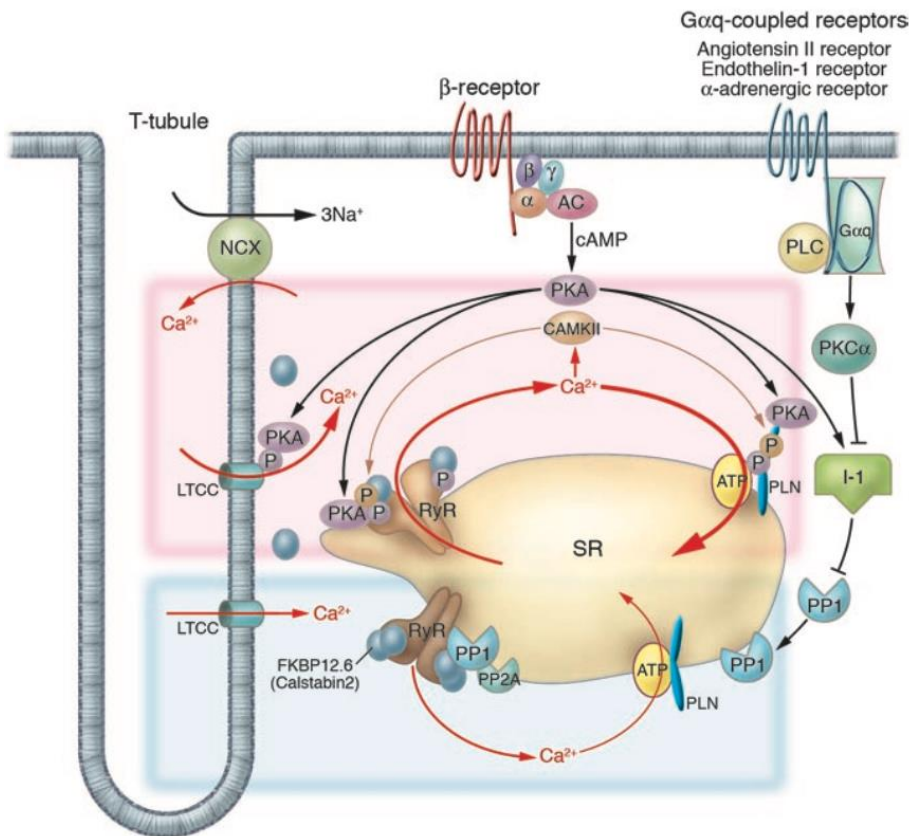


Figure 35. Impact de l'activité sympathique sur le couplage excitation-contraction<sup>147</sup>.

SR : Réticulum sarcoplasmique ; AC : Adénylate cyclase ; PP : protéine phosphatase.

L'effet inotrope positif de la stimulation sympathique passe par la phosphorylation des LTTC et des RyR2. La phosphorylation des LTTC augmente sa probabilité d'ouverture. La sensibilité accrue des LTTC augmente la quantité de  $\text{Ca}^{2+}$  entrant lors de la dépolarisation, stimulant potentiellement plus de RyR2<sup>175</sup>. De la même manière, la phosphorylation de RyR2 sur la Ser-2808 par la PKA augmente sa probabilité d'ouverture et donc la quantité de calcium relarguée disponible pour la contraction<sup>160</sup>.

L'effet lusitrope négatif passe par la phosphorylation du PLN, de la troponine-I et de la protéine de liaison à la myosine C (c-MyBP-C). La PKA phosphoryle le PLN sur le dérivé Ser-16, augmentant la recapture de  $\text{Ca}^{2+}$  par SERCA2a. La phosphorylation de la troponine-I et de c-MyBP-C diminue la sensibilité des fibres contractiles, il faudra une plus grande quantité de

$\text{Ca}^{2+}$  pour une même intensité de contraction, cette diminution de sensibilité permet une relaxation plus rapide des sarcomères<sup>176,177</sup>.

La CaMKII est activée par l'augmentation de  $\text{Ca}^{2+}$  sarcoplasmique induite par l'activité sympathique. La CaMKII à son tour phosphoryle le PLN sur Thr-17<sup>178</sup> et RyR2 sur Ser-2814 accentuant d'avantage l'effet inotrope positif et lusitrope positif du CEC et l'effet du  $\text{Ca}^{2+}$  sur le CET<sup>147,160,179</sup>.

Afin de limiter spatialement et temporellement la signalisation adrénérergique, les phosphodiésterases (PDE) dégradent l'AMPc, et les protéines phosphatases (PP) déphosphorylent les acteurs de l'homéostasie calcique<sup>180</sup>.

De la même manière, afin de limiter temporellement la signalisation adrénérergique, les RCPGs, comme les récepteurs  $\beta$ -adrénérergiques, peuvent être désensibilisés. Lorsqu'un ligand se fixe, les GRK (*G Receptor Kinase*) phosphorylent le récepteur, diminuant ainsi son activité. Une fois phosphorylé le récepteur peut être reconnu par l'arrestine- $\beta$  et être internalisé<sup>181</sup>.

Parce que les récepteurs  $\beta_1$  sont majoritaires dans le cœur et sont uniquement stimulateurs ( $G_s$ ), la réponse à une activation sympathique est stimulatrice. Cependant, dans une moindre mesure, d'autres protéines G sont stimulées. Les  $\beta_2$  sont liés à la  $G_s$  et la  $G_i$ , et les  $\beta_3$  sont uniquement liés à la  $G_i$ . L'activation de  $G_i$  inhibe l'adénylate cyclase, c'est pourquoi la stimulation du récepteur  $\beta_2$  a des effets plus faible que le récepteur  $\beta_1$  en terme de contractilité cardiaque ou encore que le récepteur  $\beta_3$  a un effet inotrope négatif<sup>170</sup>. Cette différence ne se fait pas qu'en terme de contractilité, alors que les récepteurs adrénérergiques  $\beta_1$  sont pro-apoptotiques, les  $\beta_2$  sont anti-apoptotiques<sup>173</sup>.

Via la stimulation de  $G_q$ , les récepteurs  $\alpha_1$  augmentent le calcium intracellulaire via la phospholipase  $C_\beta$  (PLC- $\beta$ ) et régulent l'hypertrophie cardiaque<sup>182</sup>.

La signalisation sympathique est complexe, elle fait intervenir de nombreux acteurs, et peut avoir des actions diamétralement opposées en fonction du récepteur stimulé.

#### 4.2.4. *Évaluation de l'activité sympathique*

L'activité du système nerveux sympathique est difficile à évaluer. Il est possible d'estimer au niveau systémique l'activité sympathique par le dosage des catécholamines : noradrénaline et adrénaline, plasmatiques mais leurs demi-vies est courte (environ 2 minutes) ce qui rend difficile le dosage<sup>183</sup>. L'adrénaline est directement sécrétée par les glandes surrénales. La noradrénaline présente dans le plasma résulte de la sécrétion de glandes surrénales et des fuites observées au niveau des synapses. Environ 90% de la noradrénaline sécrétée dans la synapse sont recaptés, les 10 % restant sont dégradés et diffuse dans la circulation systémique<sup>184</sup>. Dans le cas de l'insuffisance cardiaque, non seulement l'activité sympathique est plus importante mais la recapture au niveau synaptique est diminuée, ce qui augmente la fraction de noradrénaline plasmatique<sup>184</sup>.

L'activité sympathique peut également être évaluée par l'utilisation de radiotraceurs (ex. tomographie par émission de positon à l'aide du <sup>123</sup>I-MIBG) ou encore de la microneurographie (ex. la MSNA : *Muscle sympathetic nerve activity*). La MSNA permet, par l'utilisation de microélectrodes, d'analyser directement l'activité électrique du nerf sympathique. Ces deux techniques permettent l'évaluation quantitative de l'activité sympathique. En revanche, ces techniques sont relativement peu utilisées en routine car elles nécessitent un matériel et une expertise particuliers<sup>185</sup>.

La balance sympatho-vagale peut être évaluée à partir de l'analyse de la variabilité de la fréquence cardiaque (HRV *heart rate variability*), à partir d'un ECG ou d'un tracé de pression artérielle. En étudiant la variabilité de l'intervalle RR (le temps entre 2 dépolarisations des ventricules), une analyse de Fourier permet d'établir un spectre de fréquence. Les basses fréquences (LF : *low frequency*) sont dépendantes à la fois de l'activité sympathique et parasympathique, les hautes fréquences (HF : *high frequency*), quant à elles, sont dépendantes de l'activité parasympathique. En effet l'utilisation d'un antagoniste cholinergique des récepteurs muscariniques (atropine) diminue les LF et les HF, alors que l'utilisation d'un  $\beta$ -bloquant diminue uniquement les LF<sup>186</sup>. C'est pourquoi le ratio LF/HF est fréquemment utilisé comme reflet de la balance sympatho-vagale.

#### ***4.2.5. Cardiopathie ischémique et activité sympathique***

Nous l'avons évoqué à plusieurs reprises au cours de cette introduction, l'activité sympathique est une des réponses neuro-hormonales centrales dans le développement de la cardiopathie ischémique.

La chute de débit cardiaque suite à l'infarctus du myocarde entraîne une augmentation de l'activité sympathique. Effectivement, comme décrit précédemment, la chute de débit cardiaque impacte directement la pression artérielle systémique.

Le baroréflexe permet de réguler la pression artérielle rapidement via l'action du SNA. Il existe 2 groupes de barorécepteurs artériels, un dans les sinus carotidiens, l'autre dans la crosse aortique. Les fibres afférentes font remonter les informations de pression artérielle des barorécepteurs vers la médulla du SNC. Une fois le signal intégré, l'activité sympathique est stimulée en cas d'hypotension<sup>187</sup>.

Pour rappel, les chémorécepteurs sensibles à la capnie et à la saturation en O<sub>2</sub>, dans le cas de l'insuffisance cardiaque activent également le système nerveux sympathique. L'activité sympathique augmente encore une fois la vasoconstriction, la pression artérielle et le débit cardiaque. Si la pression artérielle devient trop élevée, le baroréflexe diminuera le tonus sympathique et augmentera le parasympathique.

Chez les patients insuffisants cardiaques la sensibilité du baroréflexe est diminuée et celle des chémorécepteurs augmentée, ce qui favorise l'augmentation de l'activité sympathique<sup>187,188</sup>.

D'ailleurs, l'HRV montre une augmentation de l'activité sympathique (ratio LF/HF) au cours de l'insuffisance cardiaque, diminué par l'utilisation de propranolol ( $\beta$ -bloquant)<sup>189</sup>.

Si l'activité sympathique est nécessaire en post-infarctus du myocarde afin de maintenir un débit cardiaque correcte, avec le temps elle participe au développement de la cardiopathie ischémique (Figure 36).



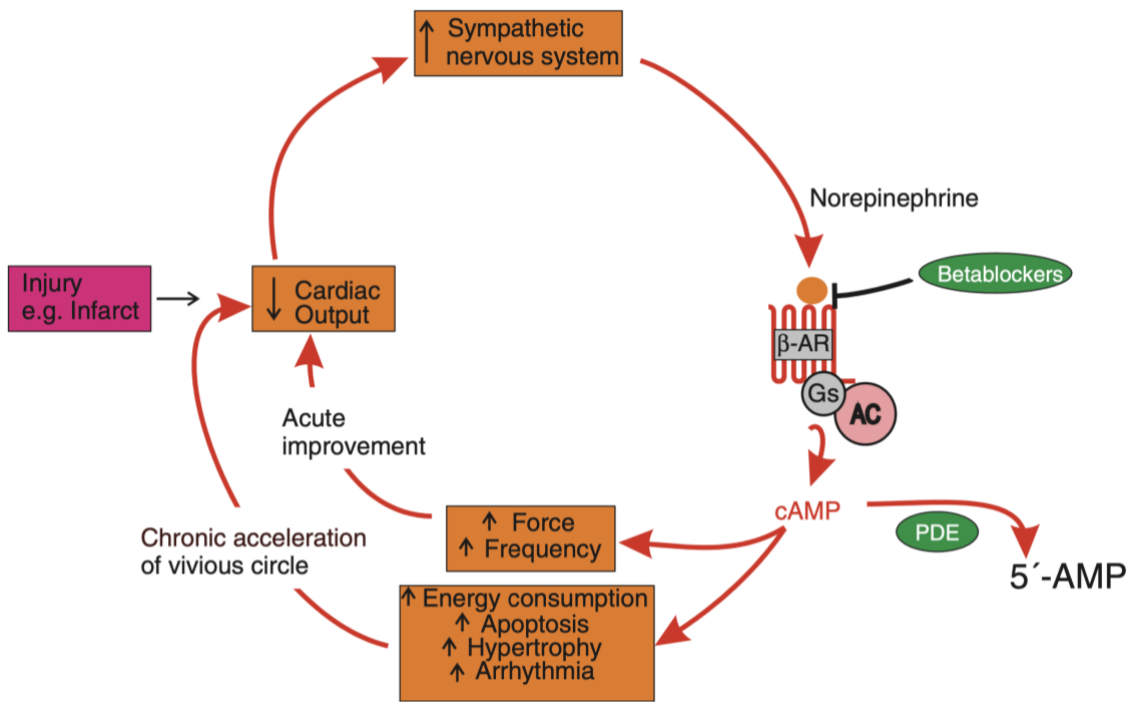


Figure 36. Cercle vicieux de l'activation sympathique dans le développement de la cardiopathie ischémique<sup>180</sup>.

En dehors d'un contexte ischémique, une surexpression du récepteur adrénergique  $\beta_1$  dans des modèles de souris transgéniques altère les transitoires calciques, induit une dysfonction systolique et diastolique (dilatation du ventricule gauche, augmentation de l'hypertrophie et de la fibrose) conduisant au développement de l'insuffisance cardiaque et augmentant la mortalité<sup>190-192</sup>. De même, une stimulation pharmacologique à l'aide d'un agoniste  $\beta$ -adrénergique comme l'isoproterenol permet de reproduire la dilatation, l'hypertrophie et la fibrose ventriculaire<sup>193,194</sup>.

Dans un contexte d'insuffisance cardiaque, les différents récepteurs adrénergiques sont altérés. La densité des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques est diminuée, diminuant ainsi la sensibilité de la voie de signalisation et la réponse à un agoniste  $\beta$ -adrénergique<sup>195</sup>. La transcription du récepteur  $\beta_1$  est diminuée, et sa diminution est corrélée à l'importance de l'insuffisance cardiaque, par contre la transcription de  $\beta_2$  est inchangée<sup>196</sup>. Cette différence de transcription modifie le ratio  $\beta_1/\beta_2$ , limitant la réponse inotrope positive de  $\beta_1$ <sup>197</sup>.

Le rôle des récepteurs adrénergiques  $\alpha_1$  semble bénéfique, leurs inhibitions contribuent à la progression de l'hypertrophie et de l'insuffisance cardiaque<sup>182</sup>. Les  $\alpha_2$  sont eux présent en présynaptique, ils permettent un rétrocontrôle de la sécrétion des vésicules de noradrénaline, leurs inhibitions induisent une libération plus importante de catécholamines et une hypertrophie myocardique<sup>185</sup>.

Les RCPGs, tels que les récepteurs adrénergiques, peuvent aussi se désensibiliser. Une stimulation adrénergique phosphoryle les récepteurs adrénergiques via les GRK, ce qui les désensibilisent<sup>198</sup>. Or, dans l'insuffisance cardiaque, l'expression de GRK2 et GRK5 cardiaque est augmentée et en désensibilisant les récepteurs adrénergiques, elle diminue la contractilité du myocarde. La désensibilisation peut être suivie d'une internalisation du récepteur par la  $\beta$ -arrestine diminuant le nombre de récepteurs disponibles à la surface du cardiomyocyte et ainsi la contractilité<sup>173,199</sup>. Un traitement avec un inhibiteur de GRK2 (paroxetine) pendant 4 semaines chez la souris, reverse la dysfonction et le remodelage cardiaque post-infarctus du myocarde<sup>200</sup>.

De même que la stimulation des récepteurs  $\alpha_2$  au niveau présynaptique limite la sécrétion de noradrénaline, leur présence au niveau des glandes surrénales permet de limiter la sécrétion de catécholamine<sup>173</sup>. En condition d'insuffisance cardiaque, l'expression de GRK2 est également plus importante dans les glandes surrénales et la désensibilisation des récepteurs  $\alpha_2$  augmente la quantité de catécholamines circulantes<sup>201</sup>. La levée de la désensibilisation des récepteurs  $\alpha_2$  par une délétion cellule chromaffine spécifique (cellules présentes dans la médulla des surrénales responsable de la sécrétion des catécholamine) de GRK2 permet de diminuer les catécholamines circulantes et le développement de l'insuffisance cardiaque<sup>202</sup>. L'utilisation d'inhibiteur de GRK2 sensibiliserait à nouveau la voie adrénergique et pourrait améliorer le pronostic des patients insuffisants cardiaques<sup>203</sup>.

#### ***4.2.6. Hypoxie intermittente et activité sympathique***

De nombreuses études ont montré que l'hypoxie intermittente induite par les apnées du sommeil est responsable d'une augmentation de l'activité sympathique. La technique de HRV montre que le ratio LF/HF est augmenté chez les patients souffrants d'apnée du sommeil<sup>204</sup>. De plus, ce ratio est augmenté de manière plus importante au cours du sommeil chez les patients insuffisants cardiaques qui souffrent d'apnées du sommeil centrales ou obstructives<sup>205</sup>.

Chez les patients apnéiques, nous observons également des taux importants de catécholamines circulantes et une augmentation de l'activité du nerf sympathique musculaire (MSNA) pendant et à distance des apnées<sup>206</sup>. La prise en charge par PPC de patients SAOS diminue l'activité sympathique (MSNA)<sup>207</sup>.

L'augmentation de la MSNA est également retrouvée chez des sujets sains exposés à 14 nuits de 8h d'hypoxie intermittente<sup>4</sup>. Chez la souris, 10 jours d'hypoxie intermittente sensibilisent les corps carotidiens, senseurs responsables de l'augmentation de l'activité sympathique<sup>5,208</sup>. De plus, après 14 jours d'hypoxie intermittente, le ratio LF/HF des rats est augmenté en comparaison au groupe normoxique contrôle<sup>64</sup>.

Comme nous l'avons vu au cours de cette partie, l'activité sympathique joue un rôle primordial dans le développement de la cardiopathie ischémique vers l'insuffisance cardiaque. L'activité sympathique induite par l'hypoxie intermittente chez les patients apnéiques pourrait donc accélérer le développement de la cardiopathie ischémique.

#### ***4.2.7. Modulation du système nerveux sympathique***

Le système nerveux sympathique, lorsqu'il est activé de façon persistante et soutenue, est délétère et favorise la progression de la cardiopathie ischémique. Plusieurs stratégies peuvent être mises en place afin de limiter cette activation et ses conséquences.

La stimulation vagale permet d'activer le système nerveux parasympathique par une stimulation du nerf vague. Une telle stimulation permet d'améliorer la fonction cardiaque dans un modèle de rat post-infarctus du myocarde et d'améliorer leur survie<sup>209</sup>. Un petit essai clinique non contrôlé a confirmé l'amélioration de la fonction cardiaque et la qualité de vie des patients insuffisants cardiaques<sup>210</sup>. Cependant, un essai clinique contrôlé en aveugle et randomisé plus récent sur 96 patients insuffisants cardiaques n'a pas montré d'effet bénéfique de la stimulation vagale sur la réhospitalisation et la mortalité après un suivi de 18 mois<sup>211</sup>.

Comme décrit précédemment, les  $\beta$ -bloquants sont utilisés aujourd'hui en clinique pour diminuer la progression de l'insuffisance cardiaque mais peuvent aussi être utilisés comme outils pharmacologiques dans les modèles animaux. Ils permettent, par antagonisme, de diminuer les conséquences de l'activité sympathique systémique. Cependant, même si les  $\beta$ -bloquants peuvent être cardiosélectifs en se fixant préférentiellement sur les récepteurs adrénergiques  $\beta_1$ , ils ont une action systémique et peuvent se fixer sur les  $\beta_2$  et induire une vasoconstriction périphérique.

La 6-hydroxydopamine détruit les neurones noradrénergiques et dopaminergiques, diminuant l'innervation sympathique systémique<sup>212,213</sup>. Chez des rats, la 6-hydroxydopamine injectée en systémique diminue l'innervation sympathique cardiaque et diminue également le ratio LF/HF<sup>214</sup>. L'innervation est évaluée à l'aide d'un marquage histologique de la tyrosine hydrolyse. La tyrosine hydroxylase est localisée dans les synapses noradrénergiques, c'est une enzyme limitante de la synthèse de la noradrénaline, sa quantification par histologie est assez sensible pour être représentative de l'innervation et de la quantité de noradrénaline dans le tissu<sup>215</sup>. Dans un modèle d'insuffisance cardiaque par constriction aortique (augmentation de la post charge) chez le rat, la dénervation par la 6-hydroxydopamine diminue l'hypertrophie cardiaque, la congestion pulmonaire et améliore la survie<sup>216</sup>. Cette dénervation est systémique et concerne également les neurones dopaminergiques.

Plutôt que d'augmenter l'activité parasympathique par stimulation vagale ou de détruire l'intégralité des neurones noradrénergiques par la 6-hydroxydopamine, il est possible de dénervé de manière plus ou moins spécifique le système nerveux sympathique. En effet comme vu précédemment (Figure 33 page 49) les ganglions du système sympathique se trouvent de part et d'autre du rachis. Une dénervation chirurgicale ou chimique de certains ganglions permet d'empêcher l'influx nerveux et donc l'activité sympathique efférente.

Il est alors possible d'inhiber spécifiquement le système nerveux sympathique cardiaque. En effet, les ganglions cervical moyen et stellaire sont en grande partie responsables de l'innervation sympathique cardiaque. Les ganglions de la chaîne sympathique droite sont majoritairement responsables de l'innervation droite du cœur et la chaîne sympathique gauche de l'innervation gauche du cœur<sup>217</sup>, le ganglion stellaire innerve majoritairement la partie dorsale du cœur<sup>218</sup> (Figure 37).

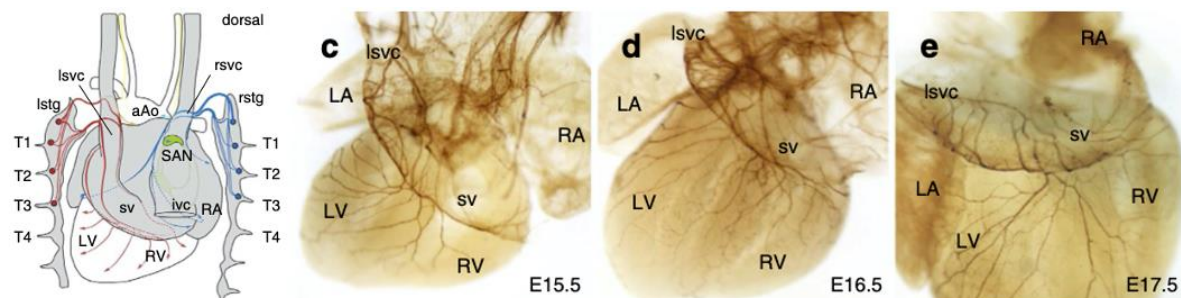


Figure 37. Visualisation des projections du ganglion stellaire dans le cœur<sup>218</sup>.

La dénervation cardiaque est déjà utilisée en clinique afin de traiter certaines arythmies comme l'allongement du QT long. Les patients présentant un intervalle QT allongé sont sensibles aux arythmies. L'activité sympathique en sensibilisant par phosphorylation les canaux

ioniques comme le LTCC potentialisent leurs risques d'arythmies<sup>219</sup>. De même chez de jeunes patients souffrant d'arythmie causée par une mutation au niveau des RyR2 (fuites calciques du réticulum sarcoplasmique), la dénervation sympathique cardiaque gauche permet de limiter voire de stopper les arythmies<sup>220</sup>.

Dans un contexte de cardiopathie ischémique, Xiong *et al.*, sur un modèle d'infarctus du myocarde chez le chien, ont dénervé le ganglion stellaire gauche par injection de toxine cholérique B et de saporine. L'injection diminue la présence de tyrosine hydroxylase dans le ganglion validant la dénervation. La dénervation diminue l'hypertrophie, la fibrose, la chute d'expression des récepteurs adrénergique  $\beta_1$ , la dysfonction cardiaque, les catécholamines plasmatiques, et les marqueurs de souffrance cardiaque (ANP, BNP) induit par la cardiopathie ischémique<sup>221</sup>.

Ziegler *et al.*, ont procédé à une ablation des ganglions cervicaux supérieurs droit et gauche, associée à un infarctus du myocarde chez la souris. L'ablation des ganglions cervicaux supérieurs diminue la quantité de tyrosine hydroxylase de la paroi antérieure du cœur, confirmant ainsi la dénervation. La dénervation diminue l'hypertrophie des cardiomyocytes et l'inflammation induite par l'infarctus dans cette région du myocarde et s'accompagne d'une amélioration de la fonction et du débit cardiaque<sup>222</sup>.

Dans un contexte d'hypoxie intermittente, Yang *et al.*, ont dénervé des rats exposés 6 semaines à l'hypoxie intermittente par l'ablation des ganglions stellaire et T2-T4 droits. La dénervation cardiaque spécifique droite diminue la susceptibilité à la fibrillation atriale induite par l'hypoxie intermittente<sup>62</sup>.

Différentes techniques peuvent donc être utilisées afin de moduler l'activité sympathique. Les dénervations cardiaques ont l'avantage d'être plus spécifiques qu'une dénervation systémique qui impacte la régulation de tous les systèmes. Étant donné le rôle de l'activité sympathique dans la cardiopathie ischémique et l'hyperactivité sympathique retrouvée à l'hypoxie intermittente, la dénervation sympathique cardiaque pourrait diminuer l'impact délétère potentiel de l'hypoxie intermittente dans le développement de la cardiopathie ischémique.

### 4.3. Système rénine angiotensine aldostérone

Parmi les acteurs de la réponse neuro-hormonale de la cardiopathie ischémique, le système rénine angiotensine aldostérone (SRAA) joue un rôle important. Le SRAA permet de réguler la volémie et la pression artérielle, impactant directement la charge du cœur (pré-charge et post-charge).

Une diminution de la pression artérielle, une hypovolémie, une diminution de sodium plasmatique ou une stimulation sympathique déclenche une sécrétion de rénine à partir du rein. L'angiotensinogène sécrété par le foie est métabolisé en angiotensine I par la rénine. L'enzyme de conversion de l'angiotensine présente majoritairement dans les poumons permet la conversion de l'angiotensine I en angiotensine II qui se fixe sur ses récepteurs AT<sub>1</sub>R (*Angiotensine Receptor*) et AT<sub>2</sub>R (l'AT<sub>2</sub>R est peu présent à l'âge adulte)<sup>223</sup>. L'angiotensine II fixée sur son récepteur AT<sub>1</sub>R augmente la vasoconstriction des artérioles, l'activité sympathique, la rétention sodique, la sensation de soif et la sécrétion d'aldostérone par le cortex des glandes surrénales (Figure 38)<sup>223</sup>.

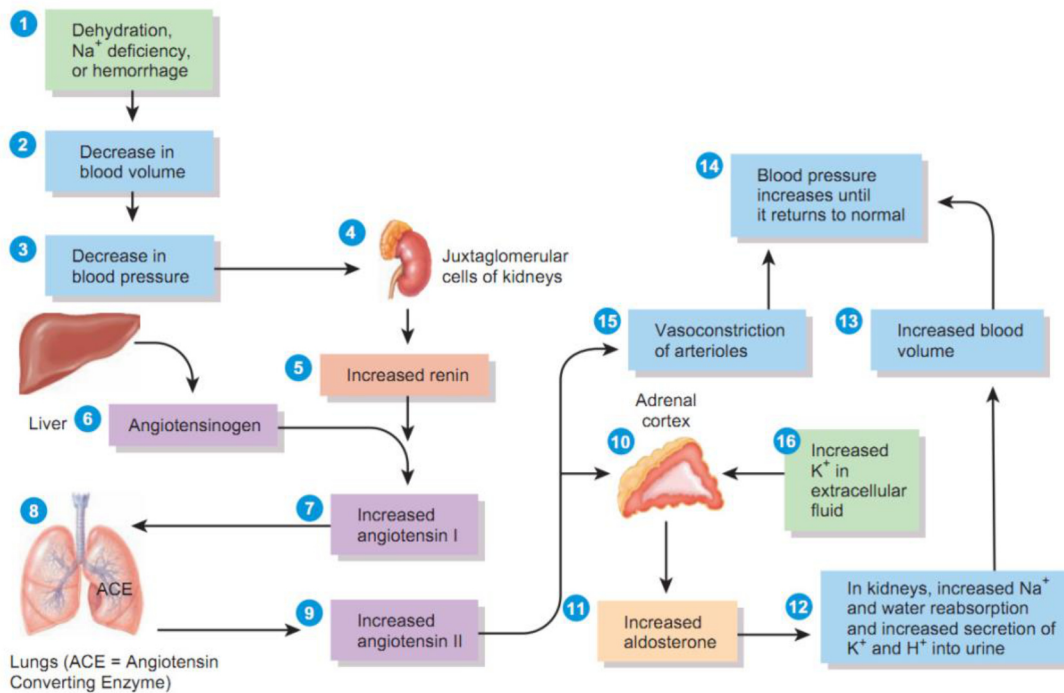


Figure 38. Régulation de la pression artérielle via le système rénine angiotensine aldostérone.

(John Wiley & Sons)

L'aldostérone à son tour se fixe sur les récepteurs aux minéralocorticoïdes et augmente la réabsorption de sodium et d'eau<sup>223</sup>. L'activation du SRAA permet via l'élévation de la pression artérielle de maintenir une bonne perfusion tissulaire systémique.

#### **4.3.1. Cardiopathie ischémique et système rénine angiotensine**

Dans la cardiopathie ischémique, la dysfonction cardiaque diminue le débit cardiaque et la pression artérielle activant le SRAA et l'activité sympathique<sup>224</sup>. De concert, l'activation de ces systèmes augmentent la volémie, la pression artérielle, et le débit cardiaque, ce qui augmente de façon chronique la charge de travail du cœur et contribue au développement de la cardiopathie ischémique.

Des modèles animaux sont d'ailleurs développés sur ce principe pour en étudier les mécanismes (ex. constriction aortique, hypertension...)<sup>139</sup>. L'inhibition du SRAA dans la cardiopathie ischémique diminue la post-charge en diminuant la vasoconstriction systémique et diminue également la pré-charge en diminuant la volémie, limitant ainsi le remodelage cardiaque<sup>225</sup>.

Les patients souffrant d'hypertension résistante aux traitements, développent de l'hypertrophie cardiaque. Des études ont montré que l'activité sympathique rénale est responsable d'une élévation de la pression artérielle, entre autres via une sécrétion plus importante de rénine. L'inhibition du système nerveux sympathique par une dénervation rénale diminue la pression artérielle chez ces patients et diminue l'hypertrophie cardiaque<sup>226</sup>.

Le SRAA contribuant également à l'augmentation de la volémie favorise l'apparition d'œdème pulmonaire aggravant la fonction cardiorespiratoire.

Comme décrit précédemment, au niveau mécanistique, l'angiotensine II en se fixant sur son récepteur, impacte directement l'hypertrophie, la fibrose et contribuent à la progression de la cardiopathie (cf. Cardiopathie ischémique page 26). Indépendamment de l'hypertension et de l'activité sympathique l'angiotensine II participe également à l'apoptose des cardiomyocytes<sup>227,228</sup>.

Li *et al.*, dans un modèle d'insuffisance cardiaque chez le lapin ont montré que l'angiotensine II sensibilise les corps carotidiens augmentant la réponse sympathique. De plus l'augmentation de l'expression des AT<sub>1</sub>R au sein des corps carotidiens et l'augmentation de l'expression de l'angiotensine II plasmatique dans l'insuffisance cardiaque, favoriseraient d'autant plus le reflex sympathique<sup>229</sup>.

#### ***4.3.2. Hypoxie intermittente et système rénine angiotensine***

Chez des patients souffrant d'apnées du sommeil, la pression artérielle sur 24 h est augmentée au même titre que l'angiotensine II et l'aldostérone plasmatique. Même si un traitement avec un inhibiteur de l'angiotensine II (valsartan) est 4 fois plus efficace, une prise en charge par la PPC diminue la pression artérielle sur 24 h et les niveaux plasmatiques d'angiotensine II et d'aldostérone<sup>230,231</sup>.

Étant donné que l'activité sympathique active le SRAA, l'hypoxie intermittente augmentant l'activité sympathique activerait le SRAA. Effectivement, une étude sur un modèle d'apnée chez le cochon a permis de mettre en évidence une augmentation de la sécrétion de rénine et d'aldostérone suite aux apnées, inhibée après une dénervation sympathique rénale<sup>232</sup>. De même que chez des rongeurs exposés à l'hypoxie intermittente, la dénervation rénale diminue la pression artérielle, l'activité du SRAA et l'activité du système nerveux sympathique induites par l'exposition à l'hypoxie intermittente<sup>233,234</sup>.

De plus, l'hypoxie intermittente en augmentant l'expression des AT<sub>1</sub>R dans la médulla du SNC sensibilise le chémoréflexe. Cette sensibilité accrue pourrait potentialiser l'activité sympathique chronique observée suite à une exposition à l'hypoxie intermittente<sup>235</sup>.

L'emballlement des systèmes neuro-hormonaux suite à une hypoxie intermittente pourrait contribuer au développement de la cardiopathie ischémique.



#### 4.4. Stress Oxydant

Le stress oxydant est un stress causé par des espèces réactives de l'oxygène (EROs) tels que des radicaux libres, des ions oxygénés et des peroxydes. Les radicaux libres de l'oxygène sont des dérivés réduits de l'oxygène, ils sont fortement réactifs et peuvent dégrader les structures cellulaires (lipides, protéines, ADN) induisant un stress oxydant.

Le stress oxydant peut provenir de la réaction inflammatoire. Les cellules inflammatoires telles que les neutrophiles sont capables, une fois activées, de relâcher des ions superoxydes et des radicaux libres de l'oxygène, toxiques pour les cellules environnantes. Bien que le stress oxydant et l'inflammation sont interconnectés et s'amplifient mutuellement<sup>236</sup>. Il n'est pas généré uniquement par l'activation du système immunitaire, il résulte également d'un déséquilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène (EROs) et les mécanismes cellulaires antioxydants.

La mitochondrie, la NADPH (*reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) oxydase (Nox), la xanthine oxidase, le découplage de la NOS (*nitric oxide synthase*) sont responsables de la production de (EROs). A l'opposé, les SOD (*Superoxyde dismutase*) et les GPX (*Glutathion peroxydase*) sont les principales enzymes qui catalysent les EROs et diminuent le stress oxydant. Des molécules ont aussi un pouvoir antioxydant comme les vitamines C et E, les polyphénols, les caroténoïdes, le glutathion par exemple<sup>236</sup>.

##### 4.4.1. Cardiopathie ischémique et stress oxydant

Dans la cardiopathie ischémique, le niveau d'EROs est augmenté. L'augmentation d'EROs est même corrélée à la gravité de la cardiopathie (fraction d'éjection)<sup>237</sup>.

Une cinétique en post-infarctus du myocarde chez le rat confirme l'élévation d'EROs au cours de la cardiopathie associée à une diminution des défenses antioxydantes<sup>238</sup>.

Le stress oxydant causé par l'augmentation de la production de EROs et la diminution des défenses antioxydantes est délétère, tant sur la fonction que sur la structure du myocarde<sup>239</sup> (Figure 39). En effet, les EROs peuvent altérer la mitochondrie et induire l'apoptose, activer NFkB et favoriser le remodelage cardiaque, modifier les protéines de l'homéostasie calcique via des modifications post-traductionnelles et amener à une dysfonction contractile<sup>239</sup>.

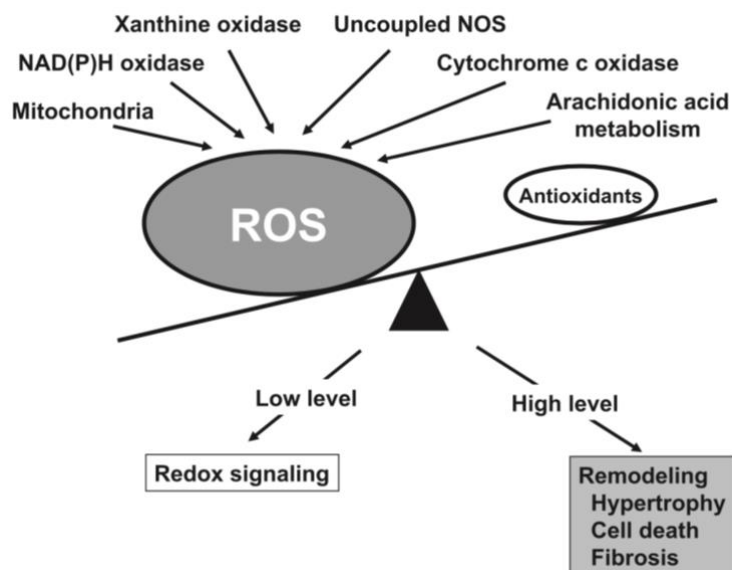


Figure 39. Stress oxydant et remodelage cardiaque<sup>239</sup>.

#### 4.4.2. Hypoxie intermittente et stress oxydant

Le SAOS est aujourd'hui considéré comme étant un perturbateur de la balance oxydative<sup>236</sup>. Au cours des apnées, les phases successives de réoxygénation causée par l'hypoxie intermittente sont comparable à un épisode d'ischémie reperfusion et sont responsables d'une production d'EROs<sup>240</sup>. Franco *et al.*, ont mis en évidence une corrélation positive entre la production d'EROs et l'IAH<sup>241</sup>. D'ailleurs, les neutrophiles de patients SAOS génèrent plus d'anions superoxydes, et la génération de ce stress oxydant est diminuée suite à l'utilisation de la PPC<sup>242</sup>.

Ce stress oxydant est retrouvé chez des rats exposés à l'hypoxie intermittente. Le stress oxydant est associé à une augmentation de la pression artérielle et de la taille de l'infarctus du myocarde après un épisode d'ischémie-reperfusion. L'utilisation de la mélatonine et l'atorvastatine, deux molécules antioxydantes, diminue le stress oxydant, l'augmentation de pression artérielle et la taille de l'infarctus du myocarde<sup>243-246</sup>.

Le stress oxydant chronique généré par l'hypoxie intermittente impact également les corps carotidiens de manière proportionnelle à la sévérité de l'hypoxie. En effet, 10 jours d'exposition à l'hypoxie intermittente sensibilisent les corps carotidiens, ce qui participe à l'augmentation du tonus du système nerveux sympathique. Les résultats de ces études suggèrent que le stress oxydant produit lors des phases successives d'hypoxie-réoxygénation est responsable de la sensibilisation. Puisque l'utilisation d'un antioxydant, ou une exposition

contrôle à l'hypoxie continue (pas d'hypoxie-réoxygénation) ne sensibilise pas les corps carotidiens<sup>208,247</sup>.

Le stress oxydant lorsqu'il est trop important et chronique est délétère pour le système cardiovasculaire. Il est augmenté à l'insuffisance cardiaque et lors d'une exposition à l'hypoxie intermittente. L'association cardiopathie ischémique et exposition à l'hypoxie intermittente pourrait aggraver le stress oxydant et la progression de la cardiopathie ischémique.

#### 4.5. Activation de HIF-1

HIF-1, *Hypoxia Inducible Factor 1* comme son nom l'indique est un facteur de transcription induit par l'hypoxie<sup>248</sup>. C'est un hétérodimère composé de HIF-1 $\alpha$  et HIF-1 $\beta$ . Une fois hétérodimérisé, HIF-1 est capable de reconnaître une séquence d'ADN particulière (5'-(A/G)CGTG-3'), appelée HRE pour *hypoxia response element*. Une fois l'HRE reconnue, HIF-1 initie la transcription de centaines de gènes codant pour des protéines impliquées dans le système cardiovasculaire dont la production d'érythrocytes, l'angiogenèse, le métabolisme énergétique...<sup>249,250</sup>

HIF-1 $\alpha$  et HIF-1 $\beta$  sont exprimés constitutivement. En condition normoxique l'expression d'HIF-1 $\alpha$  est diminuée. En effet, des PHD (*prolyl hydroxylases domain*) utilisent l'O<sub>2</sub> comme substrat afin d'hydroxyler HIF-1 $\alpha$  (ajout d'un groupement -OH). Les hydroxylations sont ensuite reconnues par la protéine VHL (Von Hippel-Lindau) qui présente HIF-1 $\alpha$  à un complexe d'ubiquitinylation. Les marques d'ubiquitinylation entraînent la dégradation d'HIF-1 $\alpha$  par le protéasome<sup>249</sup>. Lors d'un épisode d'hypoxie, la privation d'O<sub>2</sub>, substrat nécessaire à l'hydroxylation de HIF-1 $\alpha$  par les PHD, empêche la dégradation de HIF-1 $\alpha$  qui rejoint le noyau pour s'associer à HIF-1 $\beta$  et activer la transcription génique. Un des autres régulateurs de l'activité de HIF-1 intervient au niveau de la transactivation. En effet, le facteur d'inhibition de HIF-1 (FIH-1) régule l'activité de HIF-1 en hydroxylant la sous-unité  $\alpha$ . Mais cette fois-ci, l'encombrement stérique généré par le groupement hydroxyle empêche le recrutement du co-activateur, acétyltransférase p300/Creb-Binding Protein (CBP) diminuant ainsi la transcription des gènes cibles de HIF-1<sup>251</sup> (Figure 40).

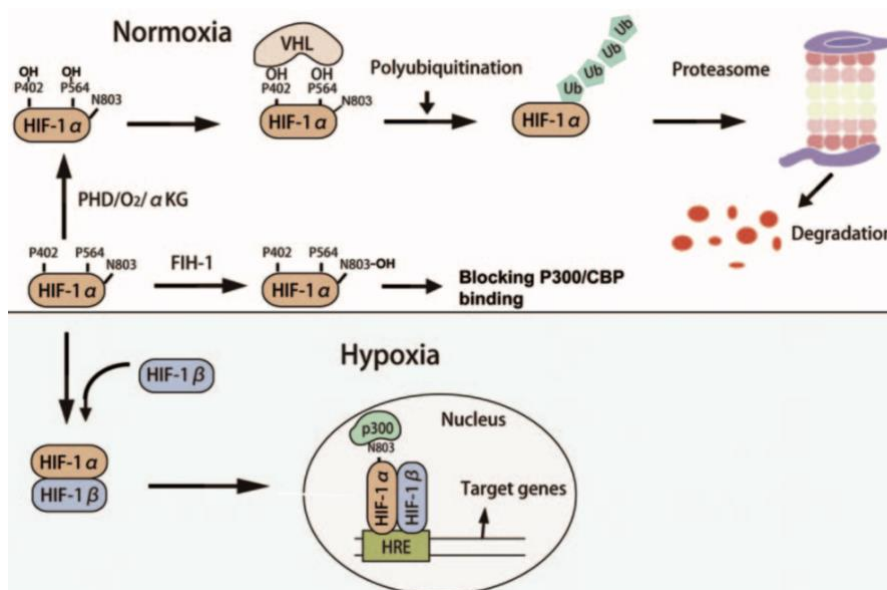


Figure 40. Régulation de l'expression et de l'activité de HIF-1 en normoxie et en hypoxie<sup>252</sup>.

#### 4.5.1. Cardiopathie ischémique et HIF-1

Si une activation de HIF-1 en aigue est connu pour être bénéfique, par exemple au cours d'un épisode ischémique, dans le cas d'une stabilisation prolongée, HIF-1 $\alpha$  perturbe l'homéostasie calcique et induit une dysfonction contractile<sup>253</sup>. Bekerejan *et al.*, confirment qu'une surexpression soutenue d'HIF-1 $\alpha$  diminue progressivement la fonction cardiaque et participe au développement d'une cardiomyopathie (non-ischémique)<sup>254</sup>.

Chez des patients souffrants de cardiomyopathie, l'expression cardiaque de HIF-1 $\alpha$  est augmenté et les niveaux plasmatiques élevés de HIF-1 $\alpha$  corrént avec la diminution de la fraction d'éjection et la mortalité des patients insuffisants cardiaques<sup>253,255</sup>.

#### 4.5.2. Hypoxie intermittente et HIF-1

Dans le cas particulier de l'hypoxie intermittente, en plus de la diminution de la dégradation et de l'inactivation de HIF-1 via les PHD et FIH-1, la genèse du stress oxydatif active puissamment HIF-1. En effet, le stress oxydatif active la phospholipase C qui permet la production d'IP3 (inositol tri-phosphate) et de DAG (diacylglycérol) (Figure 41).

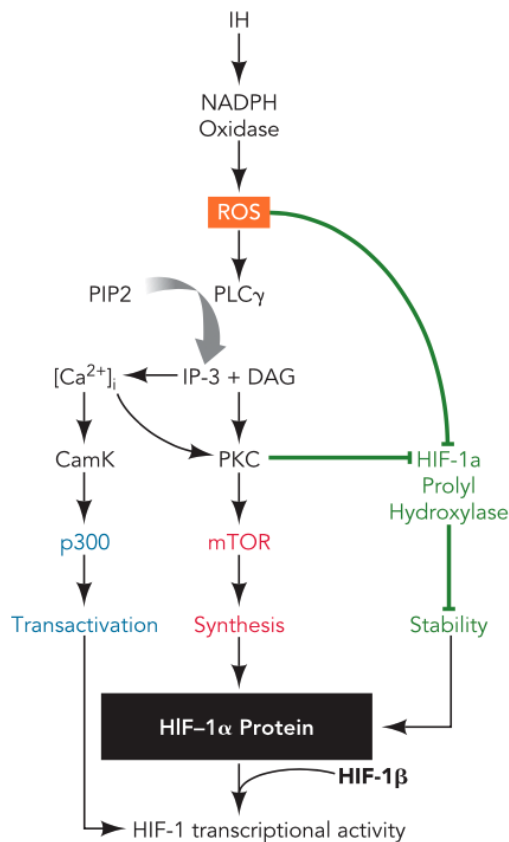


Figure 41. Hypoxie intermittente et activation d'HIF-1<sup>249</sup>.

Le récepteur à l'IP3 (IP3R) via différentes voies de signalisations impliquant la CaMKII, la PKC et mTOR (*mammalian target of rapamycin*), favorise la synthèse d'HIF-1 $\alpha$ ,

sa stabilisation et l'activation de HIF-1. De ce fait, si après une hypoxie continue HIF-1 est rapidement dégradé (5 min), après une hypoxie intermittente l'élévation d'expression de HIF-1 perdure après la réoxygénation, entre autres via l'activité de mTOR<sup>249,256</sup>

Récemment Moulin *et al.*, ont montré que l'augmentation de l'expression de HIF-1 $\alpha$  dans des oreillettes de patients souffrant de TRS est corrélée à l'IAH<sup>257</sup>. Des études chez l'animal ont montré qu'une exposition à l'hypoxie intermittente augmente l'activité de HIF-1 dans le myocarde et augmente la sensibilité du myocarde à un épisode d'ischémie reperfusion. De plus, à l'aide de souris partiellement délétées pour le gène codant pour HIF-1 $\alpha$ , Belaïdi *et al.*, ont montré que l'augmentation de l'activité de HIF-1 est responsable de l'augmentation de la taille de l'infarctus du myocarde<sup>54,68,69,258</sup>. Cependant, le rôle potentiel de HIF-1 dans un contexte de cardiopathie ischémique associée à l'hypoxie intermittente n'est pas décrit.

En plus d'être activé de façon soutenue par l'hypoxie intermittente, HIF-1 $\alpha$  est également impliquée dans la sensibilité à l'hypoxie puisqu'il sensibilise les corps carotidiens. En effet, l'hypoxie intermittente augmente fortement l'activité des corps carotidiens et ceci s'accompagne d'une augmentation des taux de noradrénaline circulant, caractérisant une activité sympathique accrue. Ces conséquences de l'hypoxie intermittente sont abolies chez les souris partiellement délétées pour le gène codant pour HIF-1 $\alpha$ <sup>5</sup>. D'ailleurs, la sensibilisation de la réponse à l'hypoxie intermittente est diminuée par un traitement avec un anti oxydant, mettant en évidence un lien étroit voir réciproque entre hypoxie intermittente et stress oxydant<sup>5</sup>. Il est également à noter que le rôle de HIF-1 dans la sensibilité à l'hypoxie suggère fortement le lien entre le facteur de transcription et l'activation sympathique induite par l'hypoxie intermittente.

HIF-1 $\alpha$  est augmenté suite à une exposition à l'hypoxie intermittente et l'activité soutenue et persistante d'HIF-1 est décrite pour participer au développement de cardiomyopathie. L'hypoxie intermittente pourrait alors contribuer à l'aggravation de la cardiopathie ischémique, en déclenchant la transcription des gènes cibles de HIF-1, ou encore en augmentant l'activité sympathique via la sensibilisation des corps carotidiens.

#### 4.6. Stress du réticulum endoplasmique pro-apoptotique

Le réticulum endoplasmique (RE) est un organite intracellulaire organisé en réseau de membranes interconnectées présent dans les cellules eucaryotes. Il est composé d'une partie rugueuse et d'une partie lisse. Le réticulum endoplasmique granuleux (REG) est composé de ribosomes impliqués dans la synthèse protéique. Le REG participe également à la maturation des protéines, aux modifications post-traductionnelles et à l'adressage des protéines. Le réticulum endoplasmique lisse (REL) synthétise des lipides, des phospholipides, des stérols et régule également l'homéostasie calcique en stockant et relargant le calcium<sup>259</sup>.

Dans le cas de la cellule musculaire striée squelettique et striée cardiaque, le RE proche des sarcomères, spécialisé dans le CEC est appelé réticulum sarcoplasmique (RS). Cette catégorisation des RE peut paraître dogmatique puisqu'il semblerait que le RS puisse également synthétiser des protéines<sup>259</sup>. Le RS est même subdivisé en 2, le RS jonctionnel proche des tubules-T spécialisé dans le relargage du calcium et le RS longitudinal spécialisé dans la recapture et le stockage du calcium<sup>260</sup>.

En plus des nombreuses fonctions cellulaires dans lesquelles il est impliqué, le RE interagit également avec d'autres compartiments cellulaires comme les mitochondries, les lysosomes, le noyau... Un stress du réticulum endoplasmique peut alors avoir un retentissement important sur toute l'homéostasie cellulaire.

La dérégulation d'une ou plusieurs fonctions du RE peut donc conduire à un mauvais repliement des protéines néo-synthétisées et induire un stress du RE. Le stress du RE active des cascades de transductions complexes regroupées sous le nom de UPR (*unfolded protein response*) dans le but de rétablir l'homéostasie du RE<sup>261</sup>. Si le stress du RE est excessif ou prolongé, l'UPR conduit à l'apoptose de la cellule<sup>262</sup>.

La réponse UPR est composée de 3 voies de signalisation différentes, activées par IRE1 (*inositol requirement enzyme 1*), ATF6 (*activating transcription factor*) et PERK (PKR (*protein kinase RNA*) –*like ER kinase*). En l'absence de stress, la protéine chaperonne résidente du RE appelée GRP78 est liée à ces 3 acteurs de la réponse UPR<sup>263</sup>. En situation de stress du RE, GRP78 se fixe préférentiellement sur les protéines mal conformées ce qui active IRE1, ATF6, PERK (Figure 42). L'objectif est de diminuer la synthèse de nouvelles protéines, d'augmenter la maturation des protéines déjà formées via l'expression de protéines chaperonnes

ou encore d'éliminer les protéines mal conformées par l'expression de protéines de dégradation, ERAD (*ER-associated degradation*).

En cas de stress du RE trop intense ou prolongé, les niveaux d'eIF2 $\alpha$  (*eukaryotic Initiation Factor 2*) phosphorylé augmente, active ATF4, puis le facteur de transcription CHOP (*C/EBP homologous protein*) qui régule la transcription de nombreux gènes pro-apoptotiques<sup>264</sup>.

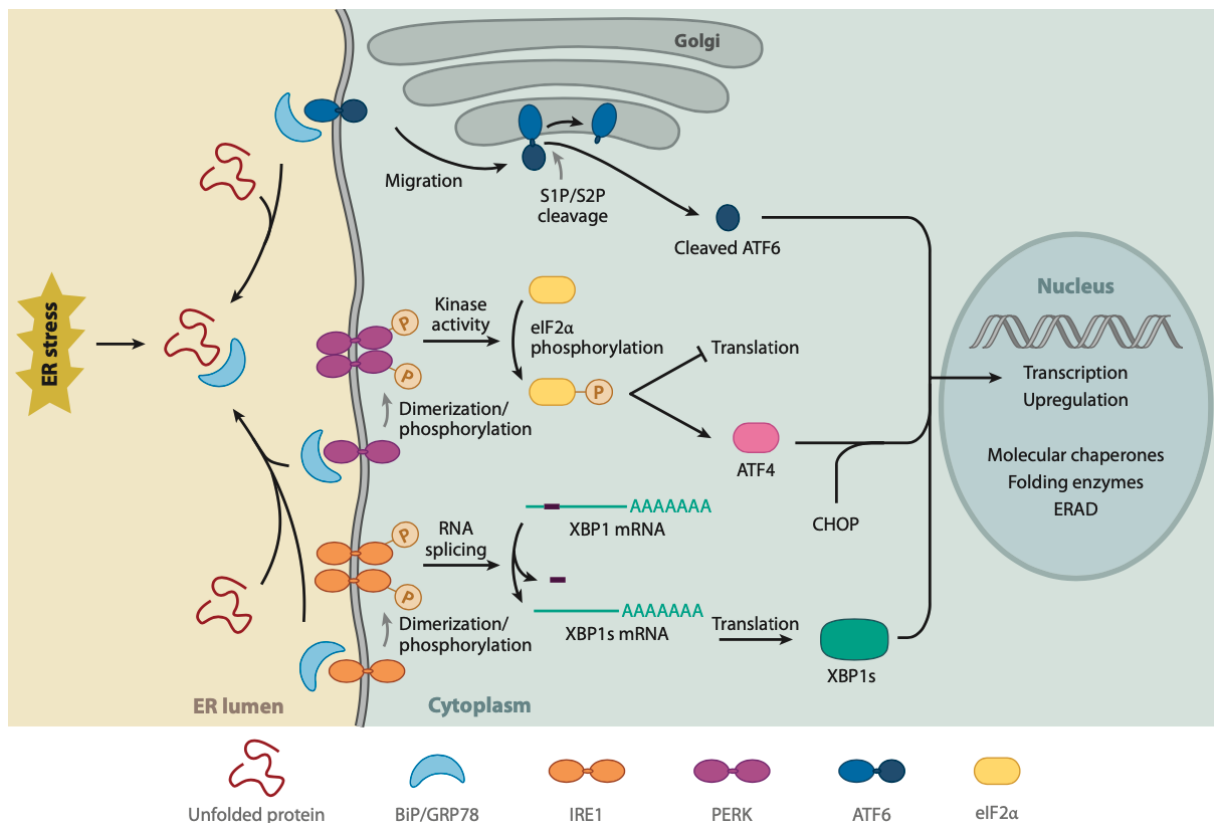


Figure 42. Voies de signalisation de l'UPR après un stress du RE<sup>265</sup>.

Entre autres CHOP active des protéines de la famille des BCL-2 qui entraînent l'ouverture du MPTP, le clivage en cascade des pro-caspases-12,-9 puis -3 en caspases, la caspase-3 étant l'effecteur final de l'apoptose<sup>264</sup>.

#### 4.6.1. Cardiopathie ischémique et stress du réticulum endoplasmique

Le stress du RE joue un rôle majeur dans le développement de nombreuses maladies cardiovasculaires<sup>262,265</sup>.

Étant donné que la cardiopathie ischémique entraîne des dérégulations de l'homéostasie calcique, et que ces perturbations peuvent être à l'origine d'un stress du RE<sup>266</sup>, il est peu surprenant d'observer chez des patients souffrant de cardiopathies ischémique ou dilatée un stress du RE associé à une augmentation de CHOP<sup>267,268</sup>.



Sur des modèles animaux d'insuffisance cardiaque (constriction aortique) plusieurs études ont révélé la présence d'un stress du RE pro-apoptotique (élévation de CHOP), associé à une apoptose accrue, une hypertrophie et une dysfonction contractile<sup>268-270</sup>. La délétion de CHOP diminue d'ailleurs l'apoptose, l'hypertrophie et la dysfonction contractile induite par la constriction aortique, mettant en évidence le rôle majeur de l'UPR dans la progression de l'insuffisance cardiaque<sup>268</sup>.

#### ***4.6.2. Hypoxie intermittente et stress du réticulum endoplasmique***

Plusieurs études chez l'animal ont montré que l'hypoxie intermittente induit un stress du RE pro-apoptotique au niveau cardiaque. Des molécules comme l'adiponectine ou encore la métallothionéine permettent de réduire le stress du RE induit par l'hypoxie intermittente et semblent cardioprotectrices. Au laboratoire, nous avons également montré qu'un exercice intermittent de haute intensité réduit le stress du RE et l'augmentation de la taille de l'infarctus du myocarde induit par l'hypoxie intermittente<sup>69,271,272</sup>. Enfin, l'inhibition du stress du réticulum par TUDCA (*tauroursodeoxycholic acid*), permet de prévenir d'une part l'activation de HIF-1 et d'autre part, l'augmentation de la taille de l'infarctus du myocarde induites par l'hypoxie intermittente<sup>68</sup>.

Le stress du RE semble participer à l'évolution de la cardiopathie ischémique et aux conséquences délétères de l'hypoxie intermittente. Ainsi, le stress du RE pourrait être un mécanisme par lequel l'hypoxie intermittente aggraverait la cardiopathie ischémique.

## 5. OBJECTIFS DE LA THESE

Si les troubles respiratoires du sommeil (TRS) augmentent la mortalité des patients souffrant de cardiopathie ischémique. L'utilisation des supports ventilatoires n'ont pas montré d'effets bénéfiques sur la mortalité cardiovasculaire. C'est pourquoi il est nécessaire d'évaluer les mécanismes impliqués dans l'impact délétère de ces TRS afin de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

C'est pourquoi, au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés à l'impact de l'hypoxie intermittente, une des conséquences des TRS la plus délétère sur la progression de la cardiopathie ischémique.

Comme nous venons de le décrire tout au long de cette introduction de nombreux mécanismes sont connus aujourd'hui pour être impliqués dans la progression de la cardiopathie ischémique. Par ailleurs, ces mécanismes sont également décrits pour être activés suite à une exposition à l'hypoxie intermittente et pour participer à de nombreuses dysfonctions cardiovasculaires. De manière intéressante, tous ces mécanismes sont interconnectés et pourraient potentiellement s'additionner, s'amplifier, et aboutir à l'aggravation de la cardiopathie ischémique (Figure 43).

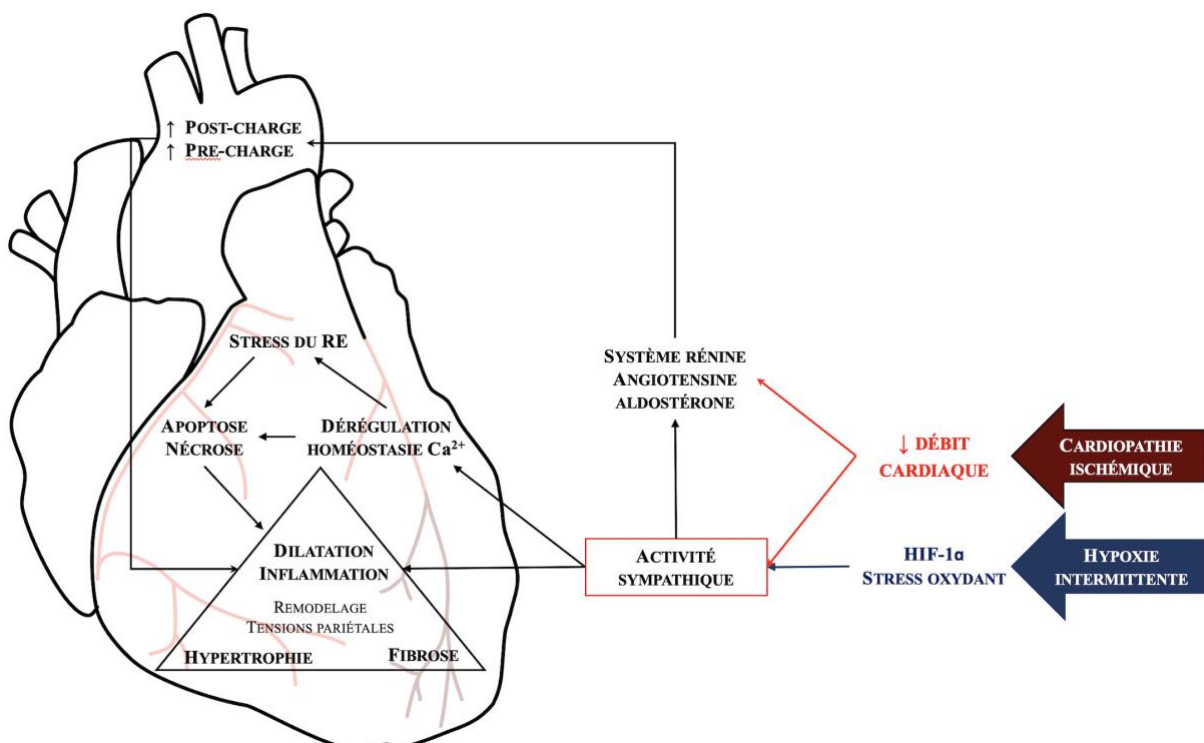


Figure 43. Rôle central de l'activité sympathique et hypothèse de l'impact de l'hypoxie intermittente dans la cardiopathie ischémique.

L'objectif de cette thèse était d'évaluer si l'hypoxie intermittente aggravait le développement de la cardiopathie ischémique et d'évaluer les mécanismes mis en jeu qui pourraient participer à cette aggravation.

Dans un premier temps nous nous sommes focalisés sur l'étude de l'activité sympathique, de l'expression de HIF-1 $\alpha$  et l'exploration du stress du réticulum endoplasmique tout en évaluant le remodelage et la fonction cardiaque au cours d'un suivi post-infarctus du myocarde chez le rat.

Dans un deuxième temps nous avons inhibé l'activité sympathique cardiaque, afin d'évaluer si l'aggravation de la cardiopathie induite par l'hypoxie intermittente était modulée par l'augmentation de l'activité sympathique au niveau cardiaque. Nous avons également étudié l'impact de l'hypoxie intermittente sur la dérégulation de l'homéostasie calcique dans notre modèle de cardiopathie ischémique soumis à l'hypoxie intermittente.

# **MATERIELS ET METHODES**

## **1. DESIGN DES ETUDES**

### **1.1. Impact de l'hypoxie intermittente sur la progression de la cardiopathie ischémique chez le rat (Étude 1)**

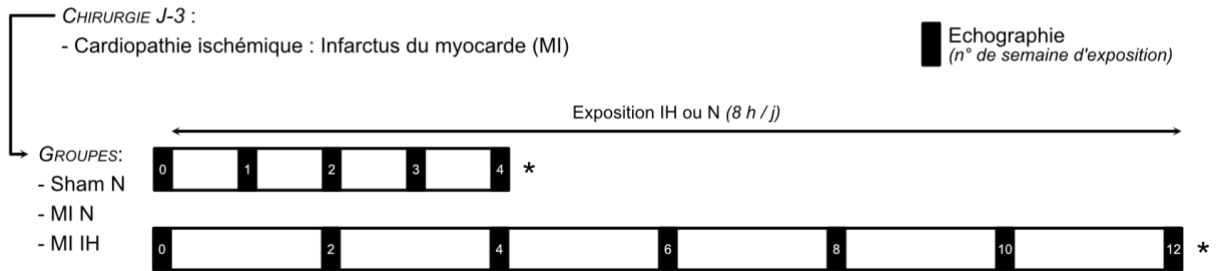
Au début de cette thèse, j'ai participé à la caractérisation de l'impact de l'hypoxie intermittente (IH) dans le développement de la cardiopathie ischémique chez le rat exposé. Les rats ont subi une ligature coronaire permanente (MI: myocardial infarction ou infarctus du myocarde) ou une chirurgie Sham. Après 3 jours de repos, ils ont été exposés 4 et 12 semaines à l'hypoxie intermittente. Au cours de cette exposition, nous avons réalisé un suivi échographique longitudinal (*cf.* : Échographie cardiaque page 82). En fin de protocole, les animaux étaient anesthésiés et la fonction cardiaque était évaluée par cathétérisme cardiaque (*cf.* : Cathétérisme cardiaque page 82). Cette cinétique d'exposition a permis de caractériser ce modèle, tant sur la fonction et le remodelage cardiaque que d'un point vu mécanistique (*cf.* : L'hypoxie intermittente précipite le remodelage cardiaque et la dysfonction contractile dans un modèle de cardiopathie ischémique chez le rat, page 97 et Figure 44).

### **1.2. Impact de la dénervation cardiaque sur la progression de la cardiopathie ischémique induite par l'hypoxie intermittente (Étude 2)**

La première étude a permis de mettre en évidence une augmentation de l'activité du système nerveux sympathique précoce et soutenue au cours de la cinétique. C'est pourquoi dans un second temps, j'ai mis au point un modèle chirurgical de dénervation sympathique cardiaque gauche (CSD : cardiac sympathetic denervation ou dénervation sympathique cardiaque) afin d'évaluer l'impact de l'activité sympathique sur la progression de la cardiopathie ischémique induite par l'hypoxie intermittente. Suite à la chirurgie (MI + CSD) et 3 jours de repos, les animaux ont été exposés à 6 semaines d'hypoxie intermittente pour étudier l'homéostasie calcique (*cf.* : Isolation de cardiomyocytes page 83), puis à 14 semaines d'hypoxie intermittente pour étudier la fonction et le remodelage cardiaque (*cf.* La dénervation sympathique cardiaque corrige l'aggravation de fonction cardiaque causée par l'hypoxie intermittente dans un modèle de cardiopathie ischémique chez le rat, page 113 et Figure 45).

### ETUDE 1 :

- Hypothèse :** L'hypoxie intermittente contribue à la progression de la cardiopathie ischémique
- Objectif :** Evaluer la fonction et le remodelage cardiaque au court du temps  
Mettre en évidence des voies de signalisations responsables des effets délétères



Fin d'exposition 4 et 12 semaines (\*) : Cathétérisme cardiaque, prélèvements

Focus : Activité sympathique, Stress du réticulum endoplasmique , HIF-1

### MATÉRIEL ET MÉTHODES :

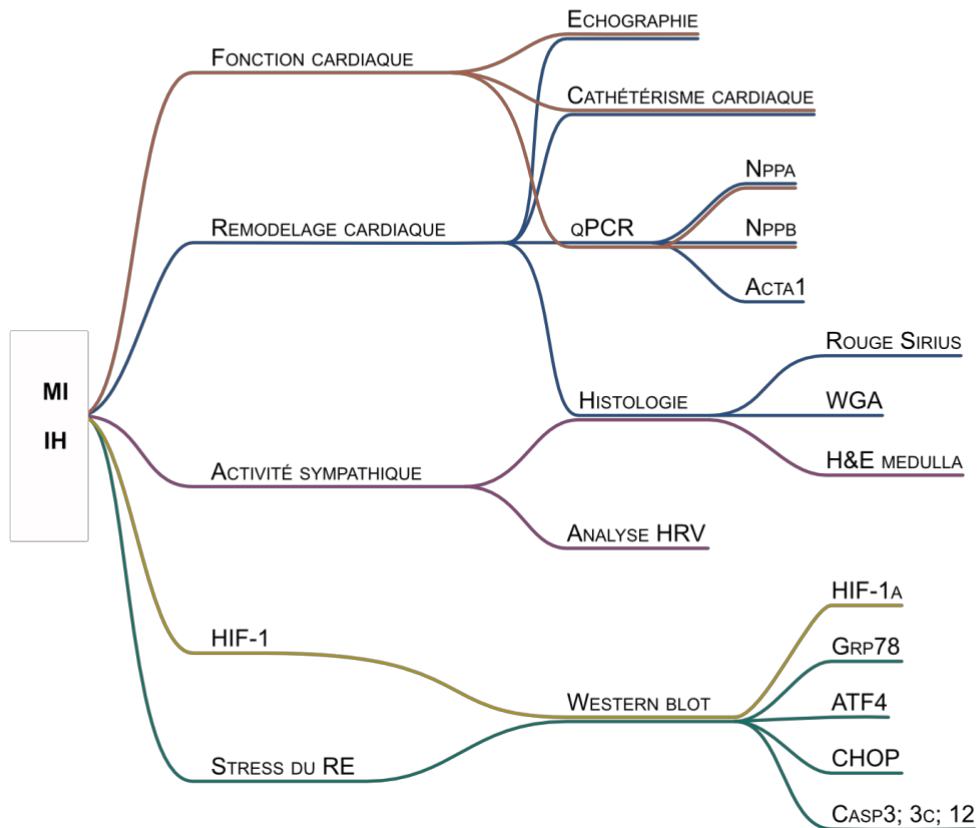


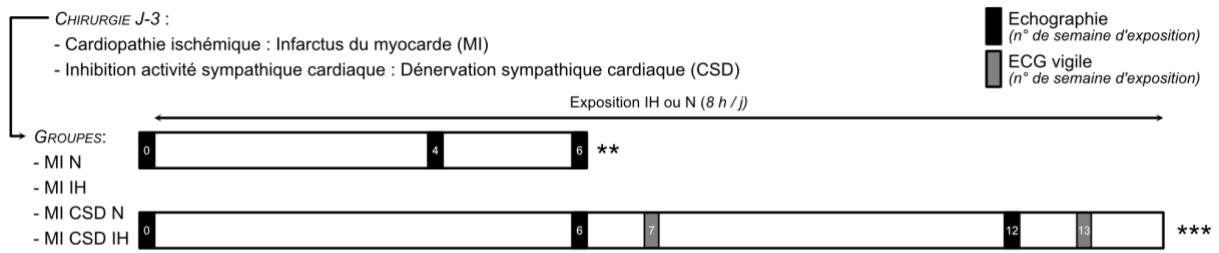
Figure 44 : Design de la première étude.

Trois groupes d'animaux sont exposés à l'hypoxie intermittente ou à la normoxie après avoir subi un infarctus du myocarde pendant 4 et 12 semaines. Au cours de cette exposition un suivi échocardiographique est effectué. A la fin de l'exposition un cathétérisme cardiaque est réalisé afin d'évaluer la fonction cardiaque. Après 4 et 12 semaines, les tissus sont prélevés pour analyser l'expression de protéines et d'ARN. MI : myocardial infarction ou infarctus du myocarde ; IH : intermittent hypoxia ou hypoxie intermittente ; N : normoxie.

**ETUDE 2 :**

**Hypothèse :** L'hyperactivité du système nerveux sympathique causée par l'hypoxie intermittente est responsable de la progression de la cardiopathie ischémique

**Objectif :** Evaluer l'impact d'une dénervation sympathique cardiaque spécifique sur la fonction et le remodelage cardiaque



**Fin d'exposition 6 semaines (\*\*)** : Isolation de cardiomyocytes, prélèvements

**Focus:** Homéostasie calcique, Réserve adrénergique, Activité sympathique

**Fin d'exposition 14 semaines (\*\*\*)** : Prélèvements

**Focus:** Activité sympathique, Transcriptomique

**MATÉRIEL ET MÉTHODES :**

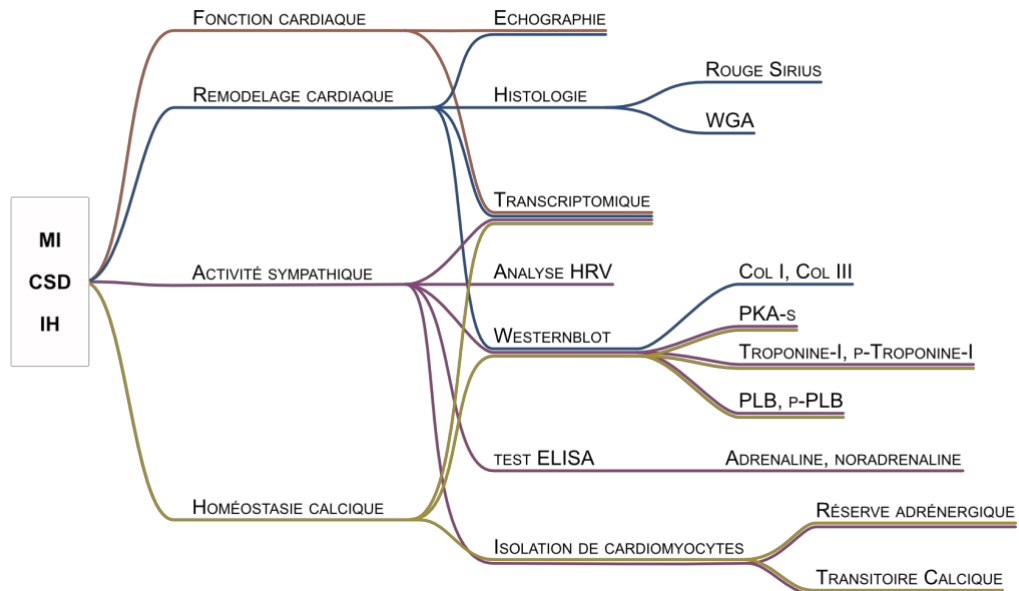


Figure 45 : Design de la deuxième étude.

Trois groupes d'animaux sont exposés à l'hypoxie intermittente ou à la normoxie après avoir subi un infarctus du myocarde et une dénervation sympathique cardiaque. Au cours de cette exposition un suivi échocardiographique est effectué. Après 6 semaines d'exposition une isolation de cardiomyocytes a permis d'étudier l'homéostasie calcique et la réserve adrénergique des cardiomyocytes de ventricule gauche. Après 14 semaines les tissus ont été prélevés rapidement pour effectuer une analyse transcriptomique et analyser l'expression protéique. MI : myocardial infarction ou infarctus du myocarde ; CSD : cardiac sympathetic denervation ou dénervation sympathique cardiaque ; IH : intermittent hypoxia ou hypoxie intermittente ; N : normoxie.

## **2. ANIMAUX**

Dans ce travail, nous avons utilisé des rats Wistar Han mâles de 5 semaines provenant de l'élevage Janvier Labs (Le-Genest-Saint-Isle, France). Ils étaient stabulés dans l'animalerie de notre laboratoire HP2 (numéro d'autorisation : A38 51610006), avec des cycles jour-nuit de 12h/12h, une température de 20-22°C et disposaient de nourriture et d'eau *ad libitum*. Après une semaine de stabulation, ils étaient inclus dans les protocoles chirurgicaux (*cf.* : Protocoles chirurgicaux page 78).

Les études présentées dans ce manuscrit ont été menées conformément aux pratiques recommandées par la convention européenne sur la protection des animaux vertébrés utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques (*conseil de l'Europe, série des traités européens n°123, Strasbourg 18 mars 1986*) et par le guide national des instituts de santé pour la prise en charge et l'utilisation des animaux de laboratoire : *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (NIH Pub.No. 85-23, Revised 1996). Les différents projets ont été approuvés par le comité d'éthique sur l'expérimentation animale de l'université Grenoble Alpes (n° d'autorisations : APAFIS# 695-2015032010109170 et APAFIS# 16577-2018083016099318) et ont obtenu une autorisation du ministère de l'enseignement supérieur, de la recherche et de l'innovation.

## **3. PROTOCOLES CHIRURGICAUX**

### **3.1. Modèle de cardiopathie ischémique par ligature permanente de l'artère coronaire gauche**

Les rats sont profondément anesthésiés (ketamine 100 mg/kg i.p. et xylazine 6 mg/kg i.p.), intubés et ventilés avec un mélange 50% O<sub>2</sub> - 50% air à l'aide d'un respirateur contrôlant la fréquence respiratoire, le volume courant et le CO<sub>2</sub> expiré. Une fois intubé une injection de buprénorphine (0,05mg/kg) est réalisée. L'anesthésie est entretenue avec 0,5-1% d'isoflurane. La température corporelle est maintenue à l'aide d'un coussin chauffant. Une thoracotomie antérieure gauche est réalisée, le péricarde retiré, et l'artère coronaire antérieure gauche est ligaturée de manière permanente à l'aide d'un fil en soie tressé non résorbable (6-0). La cage thoracique est ensuite refermée. A l'aide d'une canule, le vide pleural est restauré afin d'éviter un pneumothorax. Pour finir la plaie est suturée. Les animaux Sham sont soumis aux mêmes procédures chirurgicales exceptée la ligature coronaire. Une fois réveillés les animaux sont placés dans une couveuse avec un mélange 50% O<sub>2</sub> - 50% air, une température de 28°C et une hygrométrie supérieure à 50%. Une échographie 2D est réalisée 3 jours après la ligature afin de



confirmer la présence d'un infarctus, la paroi postérieure du ventricule gauche (VG) doit être akinétique et la fraction d'éjection (FE) du VG inférieure à 50%<sup>273</sup> (cf. : Échographie cardiaque page 82). Les animaux sont ensuite exposés à l'hypoxie intermittente ou à la normoxie (cf. : Exposition à l'hypoxie intermittente page 81). L'exposition des animaux à l'IH est une procédure expérimentale classée modérée. Il a été jugé nécessaire de laisser les animaux récupérer 3 jours après la chirurgie afin de limiter la mortalité.

### 3.2. Dénervation du système nerveux sympathique cardiaque

Préférant garder notre modèle chez le rat, il était compliqué d'utiliser un modèle génétiquement modifié pour inhiber l'activité sympathique. Nos résultats préliminaires et un article de l'équipe montraient, à l'aide de l'analyse de la variabilité de la fréquence cardiaque que l'hypoxie intermittente augmentait le ratio LF/HF majoritairement par une augmentation de la composante sympathique (LF) plutôt que par une diminution de la composante parasympathique (HF)<sup>64</sup>. L'utilisation du modèle de stimulation vagale paraissait alors moins appropriée. Pour finir l'administration de  $\beta$ -bloquants sur des périodes d'expositions longues comme les nôtres (14 semaines) était contraignante.

C'est pourquoi, afin d'inhiber le système nerveux sympathique cardiaque, j'ai mis au point une dénervation sympathique cardiaque spécifique gauche par l'ablation du ganglion stellaire et moyen cervical de la chaîne sympathique gauche (Figure 46).

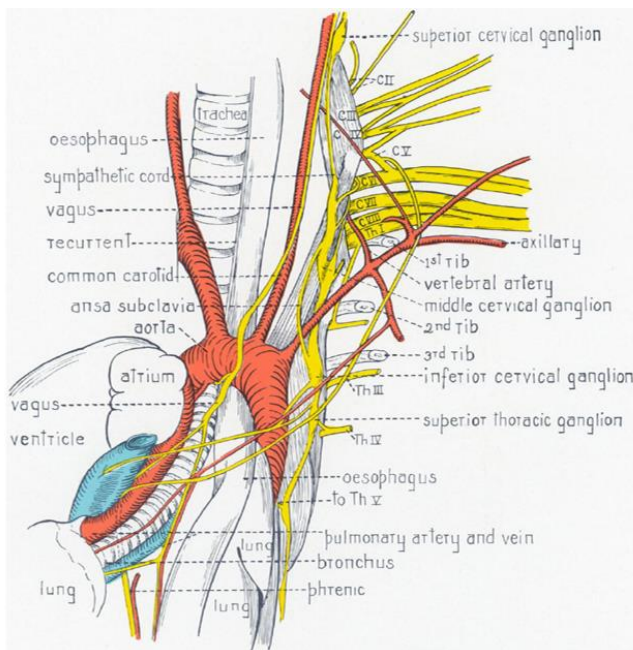


Fig193. Cardiac and Pulmonary Branches of Sympathetic Cord and Vagus

Figure 46. Planche anatomique de rat extraite de « Anatomy of the rat » de Eunice Chace Greene.

Middle cervical ganglion: ganglion moyen cervical; inferior cervical ganglion + superior thoracic ganglion: ganglion stellaire.

Pardini *et al.*, ont montré après une injection d'un traceur rétrograde (Diamidino yellow) dans le ventricule gauche que les ganglions stellaires et moyens cervicaux des chaînes sympathiques droite et gauche sont responsables de 87% de l'innervation du ventricule et 59% en ce qui concerne la chaîne sympathique gauche<sup>217</sup>.

La dénervation sympathique cardiaque (CSD) est réalisée juste avant la ligature de l'artère coronaire gauche. La thoracotomie antérieure gauche est plus importante et plus crâniale que pour le protocole de ligature coronaire simple présenté ci-dessus. Le haut du poumon gauche est déplacé délicatement à l'aide d'une compresse et l'ablation des ganglions est alors réalisée. La compresse est retirée, le poumon remis délicatement en place et la ligature de l'artère coronaire gauche est réalisée (MI-CSD). La suite du protocole est la même que décrite précédemment (*cf.* : Modèle de cardiopathie ischémique page 78). Un groupe Sham est réalisé, la thoracotomie est plus importante, le poumon est lui aussi déplacé à l'aide d'une compresse sans l'ablation des ganglions et s'en suit la ligature (MI). L'activité sympathique cardiaque joue un rôle crucial en post-infarctus du myocarde et la chirurgie étant plus longue que pour une ligature seule, les animaux sont surveillés de manière plus assidue dans la couveuse et certains sont réanimés par massage cardiaque dans les 4-6 heures suivant le réveil.

#### 4. EXPOSITION A L'HYPOXIE INTERMITTENTE

Un dispositif entièrement automatisé a été développé au sein de la plateforme HypE du laboratoire HP2 (<https://hp2.univ-grenoble-alpes.fr/plateforme-hype> Grenoble, France). Ce dispositif permet de reproduire la composante hypoxique des apnées du sommeil chez le rongeur, en induisant des variations de la fraction inspirée en oxygène ( $FiO_2$ ), et donc des épisodes de désaturation-resaturation en oxygène chez les rongeurs (désaturation artérielle en  $O_2$  d'environ 60%). En programmant le temps et le pourcentage d'ouverture d'électrovannes, nous injectons de l'azote qui permet de chasser l' $O_2$  des cages, puis de l'air afin de restaurer la normoxie (N). A l'aide d'un extracteur d'azote et de compresseurs, nous produisons suffisamment de gaz afin d'alimenter simultanément 5 cages hypoxiques et 5 cages normoxiques pour le module rat. Les animaux sont ainsi exposés à l'hypoxie intermittente ou à la normoxie 8 h par jour durant leur période de sommeil. Les cycles d'hypoxie intermittente durent 1 minute alternant 30 secondes d'injection d'azote afin d'atteindre une  $FiO_2$  de 5% puis 30 secondes d'injection d'air afin de rétablir la normoxie ( $FiO_2$  de 21%) (Figure 47). Les cages normoxiques ne sont pas laissées en stabulation mais sont aussi ventilées afin de soumettre les animaux aux mêmes stress que la condition hypoxique sans l'hypoxie (flux d'air intermittent identiques). L'exposition des rats dans le dispositif se déroule de 14h30 à 22h30.



Figure 47. Plateforme HypE.

Elle nous permet d'exposer les rongeurs à l'hypoxie intermittente et à la normoxie. (Adaptée de Dematteis et al. 2009<sup>2</sup>.  $FiO_2$  : fraction inspirée en oxygène.

## 5. ÉCHOGRAPHIE CARDIAQUE

Comme vu précédemment dans le design des études (Figure 44 et Figure 45), plusieurs échographies cardiaques sont réalisées aux cours des différentes études. Pour cette procédure, l'anesthésie des animaux est induite à l'isoflurane 4% (50% O<sub>2</sub> - 50% air) et maintenue à 2-2,5% d'isoflurane. Le pourcentage d'isoflurane est ajusté afin de garder une fréquence cardiaque physiologique (350-400bpm). A l'aide d'une sonde ultra-haute fréquence (MS250 13-24 MHz, VisualSonics), les dimensions du ventricule gauche (VG) sont mesurées après un examen échographique parasternal en M-Mode selon le grand axe du myocarde. Les dimensions diastoliques et systoliques sont calculées à l'aide de l'outil « AutoLV » du logiciel Vevo Lab 3.2.0 (FUJIFILM, VisualSonics, Inc) (Figure 48).

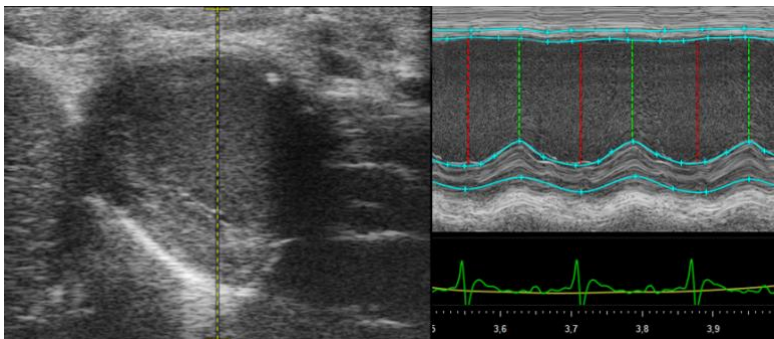


Figure 48. Image extraite du logiciel Vevo Lab (Module « Auto LV »), acquise sur un animal ayant subi un infarctus du myocarde.

## 6. CATHETERISME CARDIAQUE

Les rats sont profondément anesthésiés (ketamine 100 mg/kg i.p. et xylazine 6 mg/kg i.p.), intubés et ventilés avec un mélange 50% O<sub>2</sub> - 50% air et maintenus avec 1% d'isoflurane durant la procédure. Un cathéter à capteurs pression-volume (SPR-869, Millar) est inséré dans la carotide droite pour un enregistrement de la pression artérielle avant l'insertion rétrograde dans le VG afin d'enregistrer les paramètres hémodynamiques systoliques et diastoliques. Les paramètres hémodynamiques renseignent sur la relation entre pressions et volumes intraventriculaires lors des cycles cardiaques et sont représentés sous la forme d'une boucle pression-volume (« Loop » en anglais) (Figure 49). L'enregistrement simultané des pressions et volumes du VG permet entre autres d'évaluer la contractilité cardiaque (ESPVR : End-systolic pressure volume relationship) et la relaxation cardiaque (EDPVR : End-diastolic pressure volume relationship).

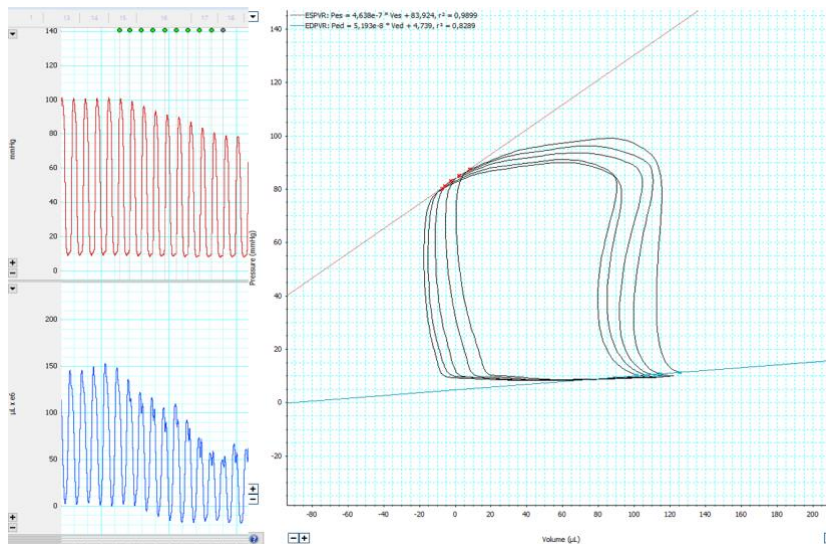


Figure 49. PV Loop extraite du logiciel LabChart Pro v8.1 suite à une pression sur la veine cave inférieure.

La pression intracardiaque est en rouge, le volume en bleu et la PV loop associée est en noire avec le volume en abscisse et la pression en ordonnée. L'EDPVR est la tangente aux PV loops en télédiastolique (bleue). L'ESPVR est la tangente aux PV loops en télésystolique (rouge).

## 7. ISOLATION DE CARDIOMYOCYTES DE VENTRICULE GAUCHE

Les rats sont profondément anesthésiés (ketamine 100 mg/kg i.p. et xylazine 6 mg/kg i.p.), et héparinés (1600 UI/kg i.p.). Une fois endormis un cathéter est placé dans la carotide afin d'obtenir un enregistrement de la pression artérielle de 5 min. Ensuite, une ouverture de la cage thoracique est réalisée, le cœur est rapidement prélevé et placé dans le tampon d'isolation glacé.

Tampon d'isolation :  $\text{KHCO}_3$  : 7 mM ;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  : 1,2 mM ;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  : 1,2 mM ; NaCl : 115 mM ;  $\text{NaHCO}_3$  : 13 mM ; HEPES : 10 mM ; glucose : 10 mM ; taurine : 20 mM.

Le cœur est rincé dans ce tampon puis canulé et perfusé de manière rétrograde par l'aorte. Une fois canulé le cœur est rincé par perfusion avec 50 mL de tampon (3-5 min ; à 37°C ; tampon oxygéné par bullage au carbogène). Ce tampon d'isolation est déplété en calcium ce qui permet de rompre les jonctions intercellulaires au niveau des disques intercalaires. Ensuite, un tampon de digestion est réalisé (50 mL) par ajout de l'enzyme Liberase TM (Roche ; 0,15 UI/mL) au tampon d'isolation. Ce tampon est perfusé et réutilisé au cours de la digestion et permet la dégradation de la matrice extracellulaire. La digestion enzymatique de cardiomyocytes est terminée dès lors que le débit coronaire est augmenté (la matrice extracellulaire est digérée et le tampon ne passe plus par les artères coronaires) et que l'aspect du cœur devient gélatineux (environ 15 min). Une solution « stop » est perfusée (50 mL de tampon d'isolation + 1% de bovine serum albumine (BSA)) afin d'arrêter la digestion enzymatique. Le cœur est décanulé, le ventricule gauche est isolé du reste du cœur. S'en suit

une dissociation mécanique par l'agitation du ventricule à l'aide des pinces dans le tampon stop, puis par une succession d'allers/retours à l'aide d'une pipette en verre. Afin de réussir une digestion de cardiomyocyte il faut trouver le juste milieu entre digestion enzymatique et dissociation mécanique.

Pour enlever les morceaux de tissus moins digérés la suspension est passée sur un filtre de 200  $\mu\text{m}$ . Le calcium est réintroduit petit à petit dans le milieu (remontée calcique) à l'aide d'un pousse seringue jusqu'à atteindre une concentration de 1,36 mM en 30 min. Une fois la remontée calcique terminée, les cardiomyocytes ont sédimenté et sont placés dans du Tyrode jusqu'à leurs utilisations au microscope confocal.

Tyrode : NaCl : 130 mM ; KCl : 5 mM ;  $\text{MgCl}_2+6 \text{H}_2\text{O}$  : 1 mM ;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  : 0,4 mM ;  $\text{CaCl}_2+2 \text{H}_2\text{O}$  : 1,36 mM ; HEPES : 10 mM ; Glucose : 10 mM.

## 8. ACQUISITION DES TRANSITOIRES CALCIQUES

Une fois les cardiomyocytes de ventricules gauches isolés s'en suit l'acquisition des transitoires calciques à la plateforme MicroCell de l'IAB (Institute for Advanced Biosciences, Grenoble) à l'aide du microscope confocal multiparamétrique (LSM710 NLO - LIVE7 - Confocor3).

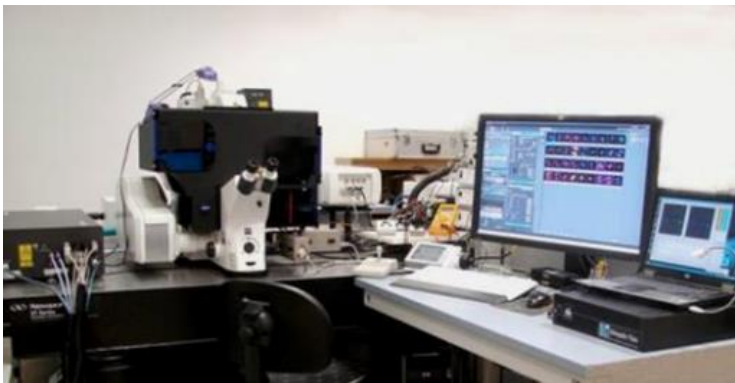


Figure 50. Dynascope de la plateforme MicroCell de l'IAB de Grenoble.

Le couplage excitation contraction mets en jeu de nombreux acteurs cellulaires. Il dépend de la quantité de transporteurs calciques, de leurs états mais aussi de la concentration en calcium de part de d'autres des différents compartiments cellulaires (*cf.* : L'homéostasie calcique page 40). L'étude des transitoires calciques permet d'avoir une image globale du fonctionnement de ce couplage excitation contraction. En effet, l'utilisation de sondes fluorescentes sensibles au calcium permet d'obtenir en temps réel une intensité de fluorescence proportionnelle au calcium cytosolique. Les cardiomyocytes de ventricules gauches ne se contractant pas de manière spontanée sont stimulés électriquement. Ainsi à chaque stimulation les cardiomyocytes se dépolarisent conduisant à une décharge de calcium dans le sarcoplasme.

Le calcium permet la contraction du cardiomyocyte puis son relâchement lorsque le calcium est recapté. Cette augmentation brutale de calcium suivi de cette diminution est appelée transitoire calcique. Le calcium est augmenté de manière transitoire dans le sarcoplasme permettant ainsi la contraction du cardiomyocyte.

Deux sondes fluorescente sensibles au calcium ont été utilisées dans cette étude :

- La sonde Fluo-4 très lumineuse est utilisée pour obtenir des transitoires calciques de bonne résolution temporelle. Cette sonde très sensible permet en absence de stimulation de détecter des fuites localisées de calcium dans le sarcoplasme par l'ouverture spontanée de RyR2 (sparks). L'ouverture de plusieurs RyR2 peut déclencher une vague calcique (wave), associée à une contraction. Cependant cette sonde n'est pas ratiométrique. Une sonde non ratiométrique est excitée par une longueur d'onde et n'émet de la lumière que dans un intervalle de longueur d'onde précis. La valeur de fluorescence obtenue est dépendante de l'intensité du laser, du gain, de la charge en sonde dans le sarcoplasme etc. et n'est pas uniquement liée à la concentration en calcium.
- L'indo-1 est moins lumineuse, nous n'obtenons pas d'aussi beaux transitoires calciques et il est impossible de détecter des sparks. Cependant cette sonde est ratiométrique. Une sonde ratiométrique ne se comporte pas de la même manière lorsqu'elle est liée au calcium ou lorsqu'elle ne l'est pas. Pour une même longueur d'onde d'excitation, la longueur d'onde d'émission est différente en fonction de sa liaison au calcium. Nous obtenons ainsi 2 longueurs d'onde d'émission (liaison au calcium ou non) dont le ratio nous renseigne plus précisément sur la quantité de calcium, et permet d'estimer le calcium systolique et diastolique.

Les 2 sondes nécessitent des protocoles différents (Tableau 2 page 86).

Les cardiomyocytes sont incubés avec la sonde au moins 20 min. Les sondes sont achetées stérifiées pour qu'elles puissent passer la membrane sarcoplasmique. Une fois dans le sarcoplasme les estérases hydrolysent ce groupement et rendent la sonde sensible au calcium. Nous pouvons difficilement dépasser les 2 heures d'expériences à 30°C sinon, particulièrement pour le fluo-4, la sonde s'internalise dans les différents organites de la cellule. Ce temps est réduit si l'enceinte est chauffée à 37°C.

Les cellules sont placées dans la cuve d'électrostimulation au fond de laquelle a été placé 10 µL de matrigel (Corning Matrigel Matrix) pour une meilleure adhésion (Figure 51 page 87). La cuve est rincée au moins 20 min avec du tyrode pour évacuer le surplus de sonde dans le milieu. Les cardiomyocytes de ventricules ne se contractent pas de manière spontanée, ils sont

stimulés à l'aide d'un générateur (Stimulus isolator associé à un PowerLab d'ADInstrument). La cuve est constamment perfusée avec du Tyrode afin d'apporter les électrolytes, le glucose et d'éliminer les métabolites. Cette technique nous permet d'obtenir des transitoires calciques et le raccourcissement des sarcomères en temps réel. Je ne disposais pas d'un dispositif optimisé pour l'acquisition des transitoires calciques comme le bien connu IonOptix. Les images acquises sont analysées à posteriori à l'aide de plugin ImageJ développés par l'équipe STIM de Tours (Figure 52 page 87). Ces plugins sont très précis mais requièrent un temps d'analyse beaucoup plus long qu'avec les solutions tout en un.

Pour évaluer la réserve adrénérgique des cardiomyocytes, après une acquisition à l'état basale, nous avons stimulé les cardiomyocytes en perfusant la cuve avec de l'isoproterenol (100 nM) un agoniste  $\beta$ -adrénérgique.

	Fluo-4	Indo-1
Incubation de la sonde	30 min dont 5-10 min d'adhésion au matrigel dans la cuve (5 $\mu$ M)	
Rinçage de la cuve	20 min	
Température de la chambre	30°C	
Objectif	Plan-Apochromat 63x/1,4 Oil	
Excitation	488 nm	700 nm bi-photonique équivalent à 350 nm
Détection (Émission)	490-600 nm	Non liée au $Ca^{2+}$ / Liée au $Ca^{2+}$ 370-420 nm / 460-525 nm
Acquisition image	Line scan 1,8909 ms par ligne soit plus de 500 images par seconde	
Stimulation des cardio	80 mA ; 2 ms ; 1 Hz	
Protocole de stimulation	Stimulation 15 s ; pause 45 s (waves) ; stimulation 15 s	Stimulation 15 s
Stimulation pharmacologique	Après acquisition basal, stimulation à l'isoproterenol (100 nM)	/

Tableau 2. Caractéristiques des protocoles utilisés pour les 2 sondes fluorescentes Fluo-4 et Indo-1 lors de l'acquisition des transitoires calciques.



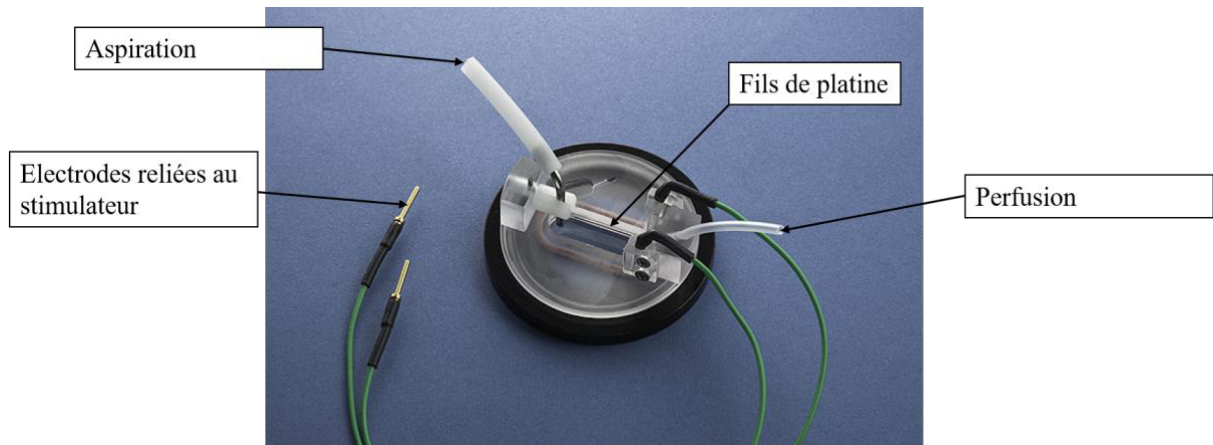


Figure 51. Cuve d'électrostimulation pour l'acquisition de transitoire calcique de cardiomyocytes de ventricule gauche.

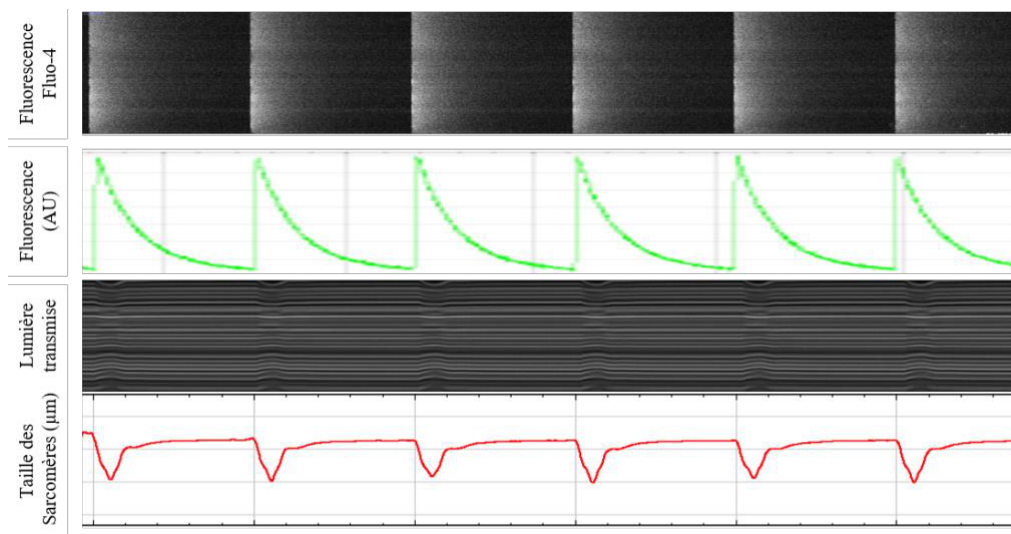


Figure 52. Images acquises en « line scan » au microscope confocale à l'aide du fluo-4 et de la lumière transmise.

Sous chaque image nous avons les courbes extraites à l'aide des plugins développés par l'équipe STIM (SarConfoCal) qui permettent d'extraire des informations quantitatives des transitoires calciques.

## 9. ACQUISITION ECG IN-VIVO

Une collaboration avec l'entreprise Etisense nous a permis d'acquérir des ECG vigiles sur nos rats à l'aide de DECRO, un gilet connecté (Figure 53 page 88). Il était intéressant pour nous d'obtenir un ECG vigile associé à une actimétrie afin de sélectionner les parties de l'ECG où l'animal est le plus calme pour ensuite mesurer l'activité du système nerveux sympathique par le biais d'une analyse de la variabilité de la fréquence cardiaque. L'acquisition d'un ECG vigile permet aussi de s'affranchir de la dépression cardiorespiratoire causée par l'anesthésie des animaux.

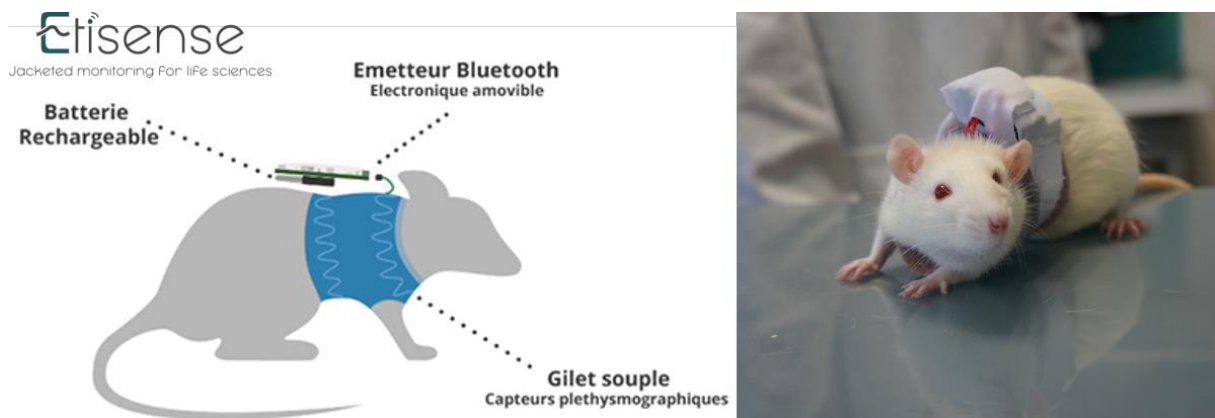


Figure 53. DECRO gilet connecté développé par Etisense.

Il nous a permis dans cette étude d'obtenir un ECG et une actimétrie chez le rat vigile.

Concrètement, nous enfilons un gilet au rat sous lequel sont posés des électrodes pédiatriques (sur peau rasée). Les électrodes sont branchées à un émetteur Bluetooth glissé dans un sac à dos. Ce dispositif nous permet en temps réel de vérifier la qualité du signal en fonction du positionnement des électrodes. Le rat est ensuite remis dans une cage, isolé de ses congénères. Après 15 min de latence l'enregistrement se lance pour 1 heure. Les ECG sont enregistrés le matin à distance de l'exposition et l'après-midi pendant l'exposition.

## 10. ACTIVITE DU SYSTEME NERVEUX SYMPATHIQUE

Nous avons évalué l'activité sympathique cardiaque par l'analyse de la variabilité de la fréquence cardiaque et l'activité sympathique systémique par un dosage des catécholamines plasmatique et par l'analyse histologique des glandes surrénales (partie histologie, page 93).

### **10.1. Analyse de la variabilité de la fréquence cardiaque**

La variabilité de la fréquence cardiaque est évaluée chez l'Homme dans des conditions les plus calmes et reposantes possibles, en position assise, lumière tamisée, parfois même avec de la musique relaxante. Le tracé analysé doit être de 5 min puisqu'il est recommandé d'avoir 10 fois la plus petite longueur d'onde du spectre analysé. Chez l'homme la plus petite longueur des basses fréquences est de 0,04 Hz, soit environ 4 min minimum ( $\frac{1}{0.04} * 10 = 250$  □□)<sup>274</sup>. Sur nos animaux anesthésiés les enregistrements sont d'environ 5 min, mais l'analyse est faite sur les 2 min les plus stables en fréquence cardiaque. En effet, deux minutes suffisent chez le rongeur puisque la fréquence cardiaque et les fréquences des domaines mesurés sont plus élevées (0,2 Hz au minimum soit 50 s). En ce qui concerne les animaux vigiles les 2 min sont sélectionnées sur un enregistrement d'une heure et la stabilité est évaluée sur la fréquence cardiaque et l'actimétrie.

L'analyse est faite sur le logiciel LabChart avec le plugin HRV (*Heart rate variability*). L'analyse consiste à détecter les intervalles RR, les ranger les uns derrière les autres et à l'aide d'une transformée de Fourier, nous obtenons un spectre de fréquence. Les basses fréquences (low frequency LF) sont représentatives de l'activité sympathique et les hautes fréquences (high frequency HF) de l'activité sympathique et parasympathique. Le ratio LF/HF est représentatif de la balance sympatho-vagale au niveau cardiaque.<sup>274</sup> Chez le rat les LF sont comprises entre 0,20 et 0,75 Hz, les HF entre 0,75 et 2,5 Hz<sup>275</sup>.

### **10.2. Test ELISA des catécholamines plasmatiques**

Suite à une stimulation du système nerveux sympathique les glandes surrénales sécrètent des catécholamines qui se retrouvent dans la circulation générale. Nous avons mesuré les catécholamines plasmatiques avec un test ELISA (CatCombi IBL International) à partir de sang prélevé en veine cave inférieure sur tube EDTA avec ajout d'antioxydant pour limiter la dégradation des catécholamines (sodium metabisulfite concentration finale 4 mM). Le sang à été centrifugé 10 min à 4000 rpm, les plasmas ont été récupérés et congelés dans l'azote liquide et conservés à -80°C jusqu'à la réalisation du kit ELISA.

## 11. WESTERN BLOT

Lors du prélèvement, les organes sont rapidement prélevés. Pour le cœur les ventricules droit et gauche sont séparés, coupés en petit morceau sur glace, puis congelés dans l'azote liquide et conservés à -80°C. Pour l'extraction protéique les tissus congelés sont lysés au Precellys (6500 rpm, 3 x 5 s, 5 s de pause) dans un tampon de lyse (Tris-HCl pH 6,8 : 0,5 M ; NaCl : 0,5 M ; Glycerol : 20% ; NP40 : 1% ; SDS : 0,1% ;  $\beta$ -mercaptoethanol : 1% ; PMSF : 0,5 mM ; Proteases Inhibitor : 1x ; TSA : 0,33  $\mu$ M ; Nicotinamide : 10 mM ; NaF : 20 mM ; Na<sub>2</sub>VO<sub>3</sub> : 10 mM). La concentration protéique est déterminée par la méthode de Bradford. Les protéines sont déposées sur un gel de polyacrylamide (15 à 30  $\mu$ g de protéine ; 6 à 15% d'acrylamide), séparées par électrophorèse puis transférées sur une membrane PVDF ou nitrocellulose par transfert semi sec de haute performance (Trans-Blot turbo, BioRad). Les membranes nitrocelluloses sont utilisées pour obtenir des ponceaux de meilleurs qualités (témoins de la quantité et de la qualité de protéines transférées sur la membrane). Les membranes sont saturées par de la BSA (Bovine serum albumine) ou des protéines de lait. Des anticorps primaires spécifiques, sont ensuite utilisés pour détecter les protéines d'intérêts (cf. : Tableau 3). Un anticorps secondaire couplé à une peroxydase (HRP) dirigé contre l'anticorps primaire est incubé. Un substrat chimio-luminescent tel que l'ECL (*enhanced chemiluminescent*) réagit avec l'anticorps secondaire couplé à la HRP et produit de la lumière détectée par l'imageur ChemiDoc XRS+ (Biorad). Les images obtenues sont analysées par densitométrie à l'aide d'ImageJ. Le résultat est normalisé par rapport à l'expression de la protéine témoin de charge (tubuline, calséquestrine ou encore TBP pour les fractions nucléaire) et permet de déterminer la quantité relative de la protéine dans chaque condition. Les formes phosphorylées sont exprimées en ratio de la forme totale de la protéine.

Anticorps primaires	Références	Fournisseurs
ATF-4 (D4B8)	11815S	Cell signaling (Ozyme)
Calsequestrin	PA1-913	Thermo fischer
CaMKII	sc-5306	Santa Cruz
Caspase 12	sc-5627	Santa Cruz
Caspase 3 (8G10)	9665	Cell signaling (Ozyme)
Caspase 3 (Asp175) clivée	9661	Cell signaling (Ozyme)
CHOP (L63F7)	2895T	Cell signaling (Ozyme)
Col I	ab34710	Abcam

Col III	ab7778	Abcam
GRK2	sc-13143	Santa Cruz
GRP78	sc-1050	Santa Cruz
HIF1 $\alpha$	mab50046	Covalab
MMP-9	ab76003	Abcam
NGF	sc-365944	Santa Cruz
p-phospholamban (Ser 16)	sc-12963	Santa Cruz
p-phospholamban (Thr 17)	sc-17024-R	Santa Cruz
phospho (ser/thr) PKA	9621	Cell signaling (Ozyme)
phospho-CaMKII alpha (Thr286)	MA1-047	Thermo Fisher Scientific
phospho-troponin I (Ser23/24)	4004	Cell signaling (Ozyme)
Phospholamban (F-7)	sc-393990	Santa Cruz
TBP (1TBP18)	ab818	Abcam
Troponin I	4002	Cell signaling (Ozyme)
Tubulin alpha	sc-5286	Santa Cruz
Tyrosine hydroxylase	ab152	Merck Millipore

Tableau 3. Liste des anticorps primaires utilisés.

## 12. RT qPCR

La RT-qPCR permet de faire une PCR (réaction en chaîne par polymérase) quantitative et en temps réel à partir d'un échantillon d'ARN. Les tissus congelés sont lysés dans du Trisol (TRIzol Reagent, Invitrogen) à l'aide du Precellys. L'extraction au Trisol permet d'extraire les ARN. Après un dosage au nanodrop qui permet de contrôler la concentration et la qualité des échantillons, 1  $\mu$ g d'ARN total est rétrotranscrit (RT). L'ADN polymérase ARN dépendante ou transcriptase inverse (iScript, Biorad) permet d'obtenir de l'ADN complémentaire (ADNc) à partir d'ARN, l'ADNc étant beaucoup plus stable que l'ARN.

A l'aide d'un couple d'amorce spécifique, d'une ADN polymérase ADN dépendante et d'un marqueur fluorescent qui se fixe sur l'ADN double brin (SYBR Green), nous allons pouvoir amplifier et quantifier le gène d'intérêt à chaque cycle d'amplifications. Plusieurs cycles d'amplifications sont nécessaires afin de détecter les amplicons et de comparer à l'aide de la technique du  $2\Delta Ct$  la quantité d'amplicons dans les différents échantillons. De la même manière que pour le western blot, des gènes de références sont utilisés pour normaliser les

résultats. RefFinder (<https://www.heartcure.com.au/reffinder>) est utilisé afin de choisir les gènes de référence les plus stables<sup>276</sup>. Les couples d'amorces utilisés sont listés dans le tableau ci-dessous (cf. : Tableau 4).

Gène	Protéine	Forward 5'-3'	Reverse 3'-5'
Acta1	Skeletal alpha actin	GGCTCCCAGCACCATGAAGA	CAGCACGATTGTCGATTGTCG
Actine	Beta actin	GGGTATGGAATCCTGTGGCATCC	GCTCAGGAGGAGCAATGATCTTGA
Adrb1	Récepteur β1 adrénergique	GCTGCGATTTTCGTACCAAC	GTACACGAAGGCCATGATG
Adrb2	Récepteur β2 adrénergique	ACGACATCACTCAGGAACGG	TAGATCAGCACACGCCAAGG
Adrb3	Récepteur β3 adrénergique	GTCTTCTGTGCAGCTACGGT	TTCTCCAGAAGTCAGGCTCCTT
ARRB1	Arrestin β1	ACAAAAGGAATTCTGTGCGGC	TTGACGCTGATGGGTTCTCC
Col1A1	Collagen I	GCGAAGGCAACAGTCGATTC	CCCAAGTTCCGGTGTGACTC
Col3A1	Collagen III	CAGCTGGCCTTCCTCAGACTT	GCTGTTTTTGCACTGGTATGTAATG
Ctgf	Connective tissue growth factor	TGACCTGGAGGAAAACATTAAGA	AGCCCTGTATGTCTTCACACTG
Cyca	Cyclin A	TATCTGCACTGCCAAGACTGAGTG	CTTCTTGCTGGTCTTGCCATTCC
GRK2	G-protein-coupled receptor kinase 2	CCCTCTACCATCTCTGAGCA	CGGTTGGGGAACAAGTAGAA
HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase1	GGGGGACATAAAAGTTATTGGTGA	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCTTG
Myh7	Myosin heavy chain beta	TTGCTTACCCAACCCTAAGGATG	TTGTGTTTCTGCCTGAAGGTGC
Nppa	Natriuretic peptide A	AGGCCATATTGGAGCAAATC	CTCCTCCAGGTGGTCTAGCA
Nppb	Natriuretic peptide B	GCTCTCAAAGGACCAAGGC	AACAACCTCAGCCCCTCAC
Rplp0	Ribosomal protein large P0	CCCTGCACTCTCGCTTTCTGGA	AGGGGCAGCAGCCGCAAATG
TGFB1	Transforming growth factor beta 1	GCTGCTGACCCCACTGAT	GCCACTGCCGGACAACCTC
VEGFa	Vascular Endothelial Growth Factor A	CTTCAAGCCATCCTGTGTGC	TTGCTCTATCTTTCTTTGGTCTGC

Tableau 4. Liste des couples d'amorces utilisés.

### 13. HISTOLOGIE

Pour les animaux dont les cœurs sont dédiés à l'histologie, une injection intracardiaque de KCl (100 mM) est réalisée afin d'arrêter le cycle cardiaque en diastole. Après le prélèvement, les organes sont plongés dans le PFA 4% (paraformaldéhyde) afin d'être fixés 24h. Pour une fixation rapide et homogène, les cœurs sont perfusés par l'aorte avec de le PFA 4% ce qui permet une diffusion par les artères coronaires, puis ils sont plongés dans le PFA 4% pendant 24h. Les échantillons sont ensuite placés dans l'éthanol 70%. Après la fixation il faut inclure

les échantillons dans la paraffine. La paraffine étant hydrophobe les échantillons sont préalablement déshydratés. La déshydratation est une succession de bains de solvants organiques d'une heure : Ethanol 80%, Ethanol 95%, Ethanol 100% 3 fois, Xylène, 2 fois, paraffine. Une fois inclus dans des blocs de paraffine dans l'orientation souhaitée, les échantillons sont coupés à une épaisseur de 5  $\mu\text{m}$  à l'aide d'un microtome (RM2255 Leica, Plateforme de l'unité médico technique universitaire de cytologie histologie de Grenoble, et prestation sur la plateforme CIQLE (Centre d'Imagerie Quantitative Lyon-Est)). Les lames ainsi réalisées peuvent être utilisées pour différents marquages. En ce qui concerne l'acquisition post-marquage, l'essentiel des images de nos lames a été réalisé par un scanner de lames (axio scan Z1 Zeiss de la plateforme d'imagerie PIC-GIN de Grenoble).

### **13.1. Hématoxyline éosine (glandes surrénales)**

Les glandes surrénales sont des glandes endocrines divisées en 2 zones, une zone périphérique (le cortex) et une zone centrale (la médulla). La médulla est le lieu de sécrétion des catécholamines (adrénaline, noradrénaline). Une stimulation sympathique importante et chronique conduit à une hypertrophie des cellules chromaffines qui composent la médulla<sup>277</sup>. Les marquages des lames se font majoritairement en milieu aqueux, il faut passer par une étape de réhydratation des lames (bain successif de 1 min : Xylène (2x), éthanol (2x) 100%, 95%, 70%, eau). Une fois les lames réhydratées elles sont baignées dans l'hématoxyline 15 min, rincées à l'eau, puis baignées à nouveau quelques secondes dans l'éosine. Dans un souci de conservation, une fois la coloration réalisée, les lames sont à nouveau déshydratées (éthanol 70%, 95%, 100% 2 fois et xylène 2 fois) puis protégées entre lame et lamelle avec du PERTEX. Les coupes de glandes surrénales sont colorées à l'hématoxyline éosine, l'hématoxyline apparaît violette et se fixe principalement dans le noyau. L'éosine colore le cytoplasme en rose. La surface du cortex et de la médulla de la glande surrénale sont quantifiées sur ImageJ.

### **13.2. Rouge Sirius**

Le marquage ou rouge Sirius permet de mettre en évidence la fibrose, le collagène est coloré en rouge, le reste du cœur devient jaunâtre. Comme pour le marquage hématoxyline éosine les lames sont réhydratées, colorées puis déshydratées. En ce qui concerne la coloration, les cœurs sont colorés pendant 1 h au rouge Sirius (0,1% de rouge Sirius dans de l'acide picrique saturé) et rincées 2 fois dans une solution d'acide acétique 0,5%. Ce qui nous intéresse dans la progression de la cardiopathie ischémique c'est la fibrose interstitielle dans le ventricule

gauche. Au moins une vingtaine d'images sont extraites à partir de l'image cœur entier. Ces images sont sélectionnées dans le ventricule gauche à distance de la zone infarctée et où les cardiomyocytes sont organisés en position transversale. Nos coupes de cœur étant transverses, cette zone se situe entre l'épicarde et l'endocarde. Cette sélection d'images nous permet d'éviter les endroits potentiellement abimés de la lame mais aussi d'éviter les gros vaisseaux afin de ne quantifier que la fibrose interstitielle et non la fibrose vasculaire. Ces images sont quantifiées à l'aide d'un plugin ImageJ développé par Jacques Brocard sur la plateforme PIC-GIN de Grenoble.

### 13.3. WGA

Le WGA pour « *Wheat germ agglutinin* » (Oregon Green 488 conjugate, Molecular Probes) est une lectine utilisée pour marquer les membranes plasmiques. Son utilisation est simple, une incubation d'une heure (dilution au 100<sup>e</sup>), suivie de rinçages, pour une acquisition de la fluorescence en microscopie confocale. Ce marquage est utilisé pour déterminer la surface et le diamètre minimum de feret des cardiomyocytes, afin d'évaluer s'ils sont hypertrophiés. L'analyse d'image est fastidieuse, il faut détourer chaque cardiomyocyte à la main sur ImageJ. C'est pourquoi Dr. A. Fertin du laboratoire TIMC-IMAG de Grenoble a développé un plugin ImageJ « *Stochastic watershed* » qui nous permet en un clic de sélectionner la membrane d'un cardiomyocyte. Cette analyse semi-automatique est beaucoup plus rapide et a été validée par comparaison avec la méthode manuelle.

### 13.4. TUNEL

L'apoptose est déterminée par une analyse de la fragmentation de l'ADN en histologie avec la technique du TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase-Mediated dUTP Nick End-Labeling*) en suivant les instructions du fabricant (Abcam, Cambridge, United Kingdom). A l'axio scan l'acquisition de la fluorescence est faite avec un grossissement x20, la coloration du TUNEL est en rouge, les noyaux sont marqués au Dapi et apparaissent en bleu. Une dizaine d'images est analysées par animal, l'apoptose est quantifiée comme étant le pourcentage de surface positive (fluorescence rouge) sur la surface totale de tissu. Le marquage rouge étant une fragmentation de l'ADN il doit co-localiser avec le marquage bleu du noyau.



## 14. ANALYSE TRANSCRIPTOMIQUE

L'analyse transcriptomique a été réalisée à partir d'ARN extrait comme pour la RT-qPCR avec une extraction au Trizol (page 91). A partir de la médiane de la fraction d'éjection, 5 animaux par groupe ont été sélectionnés pour le séquençage. Le séquençage des échantillons a été réalisé par la plateforme de Montpellier GenomiX (MGX) à l'aide du séquenceur NovaSeq 6000 d'Illumina. L'alignement des données de séquençage et le comptage ont été réalisés par notre collaborateur Florent Chuffart du laboratoire IAB de Grenoble et nous ont permis d'obtenir les fichiers de comptage de chaque ARN pour chaque individu. Au total 17 338 ARN différents ont été détectés. Le seuil de significativité a été placé à 0,05 en supprimant également les gènes où le comptage de transcrit était de zéro sur certains animaux. Les bases de données de DAVID (*The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* 6.8) ont été utilisées afin de classer les gènes en processus biologiques et de déterminer les familles de gènes dérégulés dans nos différents groupes.

## 15. STATISTIQUES

Dans la première étude, les statistiques ont été faites avec le logiciel GraphPad Prism. Pour la suite j'ai utilisé l'environnement R par le biais de RStudio. Avant chaque test statistique, un test de Shapiro-Wilk et de Bartlett permettent de vérifier la normalité de la distribution et l'homoscédasticité des variances respectivement. Si ces conditions sont respectées alors les tests statistiques utilisés sont paramétriques, sinon ils sont non paramétriques.

Au cours de ma thèse j'ai écrit un code sur R/Knitr qui permet d'interroger mes différents tableurs de données, d'effectuer le plan statistique décrit ci-dessus, de créer les figures associées et d'exporter le tout dans un compte rendu en .HTML (Exportation des résultats de l'analyse statistique sur Rstudio page 201).

# RESULTATS

# **1. L'HYPOXIE INTERMITTENTE PRECIPITE LE REMODELAGE CARDIAQUE ET LA DYSFONCTION CONTRACTILE DANS UN MODELE DE CARDIOPATHIE ISCHEMIQUE CHEZ LE RAT**

Dans cette première étude nous avons développé un modèle de cardiopathie ischémique chez le rat Wistar mâle pour ensuite exposer ces animaux à l'hypoxie intermittente.

L'objectif était d'évaluer si l'hypoxie intermittente aggravait la cardiopathie ischémique.

Etant donnée qu'une exposition à l'hypoxie intermittente augmente la sensibilité du myocarde à l'ischémie reperfusion nous n'avons pas exposé les animaux avant la ligature de l'artère coronaire gauche<sup>68,69,258</sup>. En effet, il est important d'obtenir des infarctus initiaux les plus homogènes possible afin de pouvoir comparer le remodelage et la fonction par la suite<sup>278</sup>.

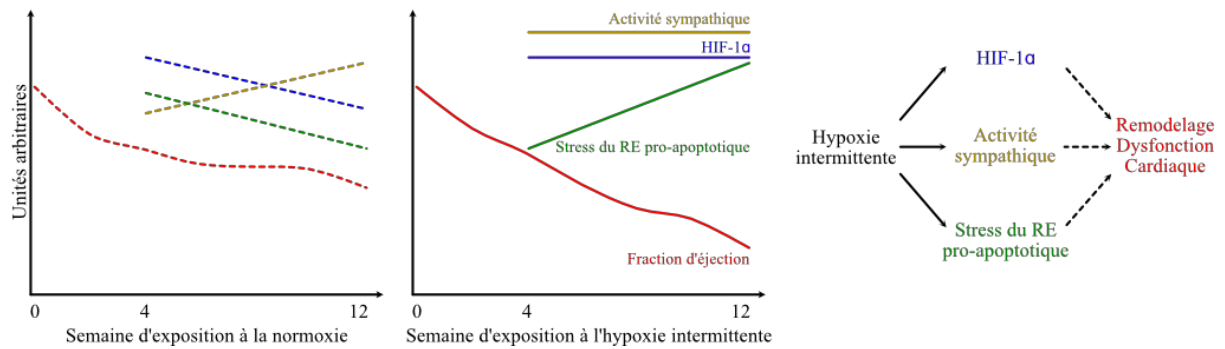
Les animaux ont été ensuite exposés à l'hypoxie intermittente 4 et 12 semaines afin d'étudier la cinétique du remodelage et de la fonction cardiaque au cours de la cardiopathie.

La fonction cardiaque et le remodelage ont été évalués à l'aide d'un suivi échocardiographique, d'un cathétérisme cardiaque et d'une analyse histologique du ventricule gauche avec un marquage au rouge Sirius pour la fibrose, un marquage au WGA pour l'hypertrophie des cardiomyocytes et un TUNEL pour l'apoptose.

Au niveau mécanistique nous nous sommes particulièrement intéressés à l'activité sympathique, à l'expression nucléaire d'HIF-1 $\alpha$  et au stress du réticulum endoplasmique pro-apoptotique qui sont connus d'une part pour être augmentés en condition d'hypoxie intermittente, contribuer à la taille de l'infarctus du myocarde, à la dysfonction ventriculaire et à l'apoptose<sup>69,271,272,279</sup> et d'autre part pour participer à l'aggravation de la cardiopathie ischémique.

L'activité sympathique a été évaluée par une analyse de la variabilité de la pression artérielle, l'expression de HIF-1 $\alpha$  et le stress du réticulum pro-apoptotique par western-blot.

Cette étude a permis de mettre en évidence que l'hypoxie intermittente précipite le remodelage cardiaque et la dysfonction contractile. L'activité sympathique est augmentée rapidement et de manière persistante tout au long de la cinétique, associée à une augmentation soutenue de l'expression nucléaire de HIF-1 $\alpha$  et un stress du réticulum endoplasmique pro-apoptotique qui apparaît plus tardivement (Figure 54).



ORIGINAL RESEARCH

# Intermittent Hypoxia Triggers Early Cardiac Remodeling and Contractile Dysfunction in the Time–Course of Ischemic Cardiomyopathy in Rats

Guillaume Bourdier, PhD\*<sup>1</sup>; Maximin Détrait <sup>1</sup>, MSc\*<sup>1</sup>; Sophie Bouyon, MSc; Emeline Lemarié, MSc; Sandrine Basseur, BSc; Stéphane Doutreleau <sup>1</sup>, MD, PhD; Jean–Louis Pépin, MD, PhD; Diane Godin–Ribuot, PhD; Elise Belaidi, PhD<sup>†</sup>; Claire Arnaud <sup>1</sup>, PharmD, PhD<sup>†</sup>

**BACKGROUND:** Sleep–disordered breathing is associated with a poor prognosis (mortality) in patients with ischemic cardiomyopathy. The understanding of mechanisms linking intermittent hypoxia (IH), the key feature of sleep–disordered breathing, to ischemic cardiomyopathy progression is crucial for identifying specific actionable therapeutic targets. The aims of the present study were (1) to evaluate the impact of IH on the time course evolution of cardiac remodeling and contractile dysfunction in a rat model of ischemic cardiomyopathy; and (2) to determine the impact of IH on sympathetic activity, hypoxia inducible factor–1 activation, and endoplasmic reticulum stress in the time course of ischemic cardiomyopathy progression.

**METHODS AND RESULTS:** Ischemic cardiomyopathy was induced by a permanent ligation of the left coronary artery in male Wistar rats (rats with myocardial infarction). Rats with myocardial infarction were then exposed to either IH or normoxia for up to 12 weeks. Cardiac remodeling and function were analyzed by Sirius red and wheat germ agglutinin staining, ultrasonography, and cardiac catheterization. Sympathetic activity was evaluated by spectral analysis of blood pressure variability. Hypoxia–inducible factor–1 $\alpha$  activation and burden of endoplasmic reticulum stress were characterized by Western blots. Long–term IH exposure precipitated cardiac remodeling (hypertrophy and interstitial fibrosis) and contractile dysfunction during the time course evolution of ischemic cardiomyopathy in rodents. Among associated mechanisms, we identified the early occurrence and persistence of sympathetic activation, associated with sustained hypoxia–inducible factor–1 $\alpha$  expression and a delayed pro–apoptotic endoplasmic reticulum stress.

**CONCLUSIONS:** Our data provide the demonstration of the deleterious impact of IH on post–myocardial infarction remodeling and contractile dysfunction. Further studies are needed to evaluate whether targeting sympathetic nervous system or HIF–1 overactivities could limit these effects and improve management of coexisting ischemic cardiomyopathy and sleep–disordered breathing.

**Key Words:** ER stress ■ hypoxia inducible factor–1 ■ intermittent hypoxia ■ ischemic cardiomyopathy ■ sleep–disordered breathing ■ sympathetic activation

Coronary artery disease, and especially acute coronary syndrome (ACS), is the leading cause of death in industrialized countries and develops

because of complex interactions between multiple risk factors and comorbidities.<sup>1</sup> ACS is defined as unstable angina, non–ST–segment elevation myocardial

Correspondence to: Claire Arnaud, PharmD, PhD, Laboratoire HP2, Université Grenoble Alpes, INSERM U1042, Place du Commandant Nal, Faculté de Médecine de Grenoble, 38700 La Tronche, France. E–mail: claire.arnaud@univ-grenoble-alpes.fr

\*Dr Bourdier and Mr Détrait are co–first authors.

<sup>†</sup>Dr Belaidi and Dr Arnaud are co–senior authors.

For Sources of Funding and Disclosures, see page 12.

© 2020 The Authors. Published on behalf of the American Heart Association, Inc., by Wiley. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution–NonCommercial–NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non–commercial and no modifications or adaptations are made.

JAHA is available at: [www.ahajournals.org/journal/jaha](http://www.ahajournals.org/journal/jaha)

## CLINICAL PERSPECTIVE

### What Is New?

- Long-term exposure to intermittent hypoxia precipitates cardiac remodeling (hypertrophy and interstitial fibrosis) and contractile dysfunction during the time course evolution of ischemic cardiomyopathy in rodents.
- We identified early occurrence of sustained sympathetic activation, sustained hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  expression, and delayed pro-apoptotic endoplasmic reticulum stress following intermittent hypoxia exposure.

### What Are the Clinical Implications?

- This study describes different steps of cardiac function deterioration after myocardial infarction and associated mechanisms induced by intermittent hypoxia, the hallmark feature of sleep-disordered breathing.
- Further studies are needed to evaluate whether targeting intermittent hypoxia-induced sympathetic nervous system, hypoxia-inducible factor-1 overactivity could limit these effects and improve management of co-existing ischemic cardiomyopathy and sleep-disordered breathing.

## Nonstandard Abbreviations and Acronyms

ACS	acute coronary syndrome
CPAP	continuous positive airway pressure
ER	endoplasmic reticulum
HIF	hypoxia-inducible factor
IH	intermittent hypoxia
LV	left ventricle
MI	myocardial infarction
N	normoxia
SDB	sleep-disordered breathing
SNS	sympathetic nervous system

infarction and ST-segment-elevation myocardial infarction<sup>2</sup> and contributes to heart failure progression.<sup>3</sup> Sleep-disordered breathing (SDB) is recognized as an independent cardiovascular risk factor,<sup>4</sup> is highly prevalent (up to 60%) in patients with ACS,<sup>5</sup> and is associated with a higher rate of death in heart failure.<sup>6</sup> In the early phase after myocardial infarction (MI), SDB promotes infarct expansion, reduces myocardial salvage, and impairs ventricular remodeling.<sup>7</sup> In addition, in a cohort of patients hospitalized for ACS, SDB is associated with higher peak troponin levels in plasma,

increased number of diseased vessels, and duration of hospitalization period.<sup>8</sup> The understanding of mechanisms linking intermittent hypoxia (IH), the key feature of SDB, to ischemic cardiomyopathy progression is crucial for identifying specific actionable therapeutic targets.

IH has been identified as the key mediator for deleterious cardiovascular impact of SDB.<sup>9</sup> In rodent models, IH induces an increase in infarct size in response to acute myocardial ischemia-reperfusion.<sup>10-12</sup> However, the role of IH in the long-term progression of chronic ischemic cardiomyopathy remains to be established. Studies in rodents emphasized that IH triggers a chronic and sustained sympathetic nervous system (SNS) activity,<sup>12-14</sup> increases hypoxia-inducible factor (HIF)-1 activity, and enhances myocardial pro-apoptotic endoplasmic reticulum (ER) stress<sup>11,15-17</sup>. Individually, all these mechanisms have been demonstrated to be closely related to the IH-induced increase in infarct size,<sup>11,12</sup> cardiomyocytes apoptosis, and left ventricular (LV) dysfunction.<sup>12,15,16,18</sup> These IH-induced pathogenic mechanisms may also play an aggravating role in the progression of chronic ischemic cardiomyopathy.

The originality of the current study was to use a long-term time course experimental design to (1) evaluate the impact of IH on cardiac remodeling and contractile dysfunction in a rat model of chronic ischemic cardiomyopathy; and (2) to determine the impact of IH on sympathetic activity, HIF-1 activation, and ER stress in the time course of ischemic cardiomyopathy progression.

## METHODS

The data, methods used in the analysis, and materials used to conduct the study are available from the corresponding author upon reasonable request.

### Study Population

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

## Myocardial Infarction

Six-week-old rats were anesthetized (ketamine (100 mg/kg ip; Imalgene 1000, Merial, France) and xylazine (4 mg/kg ip; Rompun, Bayer, Germany), intubated, and ventilated in a 50% O<sub>2</sub>–50% air mixture on a volume control ventilator (Rovent; Kent Scientific, Torrington, Connecticut). Anesthesia was maintained with 0.5% isoflurane (Isoflo; Axience, Pantin, France) in a 50% O<sub>2</sub>–50% air mixture during the procedure. Respiratory rate, tidal volume (Kent Scientific), and expired CO<sub>2</sub> (Capnoscan, Kent Scientific) were monitored. Rat temperature was regulated using a rectal probe connected to a heating pad. Following a left thoracotomy, the pericardium was dissected, and the left anterior coronary artery was ligated using a nonabsorbable braided silk suture (sofsilk 6-0; Covidien, Boulogne-Billancourt, France). The rib cage was closed and the wound sutured (polysorb 4-0, Covidien). Sham-operated rats were subjected to the same surgical procedure except for the coronary artery ligation. All animals were given 0.03 mg/kg buprenorphine (Buprécare; Axience) subcutaneously immediately after surgery.

Echocardiography (2D and M-mode) was performed 3 days after surgery to exclude animals with small infarcts and limited reduction of LV ejection fraction (>45%) according to the procedure described by Litwin et al.<sup>19</sup> Regarding the 75 rats operated on, all the sham rats survived, 9 rats with MI died (11%) during the first 24 hours, and 10 (12%) were excluded for left ventricular ejection fraction >45% (Figure 1). The infarcted rats were matched according to their left ventricular

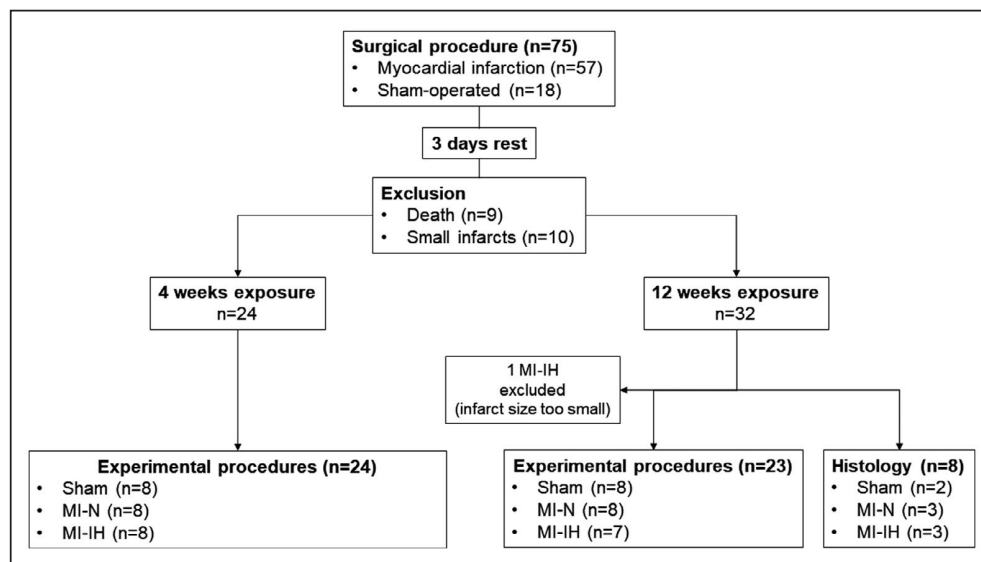
ejection fraction values in 2 homogeneous groups (MI–normoxia [N] and MI–IH), infarct size reproducibility was confirmed postmortem, and 1 MI–IH rat was excluded for too-small infarct size.

## Intermittent Hypoxia

Rats were randomly exposed to IH or N for 4–12 weeks (Figure 1), in our HypE platform (<https://hp2.univ-grenoble-alpes.fr/plateforme-hypeGrenoble>, France). Animals were exposed daily to 8 hours of IH or N during their daytime sleep period. The IH stimulus was performed using a specifically designed device, as previously described.<sup>20</sup> It consisted of 1-minute cycles with alternating 30 seconds of hypoxia (5% fraction of inspired O<sub>2</sub> (FiO<sub>2</sub>)) and 30 seconds of normoxia (21% FiO<sub>2</sub>). FiO<sub>2</sub> was monitored throughout the experiment with a gas analyzer (ML206; AD Instruments, Oxford, UK). Normoxic rats were exposed to air streams to reproduce equivalent levels of noise and turbulence related to gas circulation. Sham rats were maintained in housing cages. At the end of exposure, rats were anesthetized with injection of ketamine (100 mg/kg ip, Merial) and xylazine (4 mg/kg ip, Bayer) before experimental procedures.

## Echocardiography

A longitudinal follow-up of rat LV dimensions and function was performed weekly and every 2 weeks for 4- and 12-week exposure, respectively. Rats were anesthetized with 5% isoflurane (Axience) in a 50% O<sub>2</sub>



**Figure 1.** Study flow chart. Rats underwent a ligation of the left coronary artery to induce myocardial infarction (MI) or a sham surgery (Sham).

Three days after coronary artery ligation, rats with MI were randomly exposed to 4- or 12-weeks intermittent hypoxia (IH) or normoxia (N). At the end of exposures, rats were anesthetized for experimental procedures (power spectral analysis of arterial blood pressure variability, pressure–volume loop analysis) and tissues were harvested for histology or molecular biology.

–50% air mixture and maintained with 2% isoflurane during the procedure. Using an ultra-high-frequency probe (MS250 13–24 MHz, VisualSonics), diastolic and systolic LV wall thickness, cavity diameter, and ejection fraction were measured and calculated as the mean of 3 cardiac cycles in M-mode long axis.

## Histology

An intracardiac injection of KCl 120 mmol/L stopped rat hearts in diastolic phase. Hearts and adrenal glands were harvested and fixed overnight in 4% paraformaldehyde in PBS and were embedded in paraffin. Five-micrometer sections (RM2255 Fully Automated Rotary Microtome, Leica) were stained for 1 hour with Sirius-red (0.1% of Sirius red in saturated picric acid) and washed twice with acidified water. Interstitial fibrosis density in remote areas of the infarct was determined through ImageJ analysis.

Wheat germ agglutinin Oregon Green 488 conjugate (Molecular Probes) was used in order to measure cardiomyocytes minimum Feret diameter ( $\mu\text{m}$ ) at a 1/100 dilution for 1 hour. Cross-sectional area analysis was performed using a macro in ImageJ (Stochastic watershed plugin, adapted by Dr A. Fertin, TIMC-IMAG).

Apoptosis was determined through analysis of DNA fragmentation by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling (TUNEL) assay on paraffin-embedded sections, following the manufacturer's instruction (Abcam, Cambridge, United Kingdom) as previously described.<sup>21</sup> An Axioscan fluorescent microscope (Zeiss, Göttingen, Germany,  $\times 20$ ) was used to visualize TUNEL-positive red cells and sections were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole. Analyses were performed on 2 to 3 rats per group and 7 to 15 images per animal were quantified using Image J software (National Institutes of Health, Bethesda, MD). Apoptotic cells were expressed as percentage of nuclear positive red staining per field.

## Experimental Procedures

### Pressure-Volume Loop Analysis

Animals were deeply anesthetized as previously described. LV pressures and volumes were measured with a pressure-volume conductance catheter (SPR-869, Millar Instruments, Houston, TX) inserted first into the right carotid artery to measure baseline arterial pressure (5-minute record), and then into the LV to record systolic and diastolic hemodynamics. End-systolic-pressure-volume relationship and end-diastolic-pressure-volume relationship were calculated using 5 consecutive cycles following occlusion of the inferior vena cava.

### Sympathetic Nervous System Activity

Power spectral analysis of blood pressure variability was carried out using the baseline 5-minute arterial pressure record, before catheter insertion into the LV cavity. Signals were processed using rodent spectral analysis software (SA-BPV, Nevrokard, Ljubljana, Slovenia). Frequency domain analysis of diastolic pressure variability was performed. Power and normalized units of the low frequency (0.25–0.75 Hz) and high frequency (0.75–3 Hz) were computed, as well as the low frequency/high frequency ratio, considered as general marker of sympathovagal balance.

### Infarct Size Measurement and Tissue Sampling

After experimental procedures, blood was collected from the inferior vena cava and centrifuged 10 minutes at 4500g in order to measure hematocrit. Hearts were excised and sectioned into atria and ventricles. The right ventricle was harvested and the LV was opened from the base to the apex along the middle of the septum and photographed. Infarcted areas were determined as described by Loennechen et al.<sup>22</sup> Then, the LV was divided into infarcted and remote zones. Organs were weighted, rapidly frozen, and kept at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### Western Blotting

Frozen samples of remote areas were homogenized using mortar and pestle and were lysed to extract total proteins (Precellys 24, 6500 rpm, 3  $\times$  20 seconds–5 seconds, Bertin Technology, Montigny le Bretonneux, France; sample lysis buffer: 5 mmol/L EDTA, 1 mmol/L  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 20 mmol/L NaF, 1 mmol/L dithiothreitol, and protease inhibitor cocktails) or nuclear proteins (Nuclear Extract Kit; Active Motif Europe, Rixensart, Belgium). The protein concentration was calculated using Bradford assay (Bradford's reagent, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Thirty milligrams of protein were separated by SDS polyacrylamide gels (8%–12%) and transferred to polyvinylidene difluoride membranes. Next, membranes were blocked with 5% nonfat milk or BSA in Tris-buffered saline with Tween 20 (0.1%). Membranes were then incubated overnight at  $4^{\circ}\text{C}$  with primary antibodies in Tris-buffered saline–Tween 20 (0.1%), 5% BSA, or nonfat milk. The following day, membranes were incubated for 1 hour at room temperature with the appropriate horseradish peroxidase-conjugated anti-IgG (1:5000, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany). Enhanced chemiluminescence was performed with the Western Blot ECL substrate (Clarity; Bio-Rad, Marnes-la Coquette, France) according to the manufacturer's instructions and video acquisition (ChemiDoc-XRS-System, Bio-Rad). The relative



amount of protein was quantified by densitometry (ImageJ). The following antibodies were used: the transcription factor ATF4, caspase-12, caspase-3, cleaved caspase-3 (1:1000, Cell Signaling Technology, Hitchin, UK), nuclear transcription factor CHOP (C/EBP homologous binding protein), Grp78 (chaperone protein), TBP (TATA binding protein) (1: 1000, Santa Cruz Biotechnology), nuclear HIF-1 $\alpha$  (1: 500), and tubulin (1: 2000, Santa Cruz Biotechnology). Phosphorylated proteins were expressed relative to total proteins, and nonphosphorylated cytosolic proteins were expressed relative to tubulin. Nuclear CHOP and HIF-1 $\alpha$  were expressed relative to TBP.

### RNA Isolation, Reverse Transcription, and Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction

Total mRNA from remote areas were extracted using RNA isolation kit (Nucleospin RNA Plus, Macherey-Nagel, Düren, Allemagne). Total RNA (0.5  $\mu$ g) was reversely transcribed to cDNA using iScript Reverse Transcription Supermix (C-1000 Thermal Cycler, Bio-Rad). Quantitative real-time polymerase chain reaction was performed using SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad) and polymerase chain reaction primers for Nppa, Nppb, and Acta1 (Sigma-Aldrich). Primer sequences are listed in Table 1. Quantification of mRNA was standardized to the 2 best household genes (Cyca, Rplp0, and HPRT1) selected with the RefFinder program,<sup>23</sup> and was calculated using the 2 $^{-\Delta\Delta C_t}$  method.

### Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 6 software (San Diego, CA). Data are expressed as means  $\pm$  SEM. For each comparison group, normality and equal variance were tested using Shapiro-Wilk and Bartlett tests, respectively. When these assumptions were met, results were analyzed using 2-way ANOVA, followed by post hoc Sidak's multiple comparison tests. In other conditions and when sample size was too small ( $n < 3$ ), Kruskal-Wallis test was used, followed by Dunn's multiple comparison test. For ultrasonographic

parameters, repeated-measures ANOVA was used (Prism; GraphPad Software, La Jolla, CA). A 2-sided  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

## RESULTS

### IH Impacts Heart and Lung Weights and Volumes

IH induced a significant increase in hematocrit compared with Sham and MI-N animals at both 4 and 12 weeks (Table 2). After 12 weeks MI, body weight was lower in MI-IH compared with Sham and MI-N animals (\* $P < 0.05$  vs Sham and † $P < 0.05$  vs MI-N; Table 2 and Figure 2A). Heart and LV weights were significantly increased in both MI-N and MI-IH compared with Sham (\* $P < 0.05$  vs Sham; Table 1, Figure 2B and 2C), whereas right ventricle and lung weights were significantly increased in the MI-IH group only (\* $P < 0.05$  vs Sham and † $P < 0.05$  vs MI-N; Table 2, Figure 2D and 2E).

### IH Exacerbates Cardiac Remodeling and Contractile Dysfunction During the Time Course of Ischemic Cardiomyopathy Development

Three days after coronary artery ligation, we validated the surgical procedure homogeneity by echocardiography. After 4 and 12 weeks of exposure to IH or N, infarct sizes were similar between MI-N and MI-IH groups ( $29 \pm 2$  vs  $29 \pm 1\%$  of LV area in N and IH rats, respectively, after 4 weeks MI; and  $22 \pm 2$  vs  $23 \pm 1\%$  in N and IH, respectively, after 12 weeks; Table 2). At 4 weeks, MI induced LV dilation in both N and IH groups compared with Sham, characterized by increased end-diastolic LV internal diameter (Table 2). This was associated with cardiac dysfunction as shown by significant decreases in LV fractional shortening, dP/dtmax, and dP/dtmin in both MI-N and MI-IH ( $P < 0.05$  vs Sham; Table 2) and a decrease in stroke volume and cardiac output (CO) in MI-IH compared to Sham ( $P < 0.05$  vs Sham; Table 2). At 12 weeks, our data confirmed the acceleration of cardiac dysfunction in MI-IH compared with MI-N, as

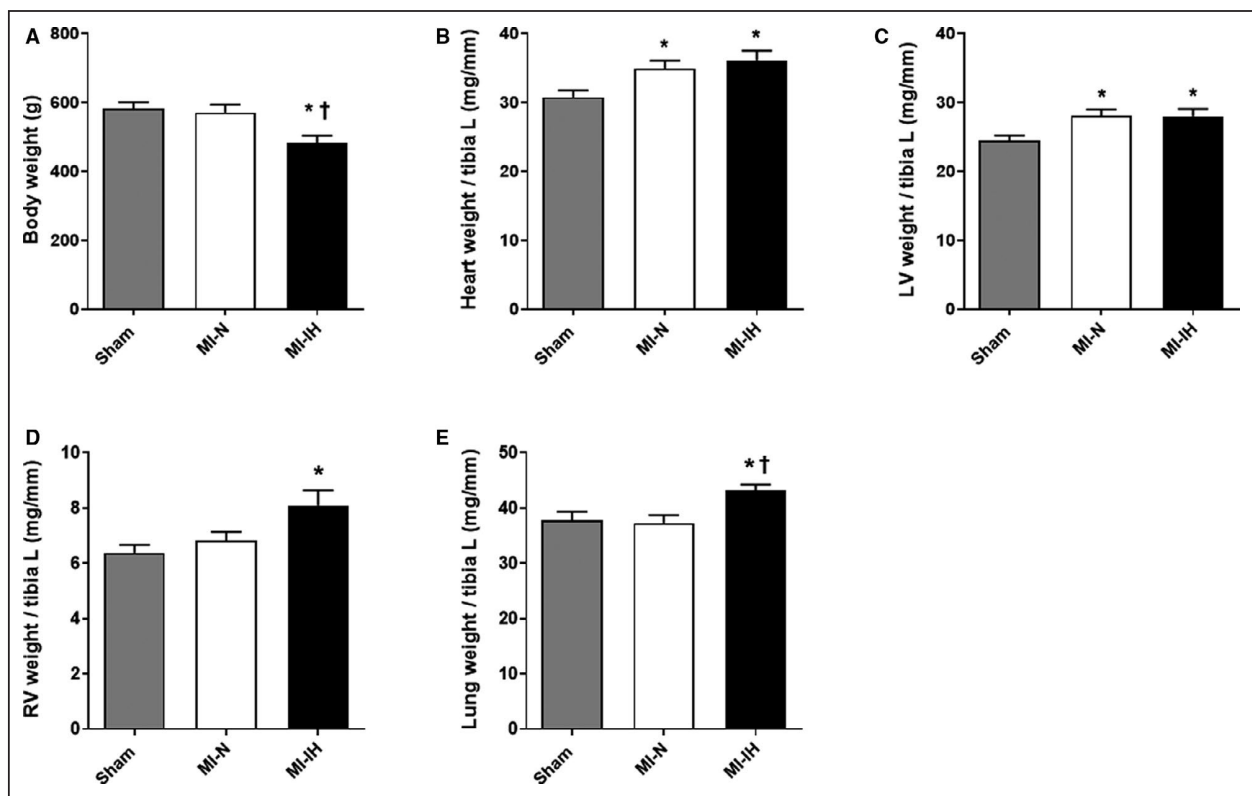
**Table 1.** Primers Used for RT-qPCR

Genes	Proteins	Forward Primer 5'–3'	Reverse primer 3'–5'
Cyca	Cyclin A	TATCTGCACTGCCAAGACTGAGTG	CTTCTTGCTGGTCTTGCCATTCC
Rplp0	Ribosomal protein large P0	CCCTGCACCTCTCGCTTCTTGGA	AGGGGCAGCAGCCGCAAATG
HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase1	GGGGGACATAAAAAGTTATTGGTGGA	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCTTG
Nppa	Natriuretic peptide A	AGGCCATATTGGAGCAAATC	CTCCTCCAGGTGGTCTAGCA
Nppb	Natriuretic peptide B	GCTCTCAAAGGACCAAGGC	AACAACCTCAGCCCGTCAC
Acta1	Skeletal alpha actin	GGCTCCCAGCACCATGAAGA	CAGCACGATTGTCGATTGTCC

**Table 2. Effects of Chronic IH Exposure on Morphometric and Cardiac Parameters**

Morphological parameters	4 weeks exposure						12 weeks exposure					
	Sham	MI-N	MI-IH	P Value MI-N		P Value MI-IH	Sham	MI-N	MI-IH	P Value MI-N		P Value MI-IH
				vs Sham	vs MI-N					vs Sham	vs MI-N	
BW, g	407±10	415±7	377±11	0.547	0.063	0.019	583±19	571±23	483±22	0.691	0.0104	0.017
Hematocrit, %	38.7±0.9	39.0±1.2	46.6±1.4	0.872	<0.001	<0.001	40.0±0.6	42.1±0.8	56.7±0.9	0.056	<0.001	<0.001
Infarct size (% of LV)	/	29±2	29±1	/	/	0.818	/	22±2	23±1	/	/	0.919
HW/TL, mg/mm	27±1	34±2	30±1	<0.001	0.022	0.022	30.8±0.9	34.9±1.1	36.1±1.4	0.036	0.0129	0.476
LWV/TL, mg/mm	21±1	28±1	24±1	<0.001	0.045	0.010	24.4±0.8	28.1±0.9	28.0±1.0	0.028	0.0277	0.988
Cardiac ultrasonography												
LVDd, mm	8±0.2	11±0.2	10±0.1	<0.001	<0.001	0.001	9±0.1	11.6±0.2	11.4±0.2	<0.001	<0.001	0.420
LVIDs, mm	5±0.2	10±0.2	9±0.2	<0.001	<0.001	0.010	5±0.2	10±0.2	10±0.2	<0.001	<0.001	0.845
LVPWd, mm	1.4±0.0	1.1±0.1	1.2±0.0	<0.001	<0.001	0.025	1.3±0.0	1.1±0.0	1.0±0.0	<0.001	<0.001	0.541
LVPWs, mm	2.1±0.0	1.8±0.0	2.0±0.1	<0.001	0.002	<0.001	2.1±0.0	1.7±0.0	1.5±0.0	<0.001	<0.001	0.004
LVFS, %	34±1.0	14±0.0	15±1	<0.001	<0.001	0.753	39±1	13±1	11±1	<0.001	<0.001	0.004
Cardiac catheterization												
HR, bpm	242.5±8.1	237.0±8.1	244.4±15.3	0.999	0.999	0.992	197.5±11.5	212.7±7.0	207.8±6.6	0.583	0.999	0.999
ESP, mm Hg	82.7±4.1	83.6±0.8	82.3±1.9	0.986	0.986	0.986	82.4±3.1	87.2±2.0	84.6±2.8	0.511	0.797	0.797
EDP, mm Hg	8.3±0.8	8.2±0.5	8.9±0.9	0.894	0.878	0.878	8.9±0.8	9.0±0.6	5.5±1.0	0.919	0.027	0.027
ESV, µL	131±14	308±18	231±34	<0.001	0.014	0.036	127±15	392±31	470±36	<0.001	<0.001	0.068
EDV, µL	212±20	364±25	271±36	0.004	0.153	0.064	263±41	461±31	549±35	0.002	0.001	0.144
SV, µL	127±11	114±14	82±9	0.413	0.025	0.116	189±29	132±9	119±5	0.096	0.082	0.642
CO, mL/min	30.9±3.1	27.0±3.2	19.4±1.9	0.343	0.021	0.131	37.8±6.4	28.3±2.4	24.7±1.4	0.251	0.180	0.590
dP/dtmax, mm Hg/s	5339±325	4510±209	4034±116	0.046	0.002	0.173	5285±270	4257±244	4015±219	0.017	0.012	0.544
dP/dtmin, mm Hg/s	-4269±280	-3452±132	-3294±126	0.019	0.006	0.584	-3883±200	-3274±177	-3202±117	0.065	0.065	0.798
EDPVR	0.04±0.00	0.03±0.00	0.05±0.00	0.479	0.583	0.304	0.04±0.01	0.02±0.00	0.02±0.00	0.081	0.081	0.870

Values are mean±SEM; n = 7 to 11 per group. bpm indicates beats per minute; BW, body weight; CO, cardiac output; dP/dtmax, maximum first derivative of change in pressure rise with respect to time; dP/dtmin, maximum first derivative of change in pressure fall with respect to time; EDP, end-diastolic pressure; EDPVR, end-diastolic pressure-volume relationship; EDV, end-diastolic volume; ESP, end-systolic pressure; ESV, end-systolic volume; HR, heart rate; HW, heart weight; IH, intermittent hypoxia; LVFS, left ventricular fractional shortening; LVIDd, left ventricular internal diameter in diastole; LVIDs, left ventricular internal diameter in systole; LVPWd, left ventricular posterior wall thickness in diastole; LVPWs, left ventricular posterior wall thickness in systole; LWV, left ventricular weight; MI, myocardial infarction; N, normoxia; SV, stroke volume; TL, tibia length.



**Figure 2.** Morphometric parameters after 12 weeks exposure to intermittent hypoxia (IH).

A, Rat body weight. B, Heart weight to tibia length (L) ratio. C, Left ventricle (LV) weight on tibia length ratio. D, Right ventricle (RV) weight on tibia length ratio. E, Lung weight on tibia length ratio. Values are mean±SEM. n=7 to 8 per group; \*P < 0.05 vs Sham; †P < 0.05 vs MI-N.

revealed by a significantly higher reduction of ejection fraction and end-systolic-pressure-volume relationship compared with MI-N (\*P < 0.05 vs Sham and †P < 0.05 vs MI-N; Figure 3A and 3B).

### IH Induces LV Remodeling

At 12 weeks, MI induced cardiomyocytes hypertrophy, as shown by the increase in minimum Feret diameter of cardiomyocytes from Sham to MI-N and a maximum increase in MI-IH (\*P < 0.05 vs Sham and †P < 0.05 vs MI-N; Figure 4A and 4B). This was associated with dynamic changes in mRNA expression of fetal genes program (Nppa, Nppb, and Acta1) from 4 to 12 weeks (Figure 4C through 4E). In addition, we observed an increase in interstitial fibrosis (\*P < 0.05 vs Sham; Figure 4F and 4G) and apoptosis (\*P < 0.05 vs Sham; Figure 4H and 4I) in remote LV areas in MI-IH but not in MI-N animals.

### IH Induces Sustained Sympathetic Hyperactivity

After 4 weeks of IH, we observed a significant elevation of the low frequency to high frequency (low frequency/high frequency) ratio of diastolic blood pressure variability that lasted until 12 weeks of exposure (\*P < 0.05

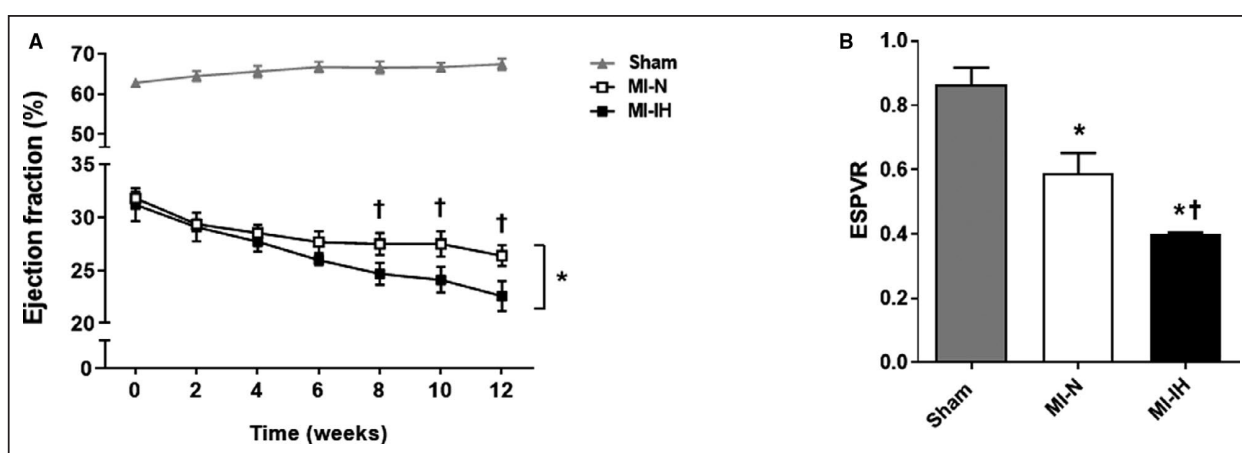
vs Sham; Figure 5B). As the adrenal medulla releases catecholamines in response to SNS activation, we examined its structural status after 12 weeks. IH rats presented adrenal hypertrophy with a significant increase in adrenal weight to tibia length ratio (\*P < 0.05 vs Sham; Figure 5C), associated with significant increase in the medullar area in MI-IH (\*P < 0.05 vs Sham; Figure 5E).

### IH Induces a Sustained Overexpression of Nuclear HIF-1 $\beta$ Post-MI

After 4-week exposure, nuclear HIF-1 $\beta$  expression was significantly increased in both MI groups, with a more important upregulation in the MI-IH group (\*P < 0.05 vs Sham and †P < 0.05 vs MI-N; Figure 6A). At 12 weeks, nuclear HIF-1 $\beta$  expression was normalized to Sham group in MI-N, whereas it remained overexpressed in the MI-IH group over time (\*P < 0.05 vs Sham, Figure 6A).

### IH Promotes Myocardial Pro-Apoptotic ER Stress

In normoxic animals, MI induced a slight increase in ER stress markers expression over time, with a modest but significant rise in Grp78 expression at both 4



**Figure 3.** Chronic intermittent hypoxia (IH) precipitates myocardial infarction (MI)-induced contractile dysfunction. A, Echocardiographic measurement of ejection fraction (EF) over time. B, End-systolic pressure-volume relationship (ESPVR) after 12-week exposure to normoxia (MI-N) or intermittent hypoxia (MI-IH). Values are mean±SEM; n=10 to 11 per group for EF, n=7 to 8 for ESPVR. \*P < 0.05 vs Sham and †P < 0.05 vs MI-N.

and 12 weeks (\*P < 0.05 vs Sham; Figure 6B). This was associated with a slight increase in the nuclear pro-apoptotic transcription factor CHOP expression and an increase in c-Casp3/Casp3 ratio at 4 weeks, which were no longer elevated at 12 weeks (\*P < 0.05 vs Sham; Figure 6D and 6E). ATF4 and Casp12 expressions were not modified in the MI-N group over 12 weeks (Figure 6C and 6F). The kinetic of ER stress markers expression differed in the MI-IH group in which ER stress was limited at 4 weeks compared with Sham and significantly increased at 12 weeks, with a significant increase in Grp78, ATF4, and nuclear CHOP expression (\*P < 0.05 vs Sham and †P < 0.05 vs MI-N; Figure 6B through 6D). Interestingly, apoptosis seemed to be present from 4 weeks in the MI-IH group, with increased expression of Casp12 and cCasp3/Casp3, which persisted until 12 weeks (\*P < 0.05 vs Sham and †P < 0.05 vs MI-N; Figure 6E and 6F). These results are consistent with TUNEL stainings (Figure 4H and 4I).

## DISCUSSION

Our results demonstrate that IH, the hallmark feature of SDB deleterious cardiovascular consequences,

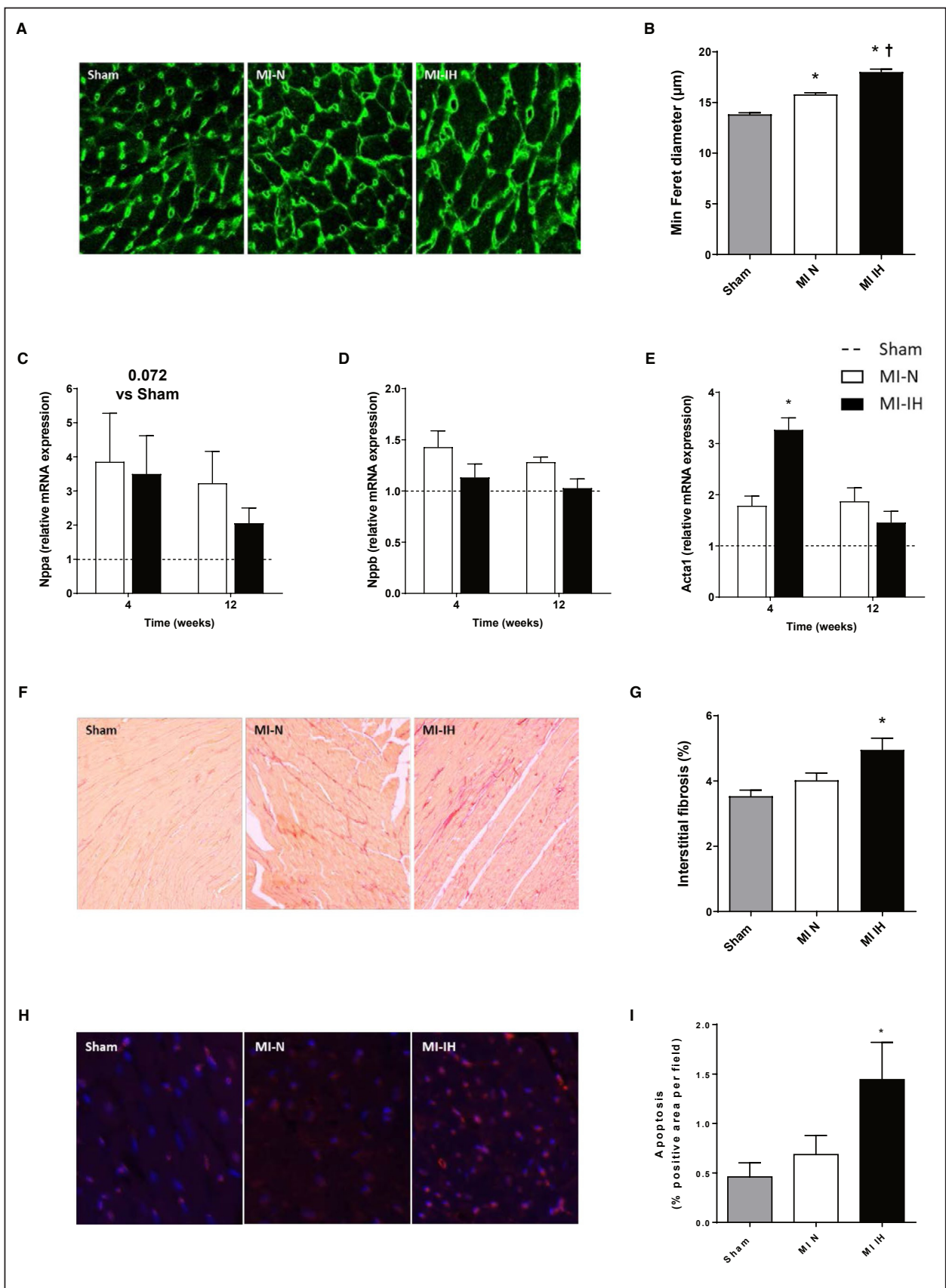
precipitates cardiac remodeling and contractile dysfunction during the time course evolution of ischemic cardiomyopathy in rodents. Among associated mechanisms, we identified the early occurrence and persistence of sympathetic activation, associated with sustained nuclear HIF-1 $\alpha$  expression and a delayed pro-apoptotic ER stress.

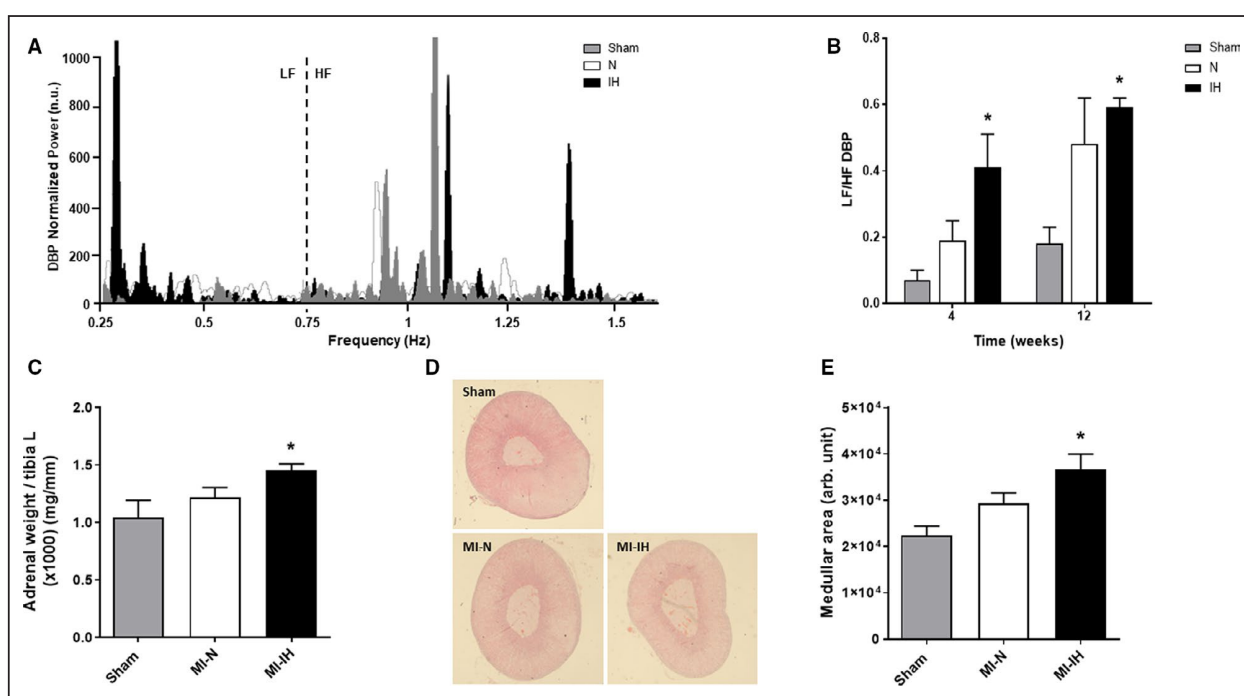
### IH Exacerbates the Progression of Ischemic Cardiomyopathy

SDB is highly prevalent in patients with ACS, with a remaining question about the role of chronic IH on long-term prognosis.<sup>24</sup> Application of a positive airway pressure remains the gold standard treatment of SDB. However, although many studies demonstrated the benefit of continuous positive airway pressure on quality of life and neurocognitive dysfunctions,<sup>25</sup> recent large clinical trials reported that continuous positive airway pressure failed to prevent cardiovascular mortality,<sup>26,27</sup> underlying the complex relationship between SDB and cardiovascular complications.<sup>28</sup> In this context, well-controlled animal studies are required to demonstrate the long-term impact of chronic IH on ischemic cardiomyopathy progression

### Figure 4. Effect of chronic IH on cardiac remodeling.

A, Representative images of wheat germ agglutinin staining. B, Measurement of minimum Feret diameter from Sham, myocardial infarction normoxia (MI-N) and myocardial infarction intermittent hypoxia (MI-IH) rats at 12 weeks intermittent hypoxia or normoxia. Values are mean±SEM; n=2 to 3 animals per group, 100 to 400 cells per animal; \*P < 0.05 vs Sham; †P < 0.05 vs MI-N. C, Nppa (natriuretic peptide type A), D, Nppb (natriuretic peptide type B), E, actin alpha1 skeletal muscle (Acta1) mRNA expression relative to household genes mRNA expression at 4- and 12-week experiment. Values are normalized to Sham group (dashed line) and expressed as mean±SEM. n=7 to 8 per group; \*P < 0.05 vs Sham. F, Representative images of Sirius red staining. G, Interstitial fibrosis evaluated in the LV remote area as a percentage of Sirius red staining relative to cardiomyocytes area, in myocardium from Sham, MI-N, and MI-IH rats at 12 weeks experiment. Values are mean±SEM; n=2 to 3 animals per group, 20 to 40 images per animal; \*P < 0.05 vs Sham. H, Representative images of TUNEL staining. I, Apoptotic cells quantified in the LV remote area and expressed as percentage of nuclear positive red staining per field. Values are mean±SEM; n=2 to 3 animals per group, 7 to 15 images per animal; \*P < 0.05 vs Sham. LV indicates left ventricular.





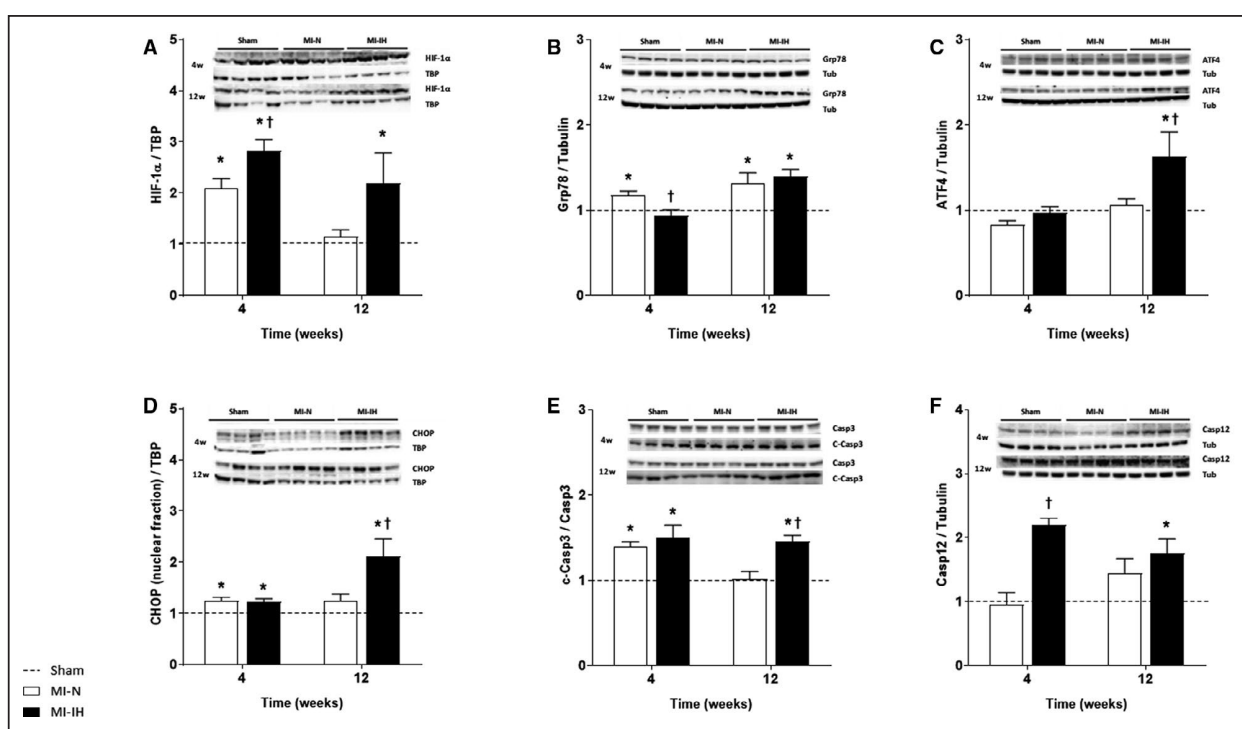
**Figure 5. Chronic intermittent hypoxia (IH) exposure increases sympathetic activity post-myocardial infarction (MI).**

**A**, Representative power analysis spectra of diastolic blood pressure (DBP) variability from sham animals or rats with MI exposed to normoxia (N) or intermittent hypoxia (IH). **B**, Quantification of low-frequency-to-high-frequency ratio from DBP variability (LF/HF DBP) after 4- and 12-week exposure to N or IH in MI and Sham rats. **C**, Adrenal hypertrophy measured by adrenal weight to tibia length (L) ratio. **D**, Representative images of adrenal gland sections from Sham, MI-N, and MI-IH animals. **E**, Medulla area in arbitrary units (arb. unit). Values are mean  $\pm$  SEM;  $n=7$  to 8 per group; \* $P < 0.05$  vs Sham. n.u. indicates normalized unit.

and to decipher associated mechanisms. This would allow proposing new therapeutic targets, and even potential biomarkers of disease severity, in order to improve management of SDB-related cardiovascular risk in patients with ischemic cardiomyopathy, in addition to continuous positive airway pressure. The originality of our data is to make available a sequential long-term longitudinal echocardiographic follow-up. At 4 weeks of IH, cardiac remodeling did not significantly differ between MI-N and MI-IH rats. However, at the functional level, although the decrease in ejection fraction induced by coronary ligation was identical in the MI-IH and MI-N groups, the reduction of cardiac output was more pronounced in the IH group. In the long term, cardiac function started to decline after 6 weeks of IH exposure with, at 12 weeks, a significantly higher reduction in end-systolic-pressure-volume relationship and ejection fraction in the MI-IH group compared with the MI-N group. This was associated with LV cardiomyocyte hypertrophy and interstitial fibrosis. Such a marked LV remodeling and dysfunction in MI-IH animals was associated with right ventricle hypertrophy and lung edema, confirming an accelerated progression of ischemic cardiomyopathy to heart failure after long-term IH exposure.

### IH Induces an Early and Sustained Sympathetic Hyperactivity

Following myocardial ischemia, SNS is activated as a compensatory mechanism in order to increase contractile performance and maintain cardiac output. However, sustained and persistent SNS stimulation in turn drives a maladaptive response, through desensitization of adrenergic signaling, direct effects on cardiomyocytes (ie, apoptosis, hypertrophy, and interstitial fibrosis) and a subsequent and progressive reduction of cardiac output.<sup>29</sup> In the present study, we demonstrated that IH induced an early and persistent sympathetic activity over time. Interestingly, spectral analysis of blood pressure was realized 12 hours after the last IH exposure, indicating that sympathetic activation persists after cessation of IH stimulus in accordance with data in patients with SDB.<sup>25</sup> At 4 weeks IH exposure, the increase in low frequency/high frequency ratio preceded cardiac remodeling and severe contractile dysfunction, acting as a compensatory mechanism. This is in accordance with previous data demonstrating that 4 weeks of IH exposure in C57BL/6J mice increases cardiac contractility through activation of cardiac  $\alpha$ -adrenergic pathways.<sup>30</sup> On the other hand, such a sustained sympathetic activity in the long term



**Figure 6.** Effect of myocardial infarction (MI) and intermittent hypoxia (IH) exposure on myocardial hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) expression, endoplasmic reticulum (ER) stress, and apoptosis.

A, Nuclear HIF-1 $\alpha$  expression relative to TBP (TATA binding protein). B, Grp-78 (glucose-regulated protein kinase) expression relative to tubulin. C, Activating transcription factor (ATF)-4 expression relative to tubulin. D, Nuclear CHOP (C/EBP homologous binding protein) expression relative to TBP. E, Cleaved-caspase 3 (C-Casp3) expression relative to caspase 3 (Casp3). F, Caspase 12 (Casp12) expression relative to tubulin. Values are normalized to sham group (dashed line) and expressed as mean  $\pm$  SEM. n=7 to 8 per group; \*P < 0.05 vs Sham; †P < 0.05 vs MI-normoxia (N).

might be responsible for the cardiac remodeling and contractile dysfunction we observed in the MI-IH group between 6 and 12 weeks.

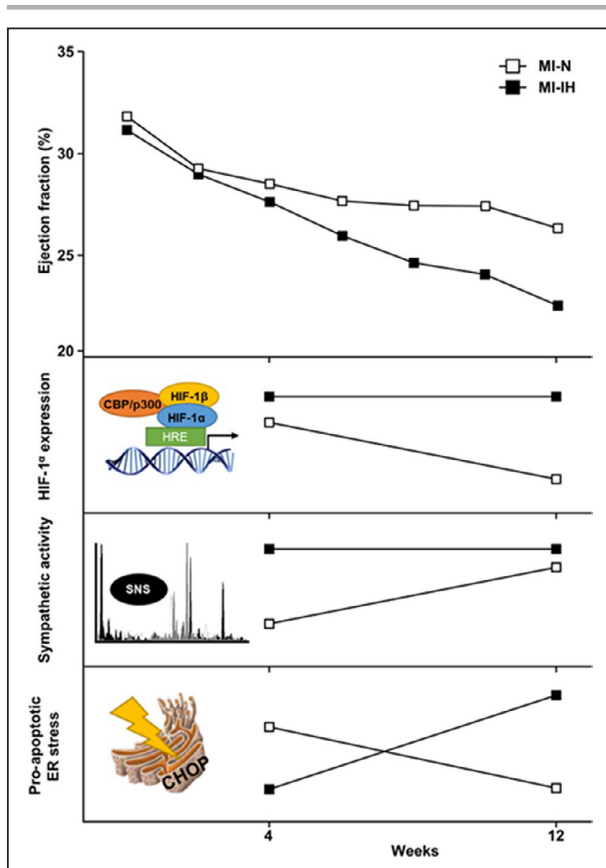
### IH Induces Sustained Nuclear HIF-1 Expression

We have previously demonstrated that chronic exposure to IH induces a sustained activation of HIF-1 $\alpha$  responsible for the increased infarct size.<sup>11</sup> Here, we demonstrated that cardiac HIF-1 $\alpha$  nuclear expression was elevated at 4 weeks in both MI-N and MI-IH animals. However, whereas expression was normalized at 12 weeks in MI-N rats, HIF-1 $\alpha$  nuclear expression remains elevated at 12 weeks in MI-IH, reflecting the sustained and persistent activation only within IH animals. Previous studies have highlighted that long-term HIF-1 $\alpha$  stabilization triggers the development of cardiomyopathy in rodents.<sup>32,33</sup> Indeed, mice with inducible cardiomyocyte-specific expression of HIF-1 $\alpha$  exhibited a progressive decrease in cardiac function concomitantly with transgene expression.<sup>33</sup> In addition, constitutive cardiac-specific HIF-1 overexpression in mice mediates beneficial effects in the short term, whereas it triggers cardiac dysfunction occurrence with aging.<sup>32</sup>

Finally, in patients with cardiomyopathy, HIF-1 $\alpha$  expression is increased in heart samples<sup>32</sup> and high plasmatic HIF-1 $\alpha$  level correlates with a decrease in ejection fraction and survival rate in patients with decompensated heart failure.<sup>34</sup>

### IH Induces Late Pro-Apoptotic ER Stress

ER stress plays a major role in development of cardiovascular diseases.<sup>35</sup> ER stress, characterized by an increase in CHOP expression, contributes to cardiac apoptosis, hypertrophy, and contractile dysfunction in rodent models of pressure overload.<sup>36,37</sup> In the current study, we determined pro-apoptotic ER stress at 12 weeks only in the MI-IH group, which was concomitant with the progression of ischemic cardiomyopathy to heart failure. These results are in line with previous studies demonstrating that, independently of MI, IH induces deleterious pro-apoptotic ER stress in myocardium.<sup>11,12,15,16</sup> Indeed, tauroursodeoxycholic acid, an ER stress inhibitor, prevents the IH-induced increase in infarct size<sup>11</sup> and several cardioprotective strategies, such as adiponectin,<sup>16</sup> metallothionein,<sup>15</sup> and high-intensity exercise,<sup>12</sup> limit the IH-induced myocardial pro-apoptotic ER stress and associated decline in cardiac function.



**Figure 7.** Schematic representation of intermittent hypoxia-induced cardiac dysfunction and associated mechanisms time-course in a rat model of ischemic cardiomyopathy. CBP indicates CREB binding protein; CHOP, C/EBP homologous protein; ER, endoplasmic reticulum; HIF-1 $\alpha$ , hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ ; HRE, hypoxia response element; MI-IH, myocardial infarction-intermittent hypoxia; MI-N, myocardial infarction normoxia; SNS, sympathetic nervous system.

## Interconnection Between IH-Induced Mechanisms

A crosstalk between mechanisms reported above is supported by the literature. In mice, HIF-1 $\alpha$  deletion prevents the IH-induced sympathetic activity<sup>38</sup> and recent evidence suggests that, during hypoxia, sympathetic activation increases HIF-1 $\alpha$  expression and stabilization in kidney.<sup>39</sup> Adrenergic stimulation also induces cardiac ER stress and subsequent cardiac dysfunctions,<sup>40,41</sup> while  $\beta$ -blockers are able to reduce pro-apoptotic ER stress in a dog model of ischemic cardiomyopathy.<sup>42</sup> Finally, IH-induced cardiac ER stress activates HIF-1, initiating a vicious circle as HIF-1 triggers ER stress and CHOP-mediated apoptosis in alveolar epithelial cells.<sup>43</sup> In our study, the time course of IH effects starts with a concomitant sympathetic overactivity and nuclear HIF-1 expression, which might trigger mechanisms of IH-induced accelerated cardiac remodeling and post-MI dysfunction, whereas ER

stress activation occurs later with the decline of cardiac function (Figure 7).

## CONCLUSIONS

We have described for the first time the different steps and possible mechanisms associating IH and accelerated deterioration in cardiac function post-MI. Further studies are needed to evaluate whether targeting IH-induced SNS or HIF1 overactivities could limit these effects and improve management of coexisting ischemic cardiomyopathy and SDB.

## Study Limitations

1. Whereas we demonstrated the deleterious impact of IH on post-MI cardiac remodeling and contractile dysfunction, associated with activation of several mechanisms (SNS activation, HIF-1 nuclear expression, and pro-apoptotic ER stress), our present study cannot make a firm conclusion on the specific role of each one. Importantly, all these mechanisms could be interconnected, and further studies are needed to establish their respective contributions to IH-induced post-MI dysfunctions.
2. SDB exhibits a complex pathophysiology. Apart from IH, which is described as the main contributor to cardiovascular complications, SDB are also associated with sleep fragmentation and intrathoracic pressure swings and we cannot exclude their contributions on post-MI cardiac remodeling and decline in cardiac function.

## ARTICLE INFORMATION

Received February 24, 2020; accepted June 30, 2020.

### Affiliations

From the Univ. Grenoble Alpes, INSERM, CHU Grenoble Alpes, HP2, Grenoble, France.

### Acknowledgments

We are grateful to Dr Jonathan Gaucher for his ideas about the conclusion figure.

### Sources of Funding

This work was supported by the Fond de dotation Agir Pour les Maladies Chroniques (France), Institut National de la Santé et de la Recherche (France) and Université Grenoble Alpes (France). Maximin Détrait is recipient of a PhD fellowship from Société Française de Recherche et Médecine du Sommeil (France).

### Disclosures

None.

## REFERENCES

1. GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet Lond Engl*. 2015;385:117-171.



2. Kristian T, Alpert JS, Jaffe AS, Simoons ML, Chaitman BR, White HD. Third universal definition of myocardial infarction. *Circulation*. 2012;126:2020-2035.
3. Velagaleti RS, Pencina MJ, Murabito JM, Wang TJ, Parikh NI, D'Agostino RB, Levy D, Kannel WB, Vasani RS. Long-term trends in the incidence of heart failure after myocardial infarction. *Circulation*. 2008;118:2057-2062.
4. Gottlieb DJ, Yenokyan G, Newman AB, O'Connor GT, Punjabi NM, Quan SF, Redline S, Resnick HE, Tong EK, Diener-West M, et al. Prospective study of obstructive sleep apnea and incident coronary heart disease and heart failure. *Circulation*. 2010;122:352-360.
5. Ludka O, Stepanova R, Vyskocilova M, Galkova L, Mikolaskova M, Belehrad M, Kostalova J, Mihalova Z, Drozdova A, Hlasensky J, et al. Sleep apnea prevalence in acute myocardial infarction—the Sleep Apnea in Post-acute Myocardial Infarction Patients (SAPAMI) Study. *Int J Cardiol*. 2014;176:13-19.
6. Khayat R, Jarjoura D, Porter K, Sow A, Wannemacher J, Dohar R, Pleister A, Abraham WT. Sleep disordered breathing and post-discharge mortality in patients with acute heart failure. *Eur Heart J*. 2015;36:1463-1469.
7. Buchner S, Satzl A, Debl K, Hetzenecker A, Luchner A, Husser O, Hamer OW, Poschenrieder F, Fellner C, Zeman F, et al. Impact of sleep-disordered breathing on myocardial salvage and infarct size in patients with acute myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2014;35:192-199.
8. Barbé F, Sánchez-de-la-Torre A, Abad J, Durán-Cantolla J, Mediano O, Amilibia J, Masdeu MJ, Florés M, Barceló A, de la Peña M, et al. Effect of obstructive sleep apnoea on severity and short-term prognosis of acute coronary syndrome. *Eur Respir J*. 2015;45:419-427.
9. Dematteis M, Godin-Ribuot D, Arnaud C, Ribout C, Stanke-Labesque F, Pépin J, Lévy P. Cardiovascular consequences of sleep-disordered breathing: Contribution of animal models to understanding of the human disease. *Ilar J*. 2009;50:262-281.
10. Park A-M, Suzuki YJ. Effects of intermittent hypoxia on oxidative stress-induced myocardial damage in mice. *J Appl Physiol*. 2007;102:1806-1814.
11. Belaidi E, Thomas A, Bourdier G, Moulin S, Lemarié E, Lévy P, Pépin J L, Korichneva I, Godin-Ribuot D, Arnaud C. Endoplasmic reticulum stress as a novel inducer of hypoxia inducible factor-1 activity: Its role in the susceptibility to myocardial ischemia-reperfusion induced by chronic intermittent hypoxia. *Int J Cardiol*. 2016;210:45-53.
12. Bourdier G, Flore P, Sanchez H, Pepin J-L, Belaidi E, Arnaud C. High-intensity training reduces intermittent hypoxia-induced ER stress and myocardial infarct size. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol*. 2016;310:H279-H289.
13. Lai CJ, Yang CCH, Hsu YY, Lin YN, Kuo TBJ. Enhanced sympathetic outflow and decreased baroreflex sensitivity are associated with intermittent hypoxia-induced systemic hypertension in conscious rats. *J Appl Physiol*. 2006;100:1974-1982.
14. Morand J, Arnaud C, Pepin J-L, Godin-Ribuot D. Chronic intermittent hypoxia promotes myocardial ischemia-related ventricular arrhythmias and sudden cardiac death. *Sci Rep*. 2018;8:2997.
15. Zhou S, Yin X, Zheng Y, Miao X, Feng W, Cai J, Cai L. Metallothionein prevents intermittent hypoxia-induced cardiac endoplasmic reticulum stress and cell death likely via activation of Akt signaling pathway in mice. *Toxicol Lett*. 2014;227:113-123.
16. Ding W, Zhang X, Huang H, Ding N, Zhang S, Hutchinson SZ, Zhang X. Adiponectin protects rat myocardium against chronic intermittent hypoxia-induced injury via inhibition of endoplasmic reticulum stress. *PLoS One*. 2014;9:e94545.
17. Chou Y-T, Zhan G, Zhu Y, Fenik P, Panossian L, Li Y, Zhang J, Veasey S. C/EBP homologous binding protein (CHOP) underlies neural injury in sleep apnea model. *Sleep*. 2013;36:481-492.
18. Belaidi E, Morand J, Gras E, Pépin J-L, Godin-Ribuot D. Targeting the ROS-HIF-1-endothelin axis as a therapeutic approach for the treatment of obstructive sleep apnea-related cardiovascular complications. *Pharmacol Ther*. 2016;168:1-11.
19. Litwin SE, Katz SE, Morgan JP, Douglas PS. Serial echocardiographic assessment of left ventricular geometry and function after large myocardial infarction in the rat. *Circulation*. 1994;89:345-354.
20. Arnaud C, Beguin PC, Lantuejoul S, Pepin J-L, Guillermet C, Pelli G, Burger F, Buatois V, Ribout C, Bague J-P, et al. The inflammatory preatherosclerotic remodeling induced by intermittent hypoxia is attenuated by RANTES/CCL5 inhibition. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;184:724-731.
21. Moulin S, Arnaud C, Bouyon S, Pépin J-L, Godin-Ribuot D, Belaidi E. Curcumin prevents chronic intermittent hypoxia-induced myocardial injury. *Thromb Haemostasis*. 2020;111:2040622320922104. <https://doi.org/10.1177/2040622320922104>.
22. Loennechen JP, Støylen A, Beisvag V, Wisløff U, Ellingsen O. Regional expression of endothelin-1, ANP, IGF-1, and LV wall stress in the infarcted rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;280:H2902-H2910.
23. Xie F, Xiao P, Chen D, Xu L, Zhang B. miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant Mol Biol*. 2012;80:75-84.
24. Randerath W, Bonsignore MR, Herkenrath S. Obstructive sleep apnoea in acute coronary syndrome. *Eur Respir Rev*. 2019;28:180114.
25. Lévy P, Kohler M, McNicholas WT, Barbé F, McEvoy RD, Somers VK, Lavie L, Pépin J L. Obstructive sleep apnoea syndrome. *Nat Rev Dis Primers*. 2015;1:15015.
26. Sánchez-de-la-Torre Manuel, Sánchez-de-la-Torre Alicia, Bertran Sandra, Abad Jorge, Durán-Cantolla Joaquín, Cabriada Valentín, Mediano Olga, Masdeu María José, Alonso Mari Luz, Masa Juan Fernando, et al. Effect of obstructive sleep apnoea and its treatment with continuous positive airway pressure on the prevalence of cardiovascular events in patients with acute coronary syndrome (ISAACC study): a randomised controlled trial. *The Lancet Respiratory Medicine*. 2020;8:359-367. [http://dx.doi.org/10.1016/s2213-2600\(19\)30271-1](http://dx.doi.org/10.1016/s2213-2600(19)30271-1).
27. McEvoy RD, Antic NA, Heeley E, Luo Y, Ou Q, Zhang X, Mediano O, Chen R, Drager LF, Liu Z, et al. CPAP for prevention of cardiovascular events in obstructive sleep apnea. *N Engl J Med*. 2016;375:919-931.
28. Heinzer Raphael, Eckert Danny. Treatment for obstructive sleep apnoea and cardiovascular diseases: are we aiming at the wrong target? *The Lancet Respiratory Medicine*. 2020;8:323-325. [http://dx.doi.org/10.1016/s2213-2600\(19\)30351-0](http://dx.doi.org/10.1016/s2213-2600(19)30351-0).
29. El-Armouche A, Eschenhagen T.  $\beta$ -Adrenergic stimulation and myocardial function in the failing heart. *Heart Fail Rev*. 2009;14:225-241.
30. Naghshin J, McGaffin KR, Witham WG, Mathier MA, Romano LC, Smith SH, Janczewski AM, Kirk JA, Shroff SG, O'Donnell CP. Chronic intermittent hypoxia increases left ventricular contractility in C57BL/6J mice. *J Appl Physiol*. 2009;107:787-793.
31. Belaidi E, Joyeux-Faure M, Ribout C, Launois SH, Lévy P, Godin-Ribuot D. Major role for hypoxia inducible factor-1 and the endothelin system in promoting myocardial infarction and hypertension in an animal model of obstructive sleep apnea. *J Am Coll Cardiol*. 2009;53:1309-1317.
32. Hölscher M, Schäfer K, Krull S, Farhat K, Hesse A, Silter M, Lin Y, Pichler BJ, Thistlethwaite P, El-Armouche A, et al. Unfavourable consequences of chronic cardiac HIF-1 $\beta$  stabilization. *Cardiovasc Res*. 2012;94:77-86.
33. Bekeredjian R, Walton CB, MacCannell KA, Ecker J, Kruse F, Outten JT, Sutcliffe D, Gerard RD, Bruck RK, Shohet RV. Conditional HIF-1 $\beta$  expression produces a reversible cardiomyopathy. *PLoS One*. 2010;5:1-11.
34. Li G, Lu W, Wu X, Cheng J, Ai R, Zhou Z, Tang Z. Admission hypoxia-inducible factor 1 $\beta$  levels and in-hospital mortality in patients with acute decompensated heart failure. *BMC Cardiovasc Disord*. 2015;15:79.
35. Groenendyk J, Agellon LB, Michalak M. Coping with endoplasmic reticulum stress in the cardiovascular system. *Annu Rev Physiol*. 2013;75:49-67.
36. Fu HY, Okada K-I, Liao Y, Tsukamoto O, Isomura T, Asai M, Sawada T, Okuda K, Asano Y, Sanada S, et al. Ablation of C/EBP homologous protein attenuates endoplasmic reticulum-mediated apoptosis and cardiac dysfunction induced by pressure overload. *Circulation*. 2010;122:361-369.
37. Yao Y, Lu Q, Hu Z, Yu Y, Chen Q, Wang QK. A non-canonical pathway regulates ER stress signaling and blocks ER stress-induced apoptosis and heart failure. *Nat Commun*. 2017;8:133.
38. Peng YJ, Yuan G, Ramakrishnan D, Sharma SD, Bosch-Marce M, Kumar GK, Semenza GL, Prabhakar NR. Heterozygous HIF-1 $\beta$  deficiency impairs carotid body-mediated systemic responses and reactive oxygen species generation in mice exposed to intermittent hypoxia. *J Physiol*. 2006;577:705-716.
39. Cheong HI, Asosingh K, Stephens OR, Queisser KA, Xu W, Willard B, Hu B, Dermawan JKT, Stark GR, Prasad SVN, et al. Hypoxia sensing through  $\beta$ -adrenergic receptors. *JCI Insight*. 2016;1:21. <http://dx.doi.org/10.1172/jci.insight.90240>.
40. Zhuo X-Z, Wu Y, Ni Y-J, Liu J-H, Gong M, Wang X-H, Wei F, Wang T-Z, Yuan Z, Ma A-Q, et al. Isoproterenol instigates cardiomyocyte apoptosis and heart failure via AMPK inactivation-mediated endoplasmic reticulum stress. *Apoptosis Int J Program Cell Death*. 2013;18:800-810.

- 
41. Dalal S, Foster CR, Das BC, Singh M, Singh K.  $\beta$ -Adrenergic receptor stimulation induces endoplasmic reticulum stress in adult cardiac myocytes: role in apoptosis. *Mol Cell Biochem.* 2012;364:59-70.
  42. George I, Sabbah HN, Xu K, Wang N, Wang J.  $\beta$ -Adrenergic receptor blockade reduces endoplasmic reticulum stress and normalizes calcium handling in a coronary embolization model of heart failure in canines. *Cardiovasc Res.* 2011;91:447-455.
  43. Delbrel E, Soumare A, Naguez A, Label R, Bernard O, Bruhat A, Fafournoux P, Tremblais G, Marchant D, Gille T, et al. HIF-1 $\alpha$  triggers ER stress and CHOP-mediated apoptosis in alveolar epithelial cells, a key event in pulmonary fibrosis. *Sci Rep.* 2018;8:1-14.

## **2. LA DENERVATION SYMPATHIQUE CARDIAQUE CORRIGE L'AGGRAVATION DE FONCTION CARDIAQUE CAUSEE PAR L'HYPOXIE INTERMITTENTE DANS UN MODELE DE CARDIOPATHIE ISCHEMIQUE CHEZ LE RAT**

La mise en évidence d'une activité sympathique précoce et soutenue dans notre étude précédente<sup>280</sup> et le rôle bien décrit de l'hyperactivité sympathique dans la progression de la cardiopathie ischémique<sup>180</sup> nous a conduit à inhiber l'activité sympathique cardiaque. L'objectif était d'évaluer si la dénervation corrigeait le remodelage et la dysfonction cardiaque induits par l'hypoxie intermittente dans la progression de la cardiopathie ischémique.

Les rats Wistar mâles étaient dénervés, par l'ablation des ganglions moyen cervicale et stellaire, de la chaîne sympathique gauche, avant de subir une ligature de l'artère coronaire gauche. Le groupe contrôle subissait une dénervation Sham et une ligature de l'artère coronaire gauche. Ensuite les animaux étaient exposés à l'hypoxie intermittente et à la normoxie pendant 6 et 14 semaines.

A 6 semaines d'exposition à l'hypoxie intermittente les animaux de notre étude précédente ne montraient pas encore de diminution de la fraction d'éjection par rapport à notre groupe normoxique. Nous avons alors évalué dans un premier temps les dérégulations précoces de l'homéostasie calcique. Après 6 semaines d'exposition, les cardiomyocytes de ventricule gauche ont été isolés afin d'étudier les transitoires calciques à l'aide de sondes calciques. L'utilisation d'isoproterenol, un agoniste  $\beta$ -adrénergique, nous a permis d'évaluer la réserve adrénergique des cardiomyocytes.

La fonction et le remodelage cardiaque ont été évalués avec un suivi échocardiographique (à 0, 6 et 12 semaines), l'activité sympathique a été évaluée chez l'animal vigile à l'aide de gilet connecté (7 et 13 semaines). Comme pour l'étude précédente l'hypertrophie, la fibrose et l'apoptose ont été évalués par des techniques histologiques (rouge Sirius, WGA et TUNEL, respectivement) à 14 semaines.

La voie  $\beta$ -adrénergique (substrat de la PKA, GRK2) et certains acteurs de l'homéostasie calcique (PLB, troponine-I) ont été évalués à 6 semaines (sur les cardiomyocytes isolés) et à 14 semaines par western blot.

Pour aller plus loin dans la caractérisation des mécanismes impliqués dans l'aggravation de la cardiopathie par l'hypoxie et évaluer l'impact de la dénervation cardiaque, nous avons effectué une analyse transcriptomique afin de comparer les gènes différentiellement exprimés aux seins des différents groupes. Cette analyse transcriptomique n'est pas encore totalement finalisée et les résultats sont donc présentés pour le moment sous forme d'annexes à l'étude.

Cette étude nous a permis de mettre en évidence que l'activité sympathique cardiaque induite par l'hypoxie intermittente diminue précocement la réserve adrénérique des cardiomyocytes, est responsable de l'aggravation de la fonction cardiaque et participe au remodelage cardiaque (Figure 55).

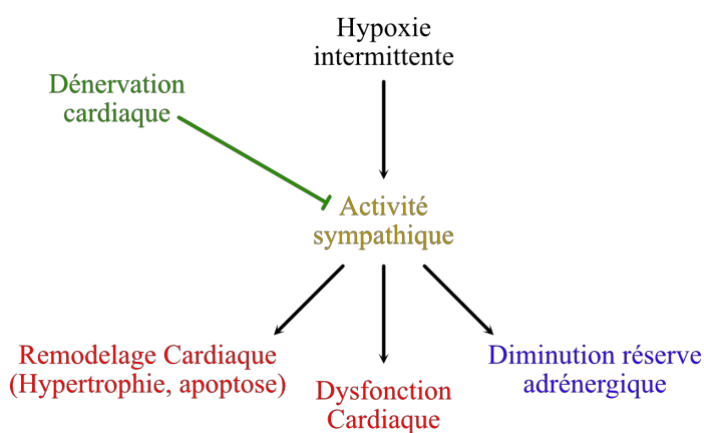


Figure 55. Résultats de la seconde étude : l'activité sympathique induite par l'hypoxie intermittente est responsable de l'aggravation de la cardiopathie ischémique.

La dénervation cardiaque améliore la fonction cardiaque la réserve adrénérique, l'hypertrophie pathologique et l'apoptose.

**Article in progress:**

**Intermittent hypoxia-induced cardiac sympathetic activity is responsible for ischemic cardiomyopathy aggravation in male Wistar rats**

*M. Détrait<sup>1</sup>, J. Gaucher<sup>1</sup>, S. Bouyon<sup>1</sup>, F. Chuffart<sup>2</sup>, C. Pasqualin<sup>3</sup>, JL. Pépin<sup>1</sup>, E. Belaidi<sup>1</sup> and C. Arnaud<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Univ. Grenoble Alpes, Inserm, CHU Grenoble Alpes, HP2, 38000 Grenoble, France

<sup>2</sup> CNRS UMR 5309, Inserm, U1209, University of Grenoble Alpes, Institute for Advanced Biosciences, 38706, Grenoble, France.

<sup>3</sup> Laboratoire CNRS ERL 7368, Signalisation et Transports Ioniques Membranaires, Équipe Physiologie des Cellules Cardiaques et Vasculaires, Tours, France

**Abstract**

**Background** Patients with sleep disordered breathing (SDB) exhibit poor prognosis after myocardial infarction (MI). Intermittent hypoxia (IH), the hallmark feature of SDB, enhances sympathetic activity and accelerates cardiac remodeling and dysfunction in a rat model of ischemic cardiomyopathy. In the present study, we investigate whether specific cardiac sympathetic denervation (CSD) counteracts the IH-induced ischemic cardiomyopathy aggravation.

**Methods** MI is induced in male Wistar rats by permanent ligation of left coronary artery and CSD by ablation of the left middle cervical and stellate ganglions. After surgery, rats are exposed to IH (21–5% FiO<sub>2</sub>, 60 s cycle, 8 h/day) or N for up to 14 weeks. Cardiac sympathetic activity is assessed by spectral analysis of heart rate variability (HRV) from vigil ECG acquired with DECRO, the Etisense® jacket. Cardiac function and remodeling are evaluated by echography. Hearts are withdrawn for cardiomyocyte isolation and calcium transient analysis. Assessment of adrenergic signaling pathways and cardiac sympathetic innervation are done by western blot. Fibrosis, hypertrophy and apoptosis are evaluated by Sirius Red, WGA and TUNEL staining respectively.

**Results** CSD prevents the IH-induced blunted cardiomyocyte response to isoproterenol challenge. CSD decreases tyrosine hydroxylase expression, cardiac sympathetic activity, cardiomyocyte hypertrophy and apoptosis, and improves long-term ejection fraction in MI-IH rats.

**Conclusion** Our results demonstrate that cardiac sympathetic denervation allows to prevent the IH-induced depletion of cardiac adrenergic reserve and associated cardiac contractile dysfunction in a rat model of ischemic cardiomyopathy.

*Key Words:* Intermittent hypoxia; ischemic cardiomyopathy; sympathetic activity; cardiac sympathetic denervation; sleep-disordered breathing

## **Introduction**

Ischemic cardiomyopathy is the leading cause of death worldwide<sup>1</sup>. Therapeutic advances have reduced mortality after myocardial infarction (MI), further increasing the incidence of heart failure<sup>2,3</sup>. It is therefore important to identify the risk factors and associated comorbidities that potentially contribute to the progression of ischemic cardiomyopathy to heart failure and death. Sleep disordered breathing (SDB) is highly prevalent in this population<sup>4</sup> and is associated with an increased risk of recurrent cardiovascular events<sup>5</sup>.

Intermittent hypoxia (IH) is the hallmark feature of SDB characterized by repeated hypoxia-reoxygenation episodes. IH is considered as the major pathological mediator of SDB-induced cardiovascular diseases<sup>6,7</sup>. We and others demonstrated very recently that IH contributes to ischemic cardiomyopathy aggravation, decreasing ejection fraction and contributing to pathological cardiac remodeling<sup>8,9</sup>. In addition, IH triggers chronic and sustained sympathetic nervous system (SNS) activity<sup>8,10,11</sup>, which may aggravates the development of ischemic cardiomyopathy<sup>12</sup>. Another IH-induced pathogenic mechanism that could also play an aggravating role the ischemic cardiomyopathy progression is the calcium homeostasis dysregulation. Indeed, calcium homeostasis dysregulation contributes to early dysfunctions in ischemic cardiomyopathy<sup>13</sup> and IH also seems to disrupt calcium homeostasis<sup>14,15</sup>.

Cardiac sympathetic denervation (CSD) was already use in order to decrease cardiac sympathetic activity in ischemic cardiomyopathy context and CSD limits the ischemic cardiomyopathy progression<sup>16,17</sup>. Finally, it has been recently demonstrated that CSD also decreases IH-induced cardiovascular disorders such as hypertension and atrial fibrillation in a rodent model<sup>18</sup>.

The aim of the present study was to determine whether CSD counteracts the IH-induced ischemic cardiomyopathy aggravation. First, we evaluated the impact of IH and CSD on calcium homeostasis and then, we assessed the impact of CSD on a long-term time course of cardiac function and remodeling in a rat model of ischemic cardiomyopathy.

## **Methods**

### **Animals**

Wistar male rats (5-week-old, 200–220 g, Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France) were housed at the animal care facility of the HP2 Laboratory (approval no. C3851610006) under a 12:12 hours light–dark cycle at 20°C to 22°C and allowed free access to standard food and water. The experimental procedures were conducted in accordance with the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes (Council of Europe, European Treaties ETS 123, Strasbourg, 18 March 1986) and with the Guide for Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publication No. 85-23, revised 1996) and were approved by an Institutional Animal Care and Use Committee (agreement number 2018083016099318 (APAFIS#16577)).

### **Surgical model**

Rats were anesthetized by ketamine (100 mg/kg ip; Imalgene 1000, Merial, France) and xylazine (5 mg/kg ip; Rompun, Bayer, Germany), analgesiated by buprenorphine (0.05 mg/kg sc; Buprécare; Axience, France), intubated, and ventilated in a 50% O<sub>2</sub>–50% air mixture on a volume control ventilator (Rovent; Kent Scientific, Torrington, Connecticut). Anesthesia was maintained with 1% isoflurane (Isoflo; Axience, Pantin, France) in a 50% O<sub>2</sub>–50% air mixture during the procedure. Respiratory rate, tidal volume (Kent Scientific), expired CO<sub>2</sub> (Capnoscan, Kent Scientific) and ECG (Powerlab, ADInstrument) were monitored. Rat temperature was regulated using a rectal probe connected to a heating pad. Following a left thoracotomy, left middle cervical and stellate ganglion were removed, then the pericardium was dissected, and the left anterior coronary artery was ligated using a nonabsorbable braided silk suture (sofsilk 6-0; Covidien, Boulogne-Billancourt, France) (Figure 1.A). The rib cage was closed and the wound sutured (polysorb 4-0, Covidien). Sham-operated rats were subjected to the same surgical procedure except for the CSD. All animals were given 0.05 mg/kg buprenorphine subcutaneously after surgery.

Echocardiography (2D B and M-mode) was performed 3 days after surgery to confirm myocardial infarction and exclude animals with limited reduction of LV ejection fraction (>45%).

## **Intermittent hypoxia**

Rats were randomly exposed to IH or N for 6 and 14 weeks, in our HypE platform (<https://hp2.univ-grenoble-alpes.fr/plateforme-hype> Grenoble, France). Animals were exposed daily to 8 hours of IH or N during their daytime sleep period. The IH stimulus was performed using a specifically designed device, as previously described<sup>19</sup>, with alternating 30 seconds of hypoxia (5% fraction of inspired O<sub>2</sub> (FiO<sub>2</sub>) and 30 seconds of normoxia (21% FiO<sub>2</sub>) (Figure 1.B). FiO<sub>2</sub> was monitored throughout the experiment with a gas analyzer (ML206; AD Instruments, Oxford, UK). Normoxic rats were exposed to air streams to reproduce equivalent levels of noise and turbulence related to gas circulation. Sham rats were maintained in housing cages.

## **Experimental design**

Three days after MI and CSD and echocardiography validation, rats were exposed to 6 weeks IH or N. At the end of exposure, at least 10h after the last exposure, rats were anesthetized with injection of ketamine (100 mg/kg ip, Merial), xylazine (5 mg/kg ip, Bayer) and heparin (1600 UI/kg, ip). Then, cardiomyocyte isolation was realized to assess LV cardiomyocyte calcium transients. Isoproterenol stimulation was done to evaluate the cardiomyocyte adrenergic reserve (Figure 1.C)

Rats were also exposed to 14 weeks IH or N to analyzed cardiac remodeling and function. Echocardiography was realized at 0, 6 and 12 weeks. Vigil ECG was acquired at 7 and 13 weeks for heart rate variability (HRV) analysis. At 14 weeks, rats were anesthetized as previously described, blood was collected from the inferior vena cava and centrifuged 10 minutes at 4500g in order to measure hematocrit. Heart were harvested for histology or molecular biology. Hearts were excised, the LV remote area from infarcts was rapidly frozen in nitrogen, and kept at -80°C (Figure 1.D).

## **Echography**

A longitudinal follow-up of rat LV dimensions and function was performed at 0, 6 and 12 weeks. Rats were anesthetized with 5% isoflurane (Axience) in a 50% O<sub>2</sub> -50% air mixture and maintained with 2-2,5% isoflurane during the procedure in order to maintain a physiological heart rate as much as possible. Using an ultra-high-frequency probe (MS250 13–24 MHz, VisualSonics), diastolic and systolic LV wall thickness, cavity diameter, and ejection fraction were measured and calculated as the mean of 3 cardiac cycles in M-mode long axis.



## **Sympathetic Nervous System Activity**

HRV was carried out from vigil ECG acquired with the DECRO jacket (Etisense, France). ECG was acquired at least 10 h after IH exposure for 1 h. From the 1 h recording, 2 min was selected when rats were as quiet as possible for heart rate variability assessment (LabChart v8, ADInstrument). On frequency domain analysis low frequency (0.2–0.75 Hz) and high frequency (0.75–2.5 Hz) were computed, as well as the low frequency/high frequency ratio, considered as general marker of sympathovagal balance.

## **Cardiomyocyte isolation and calcium transient analysis**

After 6 weeks IH exposure, rats were anesthetized with injection of ketamine (100 mg/kg ip, Merial), xylazine (5 mg/kg ip, Bayer) and heparin (1600 UI/kg, ip). The heart was rapidly removed and retrogradely perfused through the aorta. Enzymatic digestion was performed by perfusion of 0.15 UI/ml Liberase (Roche) at 37°C in isolation buffer (in mM: 7 KHCO<sub>3</sub>; 1.2 MgSO<sub>4</sub>+7 H<sub>2</sub>O; 1.2 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 115 NaCl; 13 NaHCO<sub>3</sub>; 10 HEPES; 10 glucose; 20 taurine; pH adjusted to 7.4) oxygenated with carbogen. At the end of the enzymatic digestion, left ventricle was kept and gently mechanically dissociated.

LV cardiomyocytes were placed in a perfusion chamber mounted on an inverted microscope (LSM710 NLO-LIVE7-Confocor3, MicroCell platform of Institute for Advanced Biosciences, Grenoble). Myocytes were superfused with Tyrode solution at 30°C containing (in mM: 130 NaCl; 5 KCl; 1 MgCl<sub>2</sub>+6 H<sub>2</sub>O; 0.4 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1.36 CaCl<sub>2</sub>+2 H<sub>2</sub>O; 10 HEPES; 10 Glucose at pH 7.4). Myocytes were electrically stimulated at 1 Hz with square-wave pulses (80 mA, 2 ms) delivered through a pair of platinum electrodes (Stimulator HC, ADInstrument).

Cardiomyocytes were loaded with Fluo-4 (AM, Invitrogen). Sarcomere length and fluorescence were simultaneously recorded before and after isoproterenol stimulation (100 nmol/L). Calcium transient analysis was done with an ImageJ macro developed by STIM laboratory (EA 7349, Tours).

## **Histology**

An intracardiac injection of KCl 120 mmol/L stopped rat hearts in diastolic phase. Hearts were harvested, retro-perfused by the aorta with 4% paraformaldehyde in PBS then fixed overnight and embedded in paraffin. Five micrometer sections (CIQLE platform, Lyon, France) were stained for 1 hour with Sirius- red (0.1% of Sirius red in saturated picric acid) and washed twice with acidified water. Interstitial fibrosis density in remote areas of the infarct was determined through ImageJ analysis.

Wheat germ agglutinin Oregon Green 488 conjugate (Molecular Probes) was used in order to measure cardiomyocyte cross-sectional area at a 1/100 dilution for 1 hour. Cross-sectional area analysis was performed using a macro in ImageJ (Stochastic watershed plugin, adapted by Dr A. Fertin, TIMC-IMAG).

Apoptosis was determined through analysis of DNA fragmentation by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling (TUNEL) assay on paraffin embedded sections, following the manufacturer's instruction (Abcam, Cambridge, United Kingdom) as previously described<sup>20</sup>. An Axioscan fluorescent microscope (Zeiss, Göttingen, Germany, ×20) was used to visualize TUNEL-positive red cells and sections were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole. Analyzes were performed on 3 to 4 rats per group and 7 to 15 images per animal were quantified using Image J software (National Institutes of Health, Bethesda, MD). Apoptotic cells were expressed as percentage of nuclear positive red staining per field.

### **Western Blotting**

Frozen samples of remote areas were lysed to extract total proteins (Precellys 24, 6500 rpm, 3 × 20 seconds–5 seconds, Bertin Technology, Montigny le Bretonneux, France; sample lysis buffer: 5 mmol/L EDTA, 1 mmol/L Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 20 mmol/L NaF, 1 mmol/L dithiothreitol, and protease inhibitor cocktails). The protein concentration was calculated using Bradford assay (Bradford's reagent, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Fifteen milligrams of protein were separated by SDS polyacrylamide gels (8%–15%) and transferred to nitrocellulose membranes. Next, membranes were blocked with 5% nonfat milk or BSA in Tris buffered saline with Tween 20 (0.1%). Membranes were then incubated overnight at 4°C with primary antibodies in Tris-buffered saline-Tween 20 (0.1%), 1% BSA, or nonfat milk. The following day, membranes were incubated for 1 hour at room temperature with the appropriate horseradish peroxidase–conjugated anti- IgG (1: 5000, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany). Enhanced chemiluminescence was performed with the Western Blot ECL substrate (Clarity; Bio-Rad, Marnes-la Coquette, France) according to the manufacturer's instructions and video acquisition (ChemiDoc-XRS-System, Bio-Rad). The relative amount of protein was quantified by densitometry (ImageJ). The following antibodies were used: the phospho (ser/thr) PKA (9621, Cell signaling, Ozyme), tyrosine hydroxylase (ab152, Merck Millipore) and calsequestrin (PA1-913, Thermo fischer). Phosphorylated proteins were expressed relative to total proteins, and non-phosphorylated proteins were expressed relative to calsequestrin.

## **Statistical Analysis**

Statistical analysis was performed using RStudio software. Data are expressed as means  $\pm$  SEM. For each comparison group, normality and equal variance were tested using Shapiro–Wilk and Bartlett tests, respectively. When these assumptions were met, results were analyzed using 2-way ANOVA, followed by Tukey test. In other conditions, Kruskal–Wallis test was used, followed by Dunn’s multiple comparison test. A 2-sided  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

## **Results**

### **Impact of IH and CSD on morphological parameters.**

After 14-weeks exposure, hematocrit was increased and body weight was decreased in both MI IH and MI CSD IH groups compared to MI N group (Table1). Otherwise, heart, adrenal gland, lung and infarct weights, as well as tibia length, were not different between each group (Table 1).

### **CSD restores adrenergic reserve depletion induced by IH.**

After 6-weeks exposure, the calcium transient amplitude ( $F/F_0$ ) tended to increase (Figure 2.A), the calcium recapture (tau decay) was increased (Figure 2.B), and no differences were observed in sarcomere shortening (Figure 2.C) in MI IH compared to MI N group. After pharmacological sympathetic activation with isoproterenol, adrenergic reserve was reduced in IH group. Whereas isoproterenol increased calcium transient amplitude, sarcomere shortening and calcium recapture in MI N group, these responses to isoproterenol were blunted in MI IH group (Figure 2. B, D and F).

In MI CSD IH condition, without any stimulation, the amplitude and the sarcomere shortening were decreased compared to MI IH condition (Figure 2.A and C). Nevertheless, after adrenergic stimulation, cardiomyocytes responded to isoproterenol, increasing the calcium transient amplitude, the sarcomere shortening and the calcium recapture in MI CSD IH group compared to MI IH group (Figure 2.B, D and F).

### **CSD decreases sympathetic activity induced by IH and restores cardiac function.**

Cardiac sympathetic activity (LF/HF) was increases since 7 week in MI IH compared to MI N group. Whereas, LF/HF was decreased during all the IH exposure in MI CSD IH group compared to MI IH group (Figure 3.A). LF was mainly representative of sympathetic activity<sup>21</sup> and was decreased at week 13 in MI CSD IH group compared to MI IH group (Table 3).

Three days after coronary artery ligation, we validated the surgical procedure homogeneity by echocardiography (Table 2), confirmed by the infarct weight evaluation at 14 weeks which didn't displayed differences between groups (Table1). The echocardiographic follow-up confirmed that ejection fraction was aggravated in MI IH group compared to MI N group (Figure 3.B). CSD allowed to limit the reduction of ejection fraction at week 12 in MI CSD IH compared to MI IH group (Figure 3.B).

### **CSD limits cardiomyocyte hypertrophy and apoptosis induced by IH.**

At 14 weeks, IH induced cardiomyocyte hypertrophy and increased interstitial fibrosis, as shown by the increase in cross sectional area and Sirius red staining in MI IH group compared to MI N group (Figure 4.A, B, C and D). Whereas cardiomyocyte hypertrophy was reduced in MI CSD IH group compared to MI IH group (Figure 4.A), macroscopic cardiac remodeling evaluated through ventricular wall thickness and internal diameter measurement, was not different between groups at week 14, as shown by ultrasonographic parameters analysis (Table 2). Concerning cardiomyocyte apoptosis, MI IH group, exhibited increased apoptosis, which was prevented in MI CSD IH group compared to MI N group (Figure 4.E and F).

### **CSD decreases tyrosine hydroxylase expression and decreases PKA substrate induced by IH.**

Fourteen weeks intermittent hypoxia increased PKA substrate phosphorylation as shown by the increase in PKA substrate expression in MI IH group compared to MI N group (Figure 5.B). CSD decreased the tyrosine hydroxylase expression, the limiting enzyme responsible for catecholamine synthesis in sympathetic synapse (Figure 5.A), validating CSD surgery. This was associated with a decrease in PKA substrate expression in MI CSD IH animals compared to MI N (Figure 5.B).

### **Discussion**

La discussion des résultats spécifiques de cette étude est en cours d'écriture. Ces résultats, associés aux résultats préliminaires de l'étude transcriptomique seront discutés dans la discussion générale du travail de thèse.

## Bibliography

- 1 Wang H, Naghavi M, Allen C et al. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet*. 2016;388(10053):1459–1544.
- 2 Velagaleti RS, Pencina MJ, Murabito JM et al. Long-term trends in the incidence of heart failure after myocardial infarction. *Circulation*. 2008;118(20):2057–2062.
- 3 Go AS, Mozaffarian D, Roger VL et al. Heart Disease and Stroke Statistics—2013 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2013;127(1). doi:10.1161/CIR.0b013e31828124ad.
- 4 Ludka O, Stepanova R, Vyskocilova M et al. Sleep apnea prevalence in acute myocardial infarction--the Sleep Apnea in Post-acute Myocardial Infarction Patients (SAPAMI) Study. *Int J Cardiol*. 2014;176(1):13–19.
- 5 Zapater A, Sánchez-de-la-Torre M, Benítez ID et al. The Effect of Sleep Apnea on Cardiovascular Events in Different Acute Coronary Syndrome Phenotypes. *Am J Respir Crit Care Med*. 2020. doi:10/gg58h5.
- 6 Dematteis M, Godin-Ribuot D, Arnaud C et al. Cardiovascular consequences of sleep-disordered breathing: Contribution of animal models to understanding of the human disease. *Ilar J*. 2009;50(3):262–281.
- 7 Dewan NA, Nieto FJ, Somers VK. Intermittent Hypoxemia and OSA. *Chest*. 2015;147(1):266–274.
- 8 Bourdier G, Détrait M, Bouyon S et al. Intermittent Hypoxia Triggers Early Cardiac Remodeling and Contractile Dysfunction in the Time-Course of Ischemic Cardiomyopathy in Rats. *J Am Heart Assoc*. 2020. doi:10/gg79v6.
- 9 Du Yunhui, Wang Xiao, Li Linyi et al. miRNA-Mediated Suppression of a Cardioprotective Cardiokine as a Novel Mechanism Exacerbating Post-MI Remodeling by Sleep Breathing Disorders. *Circ Res*. 2020;126(2):212–228.
- 10 Peng Y-J, Overholt JL, Kline D, Kumar GK, Prabhakar NR. Induction of sensory long-term facilitation in the carotid body by intermittent hypoxia: Implications for recurrent apneas. *Proc Natl Acad Sci*. 2003;100(17):10073–10078.
- 11 Morand J, Arnaud C, Pepin J-L, Godin-Ribuot D. Chronic intermittent hypoxia promotes myocardial ischemia-related ventricular arrhythmias and sudden cardiac death. *Sci Rep*. 2018;8(1):2997.
- 12 El-Armouche A, Eschenhagen T.  $\beta$ -Adrenergic stimulation and myocardial function in

the failing heart. *Heart Fail Rev.* 2009;14(4):225–241.

13 Wehrens X, Marks A. Molecular determinants of altered contractility in heart failure. *Ann Med.* 2004;36(sup1):70–80.

14 Yeung H-M, Hung M-W, Lau C-F, Fung M-L. Cardioprotective effects of melatonin against myocardial injuries induced by chronic intermittent hypoxia in rats. *J Pineal Res.* 2015;58(1):12–25.

15 Chen L, Zhang J, Hu X, Philipson KD, Scharf SM. The Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger-1 mediates left ventricular dysfunction in mice with chronic intermittent hypoxia. *J Appl Physiol.* 2010;109(6):1675–1685.

16 Xiong L, Liu Y, Zhou M et al. Targeted ablation of cardiac sympathetic neurons attenuates adverse postinfarction remodelling and left ventricular dysfunction. *Exp Physiol.* 2018;103(9):1221–1229.

17 Ziegler KA, Ahles A, Wille T, Kerler J, Ramanujam D, Engelhardt S. Local sympathetic denervation attenuates myocardial inflammation and improves cardiac function after myocardial infarction in mice. *Cardiovasc Res.* 2018;114(2):291–299.

18 Yang X, Zhang L, Liu H, Shao Y, Zhang S. Cardiac sympathetic denervation suppresses atrial fibrillation and blood pressure in a chronic intermittent hypoxia rat model of obstructive sleep apnea. *J Am Heart Assoc.* 2019;8(4). doi:10.1161/JAHA.118.010254.

19 Arnaud C, Beguin PC, Lantuejoul S et al. The inflammatory preatherosclerotic remodeling induced by intermittent hypoxia is attenuated by RANTES/CCL5 inhibition. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;184(6):724–731.

20 Moulin S, Arnaud C, Bouyon S, Pépin J-L, Godin-Ribuot D, Belaidi E. Curcumin prevents chronic intermittent hypoxia-induced myocardial injury. *Ther Adv Chronic Dis.* 2020. doi:10.1177/2040622320922104.

21 Aubert AE, Ramaekers D, Beckers F et al. The analysis of heart rate variability in unrestrained rats. Validation of method and results. *Comput Methods Programs Biomed.* 1999;60(3):197–213.

## Tables and figures legends

**Figure 1. Design study.** **A**, Rats underwent a ligature of the left coronary artery to induce myocardial infarction (MI) and a left middle cervical and stellar ganglion ablation to induce cardiac sympathetic denervation (CSD) or a sham surgery without CSD. **B**, Three days after surgery rats were randomly exposed to 6 and 14 weeks of intermittent hypoxia (IH) or normoxia (N). **C**, After 6-weeks exposure, calcium transient analysis was realized. **D**, During the 14 weeks of exposure, cardiac remodeling and function was assessed by ultrasonography and cardiac sympathetic activity by heart rate variability analysis.

**Figure 2. After 6-weeks exposure, CSD restores IH-induced depletion of adrenergic reserve in left ventricular cardiomyocytes.** **A**, Calcium transient amplitude ( $F/F_0$ ). **B**, Response of  $F/F_0$  to isoproterenol stimulation. **C**, Sarcomere shortening:  $\frac{\text{diastolic sarcomere length} - \text{systolic sarcomere length}}{\text{diastolic sarcomere length}}$ . **D**, Response of sarcomere shortening to isoproterenol stimulation. **E**, Tau decay representing the calcium recapture and ejection from the sarcomere. **F**, Response of tau decay to isoproterenol stimulation. Values are mean  $\pm$  SEM; n=6-10 animals per groups; N=60-109 cells per groups; \*P < 0.05.

**Figure 3. Cardiac sympathetic denervation restores IH-induced cardiac dysfunction and sympathetic hyperactivity.** **A**, Low frequency on high frequency ratio (LF/HF) representing cardiac sympathetic activity over the time. **B**, Echocardiographic measurement of ejection fraction (EF) over time. Values are mean  $\pm$  SEM; n=6-10 animals per groups; \*P < 0.05 vs MI-N, #P < 0.05 vs MI-CSD-IH.

**Figure 4. Cardiac sympathetic denervation prevents IH-induced cardiac hypertrophy and apoptosis.** **A**, Measurement of cardiomyocytes cross-sectional area. n=3 to 4 animals per group, around 300 cells per animal; **B**, Representative images of wheat germ agglutinin staining. **C**, Interstitial fibrosis evaluated in the LV remote area as a percentage of Sirius red staining relative to cardiomyocytes area. n=3 to 4 animals per group, around 10 images per animal. **D**, Representative images of Sirius red staining. **E**, Apoptotic cells quantified in the LV remote area and expressed as percentage of nuclear positive red staining per field. n=3 to 4 animals per group, around 3 images per animal. **F**, Representative images of TUNEL staining. Values are mean  $\pm$  SEM; \*P < 0.05.



**Figure 5. Effect of IH exposure and CSD on tyrosine hydroxylase and PKA substrate expression.** **A**, Tyrosine hydroxylase expression relative to calsequestrin. **B**, Protein kinase A substrate expression relative to calsequestrin. Values are normalized to MI N group and expressed as mean  $\pm$  SEM. n=6 to 8 per group; \*P < 0.05.

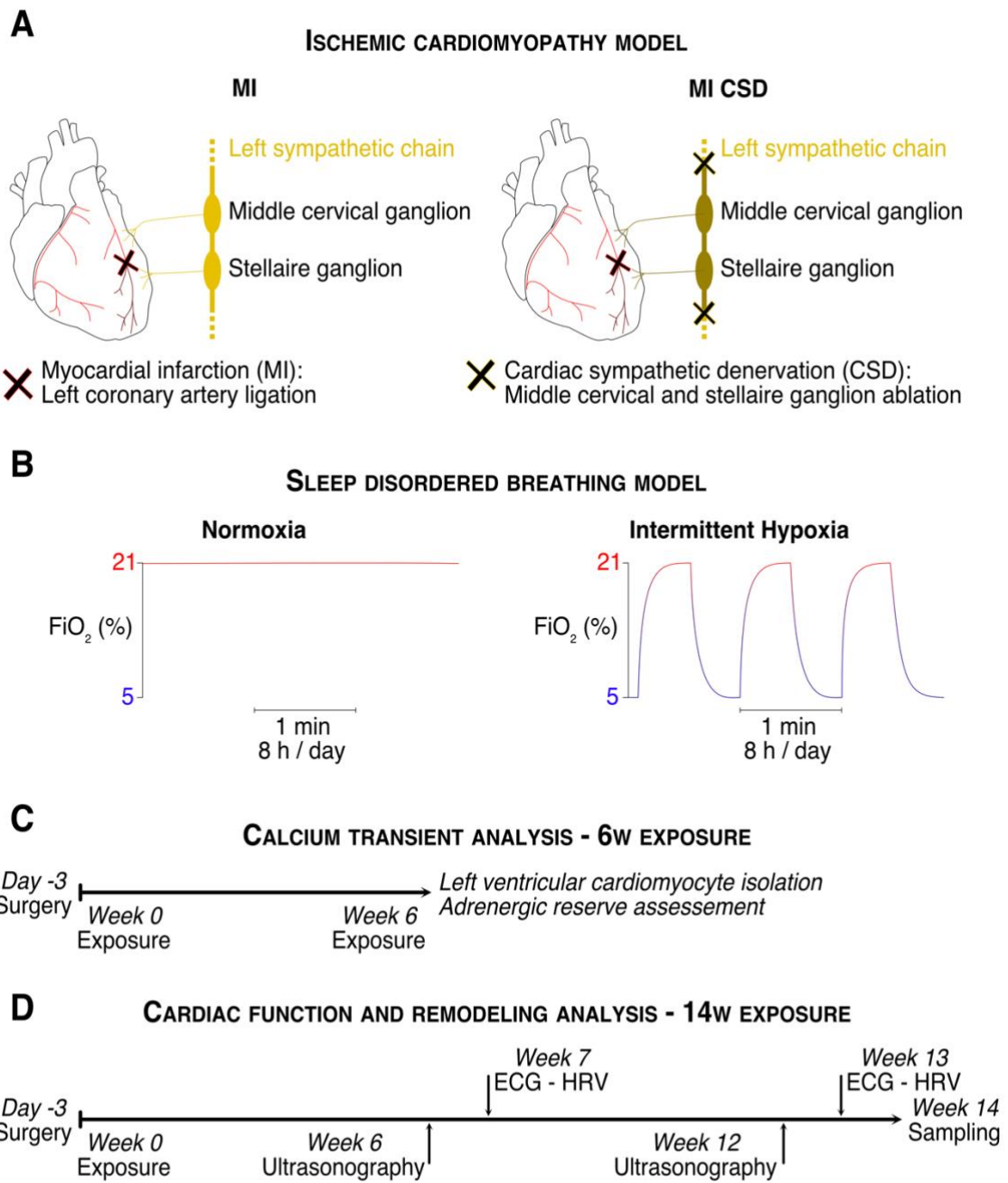
**Table 1. Effects of IH and CSD on morphometric parameters.** Values are mean  $\pm$  SEM. n=9 to 11 per group. TL, Tibia length.

**Table 2. Effects of IH and CSD on echocardiographic parameters at 0-, 6- and 12-weeks exposure.** Values are mean  $\pm$  SEM. n=9 to 11 per group. LVIDd, left ventricular internal diameter in diastole; LVIDs, left ventricular internal diameter in systole; LVPWd, left ventricular posterior wall thickness in diastole; LVPWs, left ventricular posterior wall thickness in systole; LVFS, left ventricular fractional shortening; LVEF, left ventricular ejection fraction.

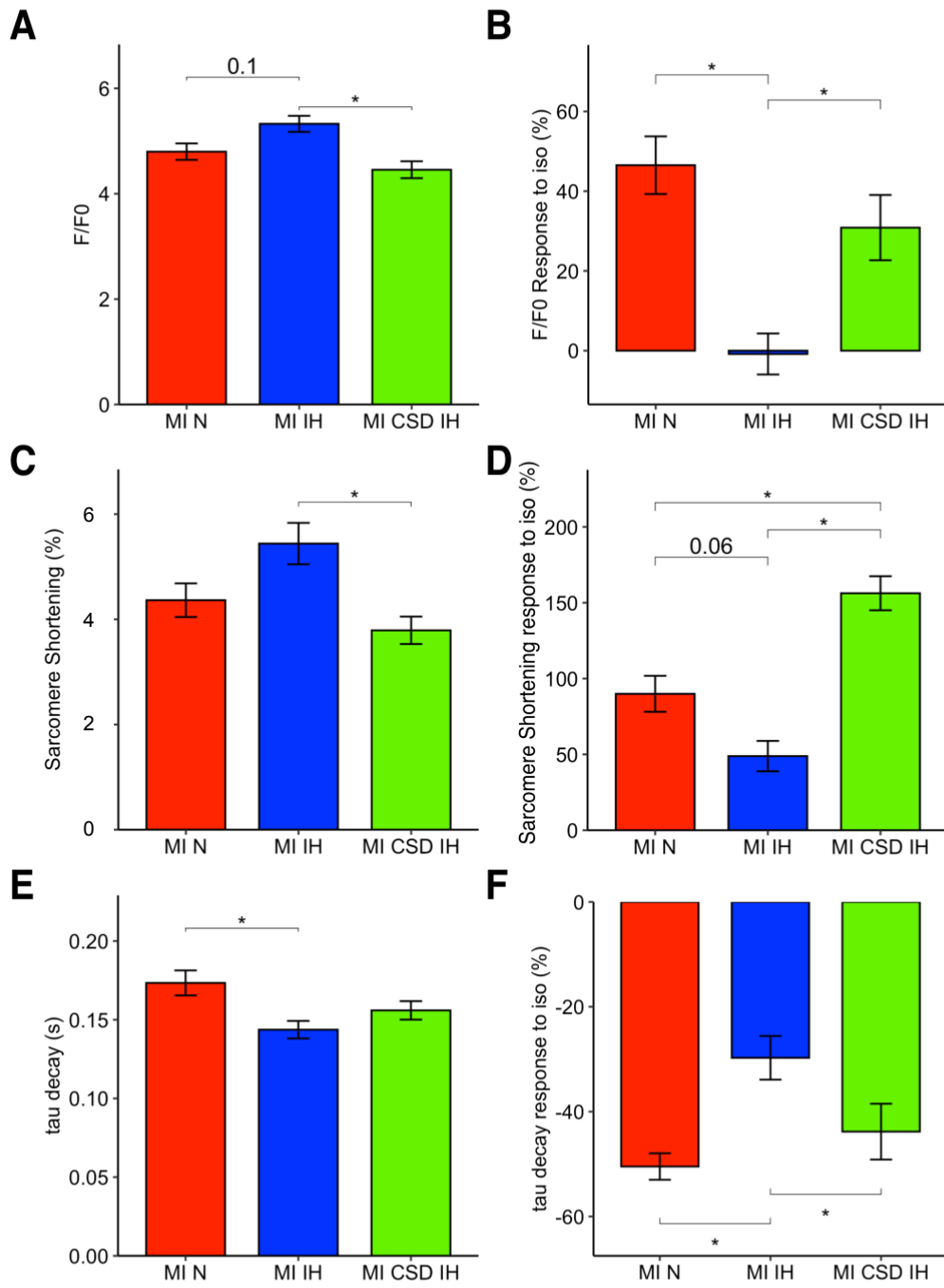
**Table 3. Effects of IH and CSD on heart rate variability parameters at 7- and 13-weeks exposure.** Values are mean  $\pm$  SEM. n=7 to 11 per group. SDNN, standard deviation of NN intervals; RMSSD, root mean square of successive differences; LF, low frequency; HF, high frequency; VLF, very low frequency.

Figures

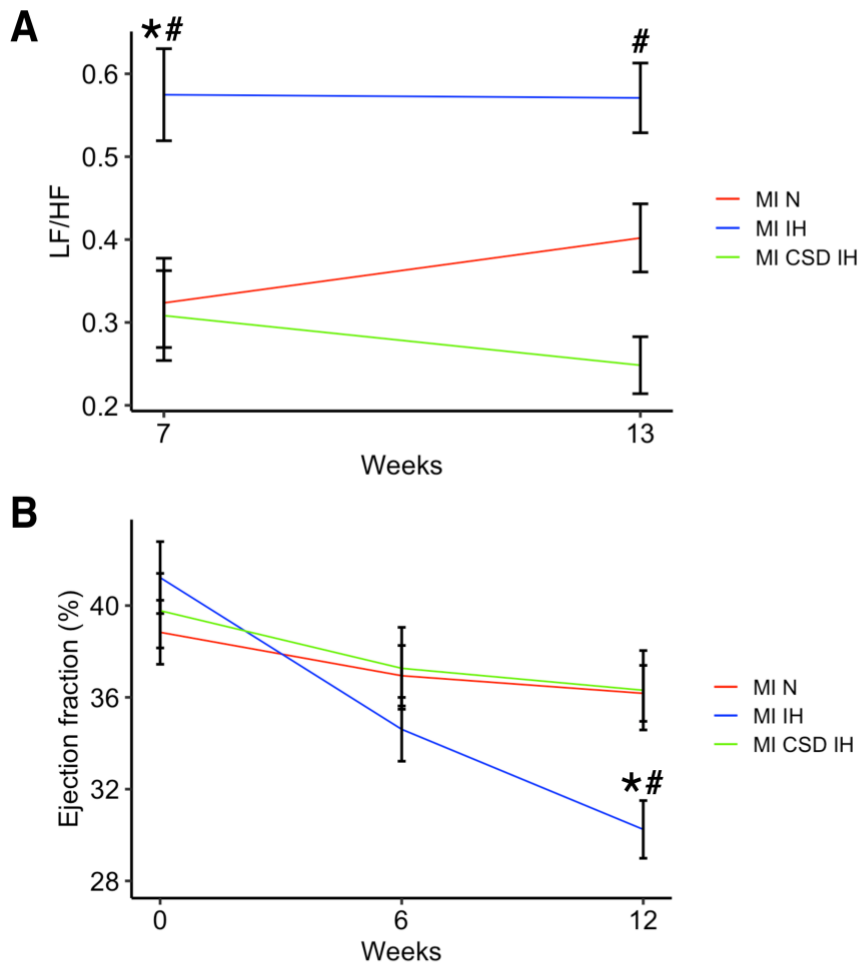
FIGURE 1



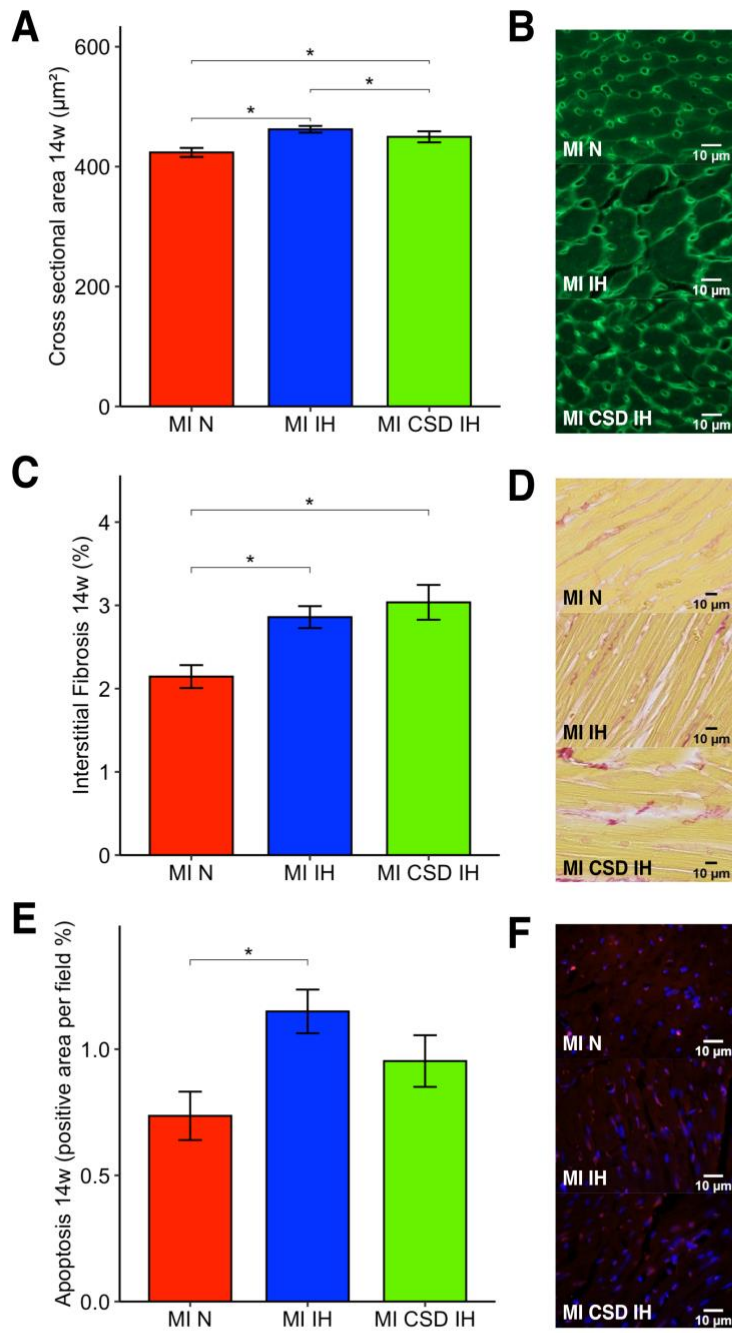
**FIGURE 2**



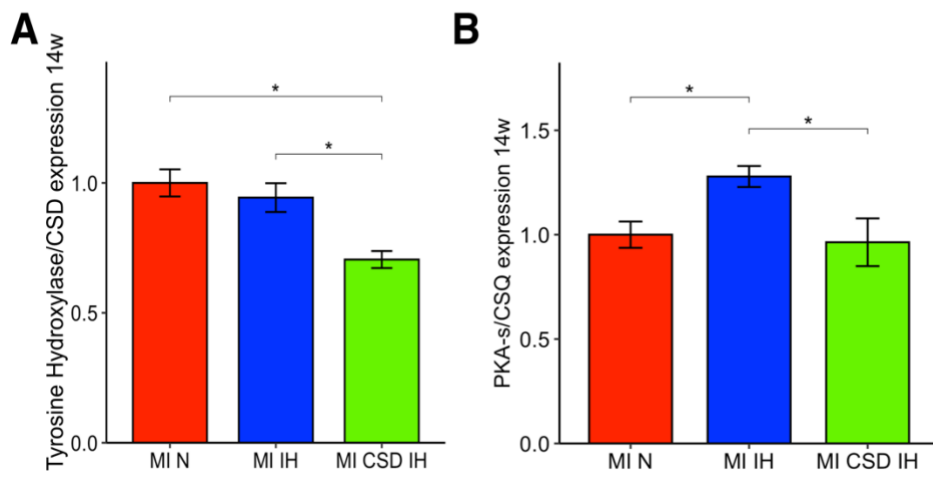
**FIGURE 3**



**FIGURE 4**



**FIGURE 5**



**TABLE 1**

Morphological parameters 14 w	MI N	MI IH	MI CSD IH	p-value MI IH vs		p-value MI N vs
				MI N	MI CSD IH	MI CSD IH
Body weight (g)	534.6 ± 52.6	471.7 ± 50.8	451.3 ± 33.0	<b>0.02</b>	0.60	<b>0.00</b>
Tibia length (mm)	41.25 ± 1.55	41.32 ± 2.00	40.11 ± 1.16	1.00	0.25	0.32
Hematocrit (%)	47.25 ± 3.06	56.36 ± 4.03	56.67 ± 3.57	<b>0.00</b>	0.98	<b>0.00</b>
Infarct weight (mg)	104.5 ± 12.3	126.7 ± 59.4	133.6 ± 25.9	1.00	1.00	0.65
Heart weight/TL (mg/mm)	34.14 ± 4.47	31.44 ± 1.85	32.27 ± 3.45	0.38	0.90	0.66
Adrenal gland weight/TL (mg/mm)	1.43 ± 0.26	1.37 ± 0.12	1.42 ± 0.19	0.79	0.86	0.99
Lung weight/TL (mg/mm)	43.91 ± 5.28	47.69 ± 5.94	44.14 ± 3.39	0.24	0.28	1.00

**TABLE 2**

Cardiac ultrasonography	MI N	MI IH	MI CSD IH	p-value MI IH vs		p-value MI N vs
				MI N	MI CSD IH	MI CSD IH
<b>0 week</b>						
Heart rate (bpm)	419.5 ± 25.7	414.3 ± 29.5	404.0 ± 28.0	0.90	0.69	0.45
LVIDd (mm)	9.37 ± 0.85	9.31 ± 0.96	8.99 ± 0.44	0.99	0.65	0.57
LVIDs (mm)	7.51 ± 0.76	7.34 ± 0.89	7.17 ± 0.53	0.87	0.87	0.59
LVPWd (mm)	1.36 ± 0.25	1.49 ± 0.29	1.62 ± 0.22	0.48	0.51	0.09
LVPWs (mm)	2.14 ± 0.33	2.48 ± 0.44	2.41 ± 0.25	0.09	0.88	0.26
LVFS (%)	19.88 ± 2.50	21.29 ± 3.06	20.39 ± 2.81	0.50	0.76	0.92
LVEF (%)	38.84 ± 4.41	41.22 ± 5.20	39.78 ± 4.88	0.51	0.79	0.91
<b>6 week</b>						
Heart rate (bpm)	365.3 ± 26.3	340.9 ± 28.5	366.2 ± 41.6	0.24	0.21	1.00
LVIDd (mm)	10.79 ± 0.63	10.45 ± 0.70	10.66 ± 0.67	0.51	0.78	0.91
LVIDs (mm)	8.75 ± 0.68	8.63 ± 0.82	8.63 ± 0.78	0.94	1.00	0.94
LVPWd (mm)	1.82 ± 0.33	2.20 ± 0.53	1.75 ± 0.29	0.12	<b>0.05</b>	0.93
LVPWs (mm)	2.78 ± 0.44	3.06 ± 0.39	2.75 ± 0.32	0.24	0.19	0.19
LVFS (%)	18.95 ± 2.24	17.58 ± 2.57	19.15 ± 3.10	0.47	0.81	1.00
LVEF (%)	36.94 ± 3.96	34.61 ± 4.61	37.27 ± 5.36	0.51	0.84	1.00
<b>12 week</b>						
Heart rate (bpm)	345.9 ± 25.4	333.4 ± 20.0	354.8 ± 25.6	0.70	0.21	1.00
LVIDd (mm)	11.30 ± 0.73	10.78 ± 0.75	10.80 ± 0.77	0.26	1.00	0.32
LVIDs (mm)	9.21 ± 0.77	9.15 ± 0.80	8.80 ± 0.84	1.00	1.00	1.00
LVPWd (mm)	2.02 ± 0.49	2.01 ± 0.41	2.16 ± 0.60	1.00	1.00	1.00
LVPWs (mm)	2.96 ± 0.52	2.70 ± 0.33	3.10 ± 0.62	0.47	0.19	0.80
LVFS (%)	18.56 ± 0.69	15.16 ± 0.69	18.60 ± 0.99	<b>0.01</b>	<b>0.04</b>	1.00
LVEF (%)	36.18 ± 3.86	30.25 ± 4.17	36.31 ± 5.19	<b>0.01</b>	<b>0.05</b>	1.00

**TABLE 3**

Heart rate variability	MI N	MI IH	MI CSD IH	p-value MI IH vs		p-value MI N vs
				MI N	MI CSD IH	MI CSD IH
<b>7 week</b>						
Heart rate (bpm)	418.1 ±43.3	356.2 ±46.1	356.6 ±38.8	<b>0.02</b>	1.00	<b>0.03</b>
SDNN	4.13 ±1.42	5.82 ±2.43	4.67 ±1.34	0.12	0.40	0.81
RMSSD	3.07 ±1.20	3.90 ±1.06	3.95 ±0.89	0.21	0.99	0.24
LF	0.62 ±0.34	3.60 ±2.63	1.12 ±0.66	<b>0.01</b>	0.48	0.48
HF	2.05 ±0.94	5.76 ±3.44	3.63 ±1.92	<b>0.03</b>	1.00	0.35
VLF	12.32 ±10.71	15.08 ±6.90	13.83 ±11.26	0.81	0.96	0.94
LF/HF	0.32 ±0.17	0.57 ±0.18	0.31 ±0.15	<b>0.01</b>	<b>0.01</b>	0.98
<b>13 week</b>						
Heart rate (bpm)	410.7 ±31.8	339.4 ±50.2	362.5 ±70.6	<b>0.02</b>	0.60	0.15
SDNN	3.87 ±1.80	6.22 ±2.66	4.86 ±2.10	0.07	0.39	0.62
RMSSD	2.58 ±0.62	4.45 ±1.51	3.32 ±1.40	<b>0.01</b>	0.15	0.46
LF	0.56 ±0.29	4.28 ±2.66	1.80 ±3.21	<b>0.00</b>	<b>0.03</b>	1.00
HF	1.69 ±1.27	7.47 ±4.95	5.62 ±7.61	<b>0.01</b>	0.31	0.47
VLF	9.50 ±7.80	20.12 ±15.38	10.85 ±9.92	<b>0.00</b>	0.31	0.47
LF/HF	0.40 ±0.12	0.57 ±0.14	0.25 ±0.10	0.14	<b>0.00</b>	0.15



## Annexes

Dans le but d'identifier les mécanismes mis en jeu dans la restauration de la fonction cardiaque suite à la dénervation sympathique cardiaque, nous avons effectué un transcriptome des ventricules gauches de nos rats exposés 14 semaines à l'hypoxie intermittente. L'analyse de ce transcriptome est encore en cours, néanmoins, elle a permis de détecter plus de 17 000 gènes différentiellement exprimés au sein de nos différents groupes. En plaçant un seuil de significativité à 0,05 et en supprimant les gènes où le comptage de transcrite était de zéro, nos résultats préliminaires ont permis de montrer que des centaines de gènes sont surexprimés ou sous-exprimés entre nos différents groupes (Tableau 5). Par exemple 167 gènes sont surexprimés dans le groupe MI IH par rapport au groupe MI N.

	Nombre de gènes surexprimés	Nombre de gènes sous-exprimés	Total
MI IH vs MI N	167	137	304
MI CSD IH vs MI IH	154	169	323

Tableau 5. Nombre de gènes différentiellement exprimés entre les différents groupes.

Les bases de données de *Gene ontology* (GO) nous permettent d'identifier des familles de gènes, des voies de signalisation ou des processus biologiques dérégulés dans nos conditions expérimentales. Pour mon analyse préliminaire j'ai utilisé les bases de données de DAVID (*The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* 6.8) et en particulier la classification des gènes en processus biologiques : GOBP (*Gene ontology biological process*) (Figure 56).

Ces analyses montrent que l'hypoxie intermittente induit une surexpression des gènes impliqués dans la réponse à l'AMPc ou encore dans l'organisation de la matrice extracellulaire (Figure 56.A). En comparant nos gènes dérégulés par l'hypoxie intermittente avec ceux du transcriptome publié récemment par Du Yunhui *et al.*<sup>76</sup>, (modèle de cardiopathie ischémique exposé à l'hypoxie intermittente chez la souris), la famille de gènes « *activation of protein kinase activity* » est la seule qui ressort de manière significative comme étant en commune aux deux modèles (Figure 56.B). Ces résultats préliminaires confirment l'importance de l'activation sympathique dans la réponse à l'hypoxie intermittente et ce, même sur un modèle différent, non développé par notre laboratoire.

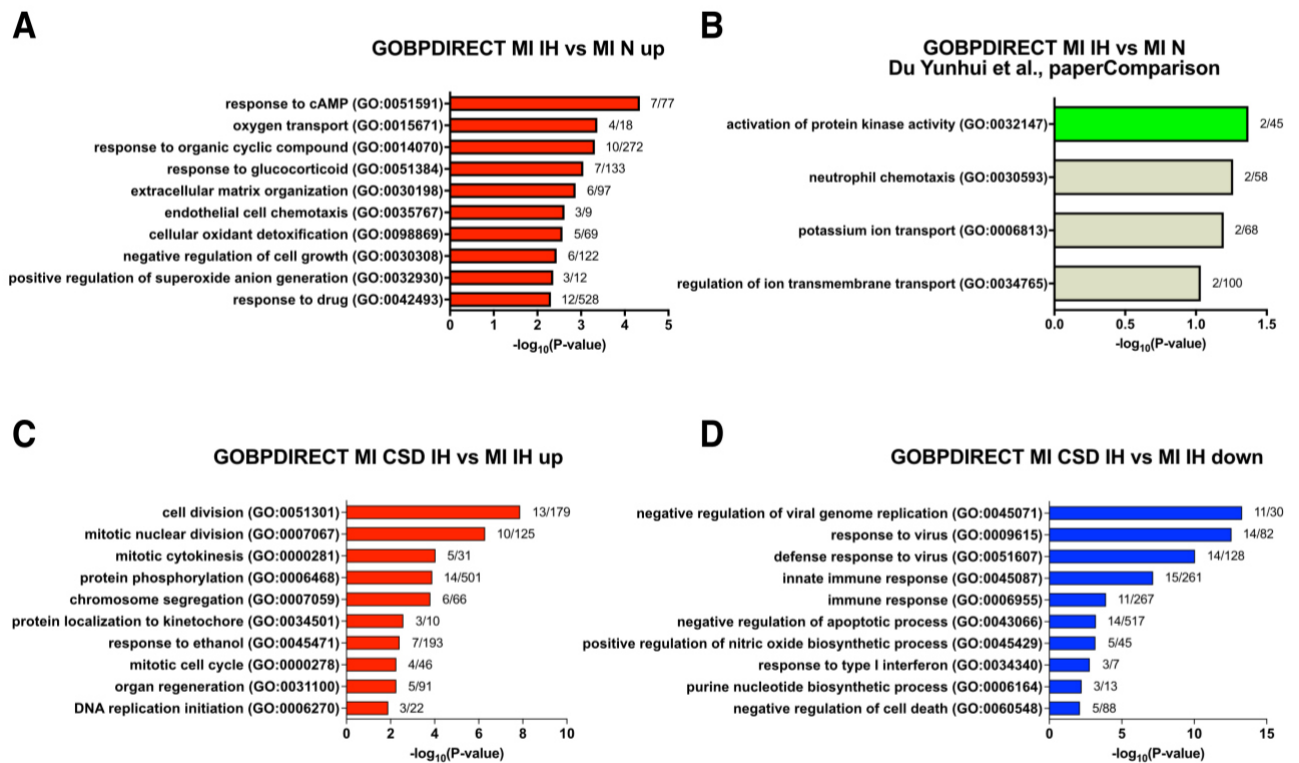


Figure 56. Analyse GOBP, top 10 des gènes dérégulés par l'hypoxie intermittente et par la dénervation en condition d'hypoxie intermittente.

A. GOPB des gènes surexprimés dans le groupe MI IH comparé au groupe MI N. B. GOPB des gènes dérégulés en commun avec le transcriptome de l'article de Du Yunhui et al. C. GOPB des gènes surexprimés dans le groupe MI CSD IH comparé au groupe MI IH. D. GOPB des gènes sous-exprimés dans le groupe MI CSD IH comparé au groupe MI IH. En B, les parties grises ne sont pas statistiquement significatives.  $n=5$  animaux par groupes.

En comparant les gènes différentiellement exprimés dans le groupe MI CSD IH vs MI IH, les résultats préliminaires montrent qu'il semble y avoir une surexpression des gènes impliqués dans la division cellulaire et dans la régénération d'organe (Figure 56.C), alors qu'il y aurait une diminution d'expression des gènes impliqués dans la réponse immunitaire (Figure 56.C).

Les analyses transcriptomiques permettent d'identifier de nombreuses voies de signalisation qui pourraient être impliquées dans l'impact délétère de l'hypoxie intermittente ou encore dans la restauration de la fonction cardiaque induite par la dénervation sympathique cardiaque.

Une confirmation de ces résultats par RT-qPCR est nécessaire afin de valider ce transcriptome. Comme décrit précédemment une diminution de la réponse inflammatoire suite à la dénervation pourrait participer à la moindre progression de la cardiopathie ischémique.

# DISCUSSION

## 1. PRINCIPAUX RESULTATS

Nous avons mis en évidence au cours de cette de thèse que l'hypoxie intermittente, une des caractéristiques des TRS, aggrave le remodelage et la fonction cardiaque dans un modèle de cardiopathie ischémique chez le rat. En effet, 12 semaines d'hypoxie intermittente post-infarctus du myocarde, diminue la fraction d'éjection du ventricule gauche, induit un œdème pulmonaire, une hypertrophie et une apoptose des cardiomyocytes, ainsi qu'une fibrose interstitielle. Du Yunhui *et al.*, sur un modèle de cardiopathie ischémique chez la souris exposée à l'hypoxie intermittente, retrouvent une diminution de la fraction d'éjection et un remodelage plus important, une hypertrophie et une fibrose cardiaque<sup>76</sup>. Jusqu'à maintenant les effets de l'hypoxie intermittente sur le développement de la cardiopathie étaient controversés. Sur un modèle de rats rendus insuffisants cardiaques par 12 semaine de constriction aortique, Li *et al.*, avaient mis en évidence que 4 semaines d'hypoxie intermittente participaient à l'aggravation de la dysfonction cardiaque<sup>78</sup>. A l'inverse, chez des souris qui surexpriment TNF $\alpha$  et développent une insuffisance cardiaque, Nagshin *et al.*, mettaient en évidence un effet adaptatif de 4 semaines d'hypoxie intermittente, discutant l'effet aigu de l'activité sympathique comme pouvant être responsable de cette amélioration de fonction cardiaque<sup>77</sup>. Effectivement, l'activité sympathique est bien décrite pour être augmentée suite à un épisode d'hypoxie intermittente<sup>208</sup> et pour améliorer la fonction cardiaque en aigu, constituant dans ce contexte un mécanisme adaptatif<sup>92</sup>.

Au niveau mécanistique, nous avons mis en évidence grâce à la première étude présentée dans ce manuscrit, une augmentation précoce et soutenue de l'activité sympathique, associée à une augmentation de l'expression de HIF-1 $\alpha$  nucléaire et à un stress du RE pro-apoptotique.

Nous l'avons décrit tout au long de ce manuscrit, l'activité sympathique est bien décrite pour participer à la progression de la cardiopathie ischémique et son augmentation dans notre modèle d'hypoxie intermittente pourrait contribuer à l'aggravation de la cardiopathie ischémique<sup>180</sup>. En ce qui concerne l'expression de HIF-1 $\alpha$  nucléaire, dans une étude précédente, Hölscher *et al.*, avaient mis en évidence à l'aide de souris transgénique qui surexprime HIF-1 $\alpha$ , qu'une augmentation de la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  altérait l'homéostasie calcique, et associé à une constriction aortique, dégradait fortement la fonction cardiaque<sup>253</sup>. Dans une autre étude, Bekerejan *et al.*, ont mis en évidence qu'une surexpression de HIF-1 $\alpha$  seule est suffisante pour induire une dysfonction contractile et participer au développement d'une cardiomyopathie<sup>254</sup>. Enfin, chez des patients souffrants de cardiomyopathie, l'expression de HIF-1 $\alpha$  cardiaque et plasmatique était plus importante chez les patients ayant une pathologie plus avancée<sup>253,255</sup>.

Ainsi, tous ces résultats suggèrent que l'augmentation de l'expression de HIF-1 $\alpha$  par l'hypoxie intermittente dans notre modèle pourrait contribuer à l'aggravation de la cardiopathie ischémique.

Concernant le stress du RE pro-apoptotique, celui-ci a également été décrit comme pouvant contribuer à l'aggravation de nombreuses maladies cardiovasculaires<sup>265</sup>. La diminution du stress du RE dans un modèle de constriction aortique limite l'apoptose des cardiomyocytes et la progression de l'insuffisance cardiaque<sup>270</sup>. Par ailleurs, un stress du RE pro-apoptotique, évalué par l'augmentation de l'expression du facteur apoptotique CHOP, est retrouvé chez des patients souffrant de cardiopathie ischémique<sup>267</sup>. Ainsi, l'apparition d'un stress du RE au cours de l'exposition de notre modèle de cardiopathie ischémique à l'hypoxie intermittente pourrait participer également à l'aggravation de la cardiopathie ischémique.

D'autre part, de nombreuses études ont montré que ces mécanismes sont tous interconnectés. L'activité sympathique est diminuée chez des souris déficientes pour le gène HIF-1 $\alpha$ <sup>5</sup>. HIF-1 $\alpha$  pourrait alors participer à l'augmentation de l'activité sympathique retrouvée dans notre modèle. Cependant, Cheong *et al.*, ont au contraire mis en évidence que l'activité sympathique augmente l'expression et la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  dans le rein<sup>280</sup>. L'activité sympathique est également connue pour augmenter le stress du RE et participer à la dysfonction cardiaque<sup>281</sup>, le stress du RE pouvant lui aussi induire HIF-1 $\alpha$ <sup>68</sup>. Enfin, HIF-1 $\alpha$  est décrit pour augmenter le stress du RE et participer à l'apoptose ou à l'augmentation de la sensibilité du myocarde à l'ischémie reperfusion<sup>257,282</sup>. L'interconnexion complexe de ces mécanismes ne nous permet pas de déterminer le mécanisme majoritairement responsable de ces dérégulations et de l'aggravation de la cardiopathie ischémique.

Cette première étude ne nous permettait donc pas de conclure sur le rôle spécifique de chacun des acteurs. Dans notre modèle, l'augmentation de l'activité sympathique étant le mécanisme le plus précoce et qui perdure tout au long du protocole, nous avons dans deuxième étude, décidé d'inhiber spécifiquement l'activité sympathique cardiaque afin de déterminer le rôle de celle-ci dans l'aggravation de la cardiopathie ischémique chez le rongeur exposé à l'hypoxie intermittente.

Afin de limiter l'activité sympathique cardiaque, nous avons développé un modèle de dénervation sympathique cardiaque. Des modèles similaires ont déjà été utilisés dans le contexte de la cardiopathie ischémique. Il a notamment été décrit que la dénervation sympathique cardiaque limite la dysfonction cardiaque suite à un infarctus du myocarde dans un modèle de chien ou encore de souris<sup>221,222</sup>. Dans un contexte d'hypoxie intermittente, une

étude récente a montré que la dénervation sympathique cardiaque chez le rat diminue la susceptibilité à la fibrillation atriale<sup>62</sup>. Dans notre étude, la dénervation sympathique cardiaque nous a, de la même manière, permis de montrer que l'activité sympathique induite par l'hypoxie intermittente contribue à la progression de la cardiopathie ischémique. En effet, la fraction d'éjection est améliorée, l'hypertrophie des cardiomyocytes diminuée, et nous n'observons plus d'apoptose suite à la dénervation sympathique cardiaque.

Nous nous sommes également intéressés à l'homéostasie calcique puisque sa dérégulation est bien décrite pour participer à la dysfonction contractile<sup>148</sup> et que l'hypoxie intermittente semble également induire une dérégulation de cette homéostasie<sup>161,163</sup>. Nous avons montré que l'hypoxie intermittente impacte peu l'homéostasie calcique. A l'état basal, nous observons une tendance à l'augmentation de l'amplitude des transitoires calciques et une augmentation de la recapture de calcium. Une meilleure recapture pourrait conduire à une augmentation du calcium dans le RS, seulement pour des raisons techniques nous n'avons pas pu évaluer la charge du RS à l'aide d'une stimulation à la caféine. Si l'augmentation de l'amplitude des transitoires et une meilleure recapture pourraient être un mécanisme adaptatif, nos résultats ressemblent à ceux de Hölscher *et al.* qui montraient que la surexpression d'HIF-1 $\alpha$  augmentait l'amplitude des transitoires calciques et la recapture, cependant ces modifications de l'homéostasie calcique étaient associées à une progression plus importante de l'insuffisance cardiaque dans un modèle de constriction aortique<sup>253</sup>.

Nos expériences sur les cardiomyocytes nous ont également permis de mettre en évidence que l'hypoxie intermittente diminue la réserve adrénergique des cardiomyocytes et que la dénervation sympathique rétablit cette réponse adrénergique. Ces résultats sont concordants avec ceux d'études précédentes dans des contextes physiopathologiques différents. Par exemple, Reboul *et al.*, avaient montré qu'une exposition au monoxyde de carbone diminuait la réserve adrénergique des cardiomyocytes et contribuait à l'aggravation de l'insuffisance cardiaque<sup>283</sup>.

La comparaison de nos résultats de calcium avec ceux d'Hölscher *et al.*<sup>253</sup>, ou encore le lien étroit qui existe entre les perturbations de l'homéostasie calcique et le stress du RE<sup>284</sup>, montre encore une fois que tous ces mécanismes sont intimement liés. Si nous revenons sur les mécanismes que nous avons mis en évidence dans la première étude, il sera intéressant d'évaluer l'impact de la dénervation sympathique cardiaque sur l'expression nucléaire de HIF-1 $\alpha$  cardiaque ou encore le stress du RE pro-apoptotique (Figure 57).

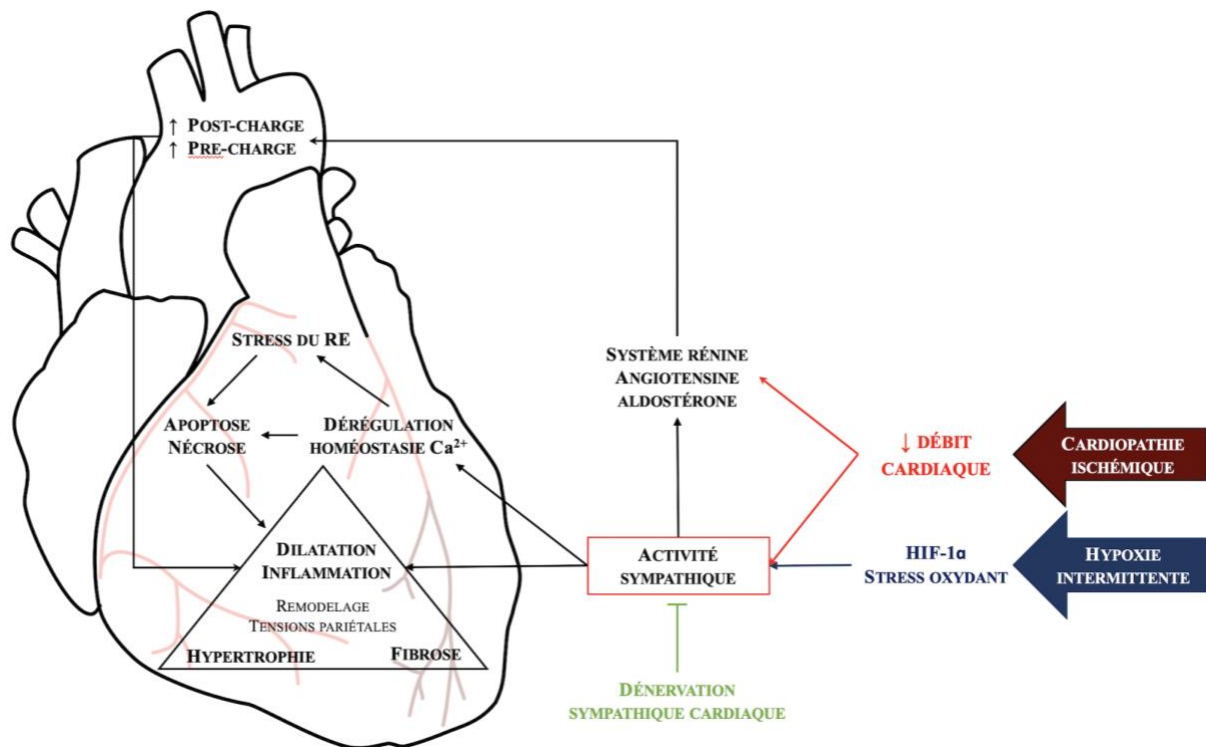


Figure 57. L'activité sympathique induite par l'hypoxie intermittente est responsable de l'aggravation de la cardiopathie ischémique.

Par ailleurs, bien que nos résultats mettent en évidence l'importance de l'hyperactivité sympathique sur la progression de la cardiopathie ischémique d'un point de vue fonctionnel, les analyses histologiques et biochimiques n'ont pas permis de déterminer de voies de signalisation clairement responsables de l'amélioration de fonction cardiaque suite à la dénervation. L'apoptose et l'hypertrophie induites par l'hypoxie intermittente sont réduites par l'intervention chirurgicale, mais aucune amélioration n'est décelable sur la fibrose. De plus, concernant l'expression protéique des acteurs de l'homéostasie calcique ou de la signalisation adrénergique, nous n'observons pas de différence importante entre nos différents groupes, à l'exception d'une diminution de la phosphorylation des substrats de la PKA.

Ainsi, afin d'identifier d'autres mécanismes, peut-être plus spécifiques de l'hypoxie intermittente et de la dénervation sympathique cardiaque, nous avons effectué un transcriptome. Les résultats préliminaires montrent qu'au sein de nos animaux qui ont tous une cardiopathie ischémique, l'hypoxie intermittente induit une surexpression des gènes impliqués dans la réponse à l'AMPC ou encore dans l'organisation de la MEC.

La comparaison de notre transcriptome avec celui publié récemment par Du Yunhui *et al.*,<sup>76</sup> qui ont utilisé un modèle de cardiopathie ischémique exposé à l'hypoxie intermittente chez la souris, fait ressortir la famille de gènes « *activation of protein kinase activity* » comme étant dérégulée par l'hypoxie intermittente. Ces résultats préliminaires confirment l'importance de l'activation sympathique dans la réponse à l'hypoxie intermittente.

La dénervation cardiaque semble quant à elle, induire une surexpression des gènes impliqués dans la division cellulaire et dans la régénération d'organe et diminuerait l'expression des gènes impliqués dans la réponse immunitaire. De manière surprenante nous ne retrouvons pas de dérégulation de la voie  $\beta$ -adrénergique et le cœur étant un organe post-mitotique, la surexpression des gènes impliqués dans la division cellulaire pose de nombreuses questions. La diminution des gènes impliqués dans la réponse inflammatoire suite à la dénervation sympathique cardiaque pourrait limiter la progression de la cardiopathie ischémique.

Cette analyse transcriptomique, une fois affinée, nous permettra très certainement d'identifier de nombreuses voies de signalisation qui pourraient être impliquées dans l'impact délétère de l'hypoxie intermittente ou encore dans la restauration de la fonction cardiaque induite par la dénervation sympathique cardiaque. Cette analyse devra ensuite être validée par des expériences complémentaires permettant de confirmer les résultats obtenus par RT-qPCR et western blot par exemple.



## 2. DISCUSSION AUTOUR DU MODELE ANIMAL

L'élaboration de modèles animaux pertinents est essentielle afin de décortiquer les mécanismes de pathologies multifactorielles complexes telles que les TRS. Si notre modèle de cardiopathie ischémique et de dénervation sympathique cardiaque chez le rat nous a permis de mettre en évidence l'importance de l'hyperactivité sympathique induite par l'hypoxie intermittente dans le développement de la cardiopathie ischémique, il comporte toutefois quelques limites.

Sachant que l'hypoxie intermittente augmente la susceptibilité du myocarde à un épisode d'ischémie reperfusion<sup>68,69,258</sup> et que l'homogénéité de la taille de l'infarctus du myocarde est un paramètre important dans le développement de la cardiopathie ischémique<sup>278</sup>, nous avons choisi de ne pas exposer nos animaux à l'hypoxie intermittente avant la réalisation de la ligature et de réaliser une ligature permanente afin d'obtenir des infarctus les plus homogènes possible. Les limites de ce design expérimental reposent essentiellement sur le fait qu'en clinique, il est peu probable que le patient ne soit pas reperfusé et qu'il développe des TRS uniquement après son accident ischémique. Récemment, Du *et al.*, ont exposé des souris à l'hypoxie intermittente avant la ligature permanente et ont ensuite suivi la progression de la cardiopathie ischémique. Ni la taille de l'infarctus, ni la fraction d'éjection post-infarctus du myocarde n'étaient mentionnées dans cet article, ne permettant pas d'évaluer l'homogénéité des groupes. Cependant, leurs résultats ont montré que c'est uniquement l'exposition à l'hypoxie intermittente après l'induction de la cardiopathie ischémique (MI+CIH) qui est responsable de l'aggravation de la fonction et du remodelage cardiaque. En effet, l'exposition des animaux uniquement avant la ligature (CIH+MI) n'aggravait pas la cardiopathie ischémique par rapport au groupe MI seul, et l'exposition des animaux à l'hypoxie intermittente avant et après la ligature (CIH+MI+CIH) n'aggravait pas outre mesure la progression de la cardiopathie par rapport au groupe MI+CIH<sup>76</sup>.

Une autre limite de notre modèle est que nos rats sont de jeunes adultes au moment de la chirurgie et continuent encore de grandir, alors qu'en clinique, la population présentant des TRS et une cardiopathie ischémique a une moyenne d'âge d'environ 60 ans<sup>285</sup>. Nous avons fait le choix d'animaux jeunes dans le but de réduire la mortalité post-infarctus, puisque dans une étude pilote sur des animaux plus vieux, nous obtenions des taux de mortalité extrêmement élevés suite à la ligature coronaire. Une autre limite de notre modèle repose sur l'utilisation

exclusive de rats mâles. Il aurait été intéressant de réaliser ces expériences également sur des femelles, même si la proportion de femmes touchées par la cardiopathie ischémique et les TRS est moindre, environ 15% dans la cohorte ISAACC<sup>285</sup>. En effet, suite à un infarctus du myocarde, les femmes préalablement sous traitements  $\beta$ -bloquants pour hypertension artérielle présentent une accélération du développement de l'insuffisance cardiaque, contrairement aux hommes<sup>286</sup>. L'impact d'une exposition à l'hypoxie intermittente sur l'activité sympathique et la voie  $\beta$ -adrénergique pourrait donc être différent chez des femelles. Cependant, d'un point de vue pratique, notre dispositif d'exposition à l'hypoxie intermittente nous permet d'exposer simultanément, 5 cages de rat à l'hypoxie intermittente et 5 cages à la normoxie. Au cours de ma thèse, j'ai réalisé l'exposition de 14 semaines à 2 reprises et l'exposition de 6 semaines à 3 reprises afin d'obtenir un nombre suffisant d'animaux par groupe. Pour des raisons de temps, il était donc impossible de multiplier les conditions expérimentales en ajoutant des groupes femelles.

Si une exposition prolongée de 14 semaines permet d'étudier l'impact chronique de l'hypoxie intermittente et la progression de la cardiopathie ischémique, elle augmente également la variabilité des données recueillies. En effet, en fonction de la progression de la cardiopathie, les animaux peuvent se retrouver à des stades plus ou moins compensés de la cardiopathie ischémique augmentant ainsi la variabilité intra-groupe. Cependant, cela se rapproche de la variabilité que l'on pourrait retrouver en clinique et apporte de la pertinence au modèle. Par ailleurs, je n'ai pas pu au cours de mes expositions vérifier que la cardiopathie ischémique n'induit pas des TRS chez mes animaux contrôles. Aujourd'hui, les gilets connectés d'Etisense (DECRO) permettent d'étudier par pléthysmographie les volumes et la fréquence respiratoire, ce qui nous permettrait de contrôler si nos animaux normoxiques développent des TRS suite à la cardiopathie ischémique.

Pour finir notre modèle n'évalue qu'une caractéristique des TRS : l'hypoxie intermittente. D'autres modèles animaux permettent, à l'aide d'une trachéotomie de mimer les apnées obstructives. Cette technique permet de reproduire non seulement les épisodes d'hypoxie intermittente mais également les modifications de pression intra-thoracique<sup>287</sup>. Cependant, cela nécessite d'anesthésier l'animal rendant l'expérience difficilement réalisable pour un suivi chronique.

Concernant les perspectives à plus long terme, étant donné que, dans de nombreux essais cliniques l'impact délétère des TRS n'est pas étudié uniquement sur des patients souffrant de cardiopathies ischémiques. Il serait intéressant de caractériser l'impact des TRS et de l'hypoxie intermittente sur d'autres modèles de cardiopathies. En utilisant des modèles de cardiopathie non ischémique, par exemple, les modèles de surcharge de pression comme la constriction aortique, ou encore des modèles d'HFpEF comme la cardiopathie diabétique. J'ai d'ailleurs au cours de ma thèse participé à la caractérisation de l'impact de l'hypoxie intermittente sur la cardiopathie métabolique, mettant entre autres en évidence l'insulinorésistance induite par l'hypoxie intermittente associé à une fibrose cardiaque (Réponse cardiométabolique de souris maigres et obèses exposées à l'hypoxie intermittente page 171).

Si l'hypoxie intermittente est responsable de l'aggravation des cardiopathies, l'utilisation de supports ventilatoires, qui sont le traitement de référence des TRS, devraient être bénéfique chez ces patients. Cependant, leurs efficacités sur la mortalité cardiovasculaire est discutée, particulièrement dans le contexte de la cardiopathie ischémique et de l'insuffisance cardiaque.

### 3. HYPOXIE INTERMITTENTE ET SUPPORT VENTILATOIRE DANS LA CARDIOPATHIE ISCHEMIQUE

Afin de réduire l'impact cardiovasculaire des TRS et prévenir l'hypoxie intermittente, le traitement à l'aide des supports ventilatoires tels que la pression positive continue (PPC) et la ventilation auto-asservie (VAA) pourrait être une solution. Effectivement, la PPC diminue l'hypertension artérielle induite par le SAOS<sup>36</sup>. Des méta-analyses confirment la diminution de l'hypertension artérielle et l'amélioration de la qualité de vie mais ne révèle pas d'effets bénéfiques de la PPC sur d'autres événements cardiovasculaires ni sur la mortalité<sup>37,288</sup>. Si quelques études observationnelles, publiées dans les années 2000, comme celle de Marin *et al.*, ont montré que les TRS aggravaient le pronostic cardiovasculaire des patients et que ces effets délétères étaient contrebalancés par la PPC, ce n'est pas ce qu'ont retrouvé les études cliniques randomisées.

En effet, dans l'étude RICCADSA (*Randomized Intervention with Continuous Positive Airway Pressure in CAD and OSA*), Peker *et al.*, ont recruté 244 patients souffrant d'apnées obstructives du sommeil (IAH  $\geq$  15) sans être trop somnolent (ESS  $<$ 10 ; *Epworth Sleepiness Scale score*) et ayant eu un infarctus du myocarde. Le but de cette étude était d'évaluer si la PPC permettait de diminuer les effets cardiovasculaires indésirables à long terme du SAOS. Les patients ont été suivis environ 5 ans et la moitié a été traitée à l'aide de la PPC. Cette étude n'a pas montré d'impact bénéfique de la PPC sur les effets cardiovasculaires indésirables à long terme<sup>289</sup>.

Plus récemment, dans l'étude SAVE (*Sleep Apnea Cardiovascular Endpoints*), McEvoy *et al.*, ont recruté plus de 2700 patients SAOS légers à sévères et ayant une coronaropathie ou une maladie cérébrovasculaire. Cette étude n'a pas mis en évidence d'impact bénéfique de la PPC sur les événements cardiovasculaires (infarctus du myocarde, AVC, taux d'hospitalisation pour angine instable, insuffisance cardiaque, accident ischémique transitoire). Cependant, comme expliqué en introduction, l'observance de la PPC est un paramètre important de son efficacité et dans cette étude, l'observance sur plusieurs années n'était que de 3,3 heures par nuit<sup>35</sup>. Une observance de 4 heures par nuit étant généralement considérée comme correcte, la faible observance de l'étude SAVE pourrait en expliquer en partie les résultats négatifs.

Enfin, dans l'étude ISAACC (*Impact of Sleep Apnea syndrome in the evolution of Acute Coronary syndrome. Effect of intervention with CPAP*), Sánchez-de-la-Torre *et al.*, ont évalué l'impact de l'apnée obstructive et de la PPC chez des patients SAOS (IAH  $\geq$  15 ; ESS  $<$  10) suite à un infarctus du myocarde. L'étude ancillaire précoce d'ISAACC avait montré que le

SAOS augmente le taux plasmatique de troponine-I, le nombre de vaisseaux lésés et le temps passé dans l'unité coronarienne de l'hôpital, ce qui démontrait l'impact délétère du SAOS à court terme après l'infarctus du myocarde<sup>290</sup>. Après un suivi de 7 ans, l'étude ISAACC ne montre pas d'effet bénéfique de la PPC et de manière étonnante, ne met pas non plus en évidence d'effets délétères du SAOS sur le pronostic des patients<sup>285</sup>. Ces résultats remettent en cause l'impact délétères des TRS sur la cardiopathie ischémique, cependant ils sont à pondérés pour plusieurs raisons.

L'hétérogénéité de la population de patient SAOS ayant présenté un infarctus du myocarde pourrait expliquer l'absence de mise en évidence des effets délétères du SAOS sur la morbi-mortalité cardiovasculaire. Une autre étude ancillaire très récente d'ISAACC montre, en étudiant des sous-groupes de patients particuliers comme des patients sans antécédents de maladies cardiovasculaires ou d'infarctus du myocarde, que le SAOS augmente le risque d'évènements cardiovasculaires<sup>291</sup>. L'étude initiale n'ayant pas été conçue pour cette sous-analyse, la puissance statistique n'était pas assez importante pour évaluer l'impact de la PPC. Dans le sous-groupe avec antécédents de maladies cardiovasculaires ou d'infarctus du myocarde, le risque cardiovasculaire est peut-être trop important pour mettre en évidence un impact du SAOS et de la PPC. Il serait donc intéressant de mener de nouveaux essais cliniques avec la puissance statistique nécessaire pour répondre à ces questions dans la bonne sous-population.

Un biais potentiel, relevé par les auteurs dans l'étude ISAACC, est l'évaluation unique de l'IAH environ 3 jours après l'infarctus du myocarde<sup>285</sup>. Il aurait été intéressant d'effectuer une polygraphie à plusieurs reprises au cours du suivi. En effet, l'hospitalisation rapprochée et la fatigue causée par l'accident ischémique pourrait biaiser l'analyse polygraphique initiale et résulter en une mauvaise attribution des patients dans les différents groupes. D'autant plus qu'en dehors du contexte ischémique, l'évaluation sur une nuit de l'IAH peut d'ores et déjà amener à une mauvaise classification<sup>292</sup>. De plus, l'étude ISAACC ayant suivi des patients sur plusieurs années, il est probable que l'IAH des patients ait évolué au cours du temps, en fonction de la progression de la cardiopathie ischémique ou des TRS. Aussi, et c'est valable pour tous les essais cliniques étudiant les TRS, les patients SAOS ayant un *Epworth Sleepiness Scale score* (ESS) supérieur à 10 sont exclus. Ces exclusions pourraient sélectionner des patients moins atteints par les TRS et moins susceptible de répondre à la PPC. Cependant, les patients ayant un ESS supérieur à 10 ont une nette amélioration de leur qualité de vie après un traitement par PPC, ils ne peuvent alors pas être attribués dans le groupe contrôle sans PPC pour des

raisons évidentes d'éthique. Les patients SAOS ayant un ESS élevé restent malgré tout assez minoritaires<sup>285</sup>.

Par ailleurs, les patients souffrant de cardiopathie ischémique devraient tous être traités pour leurs cardiopathies et notamment par  $\beta$ -bloquants. Or il est difficile dans la lecture des essais cliniques de connaître les traitements spécifiques de chaque patient. Au vu de nos résultats, l'activité sympathique induite par les TRS serait en partie responsable de l'aggravation de la cardiopathie. L'utilisation de  $\beta$ -bloquants pourraient alors expliquer l'absence d'effets délétères observés dans le groupe SAOS ayant une cardiopathie ischémique au cours de l'étude ISAACC.

Pour finir, l'IAH utilisé pour caractériser la sévérité des TRS ne reflète pas la complexité de cette pathologie<sup>293,294</sup>. Effectivement, l'IAH ne prend pas en compte l'importance des désaturations, les micro-éveils ou encore l'intensité de la réponse du système nerveux autonome<sup>293,294</sup>. L'hétérogénéité des patients ayant le même IAH est trop importante pour considérer que c'est un bon indicateur de la sévérité des TRS. Par ailleurs, une sous-analyse de l'étude SAVE a montré que si l'IAH n'est pas associé à l'augmentation des événements cardiovasculaires, ça n'est pas le cas des patterns de désaturations. En effet, dans cette étude, les patterns de désaturations de l'oxygène sont associés à l'augmentation du risque d'infarctus de myocarde et d'insuffisance cardiaque<sup>295</sup>. Un suivi long terme de l'oxymétrie sur plusieurs nuits pourrait participer à une meilleure caractérisation de la gravité des TRS et une meilleure classification des patients dans les essais cliniques<sup>296</sup>.

Aujourd'hui, les avancées technologiques dans les objets connectés pourraient permettre de monitorer facilement la saturation ou encore la variabilité de la fréquence cardiaque au cours du sommeil et pendant l'intégralité de l'essai clinique, ceci afin d'évaluer une éventuelle progression des TRS et ou de la cardiopathie ischémique. De plus, comme l'ont montré nos résultats, l'hyperactivité sympathique évaluée via la variabilité de la fréquence cardiaque est responsable de l'aggravation de la cardiopathie ischémique chez le rat. Un suivi personnalisé de l'activité sympathique permettrait d'évaluer et de traiter plus spécifiquement les patients. Par exemple, en complément d'un traitement adapté, les patients pourraient pratiquer de la cohérence cardiaque afin de rétablir via des exercices de respiration la balance sympatho-vagale<sup>297,298</sup>.

Les résultats mitigés de ces essais cliniques, ne doivent pas conduire à négliger l'impact délétère des TRS sur le développement de la cardiopathie, mais au contraire nous amener à mieux caractériser la population de patients concernés par l'augmentation du risque cardiovasculaire associé aux TRS et la population qui pourrait bénéficier d'un traitement

ventilatoire. Effectivement, il semble essentiel de démarrer de nouveaux essais cliniques évaluant l'impact de la PPC chez des patients TRS ayant une cardiopathie ischémique, en prenant en compte l'hétérogénéité des TRS et de la cardiopathie ischémique. La caractérisation de la sévérité des TRS, pourraient passer par l'utilisation d'un score combinant l'IAH, l'importance des désaturations ou encore l'activation du système nerveux sympathique afin de bien répartir les patients dans les différentes branches des essais cliniques.

#### **4. CONCLUSION**

Cette thèse a permis de mettre en évidence que l'hypoxie intermittente est délétère dans le développement de la cardiopathie ischémique et que l'hyperactivité sympathique associée semble être un élément clé de l'aggravation de cette cardiopathie ischémique.

Il est à ce jour, important de diagnostiquer les TRS après un infarctus du myocarde et de continuer d'évaluer les mécanismes impliqués dans l'aggravation de la cardiopathie à l'aide de modèles animaux pertinents. Ceci permettrait de mieux caractériser la physiopathologie des TRS, de mettre en place de nouveaux essais cliniques, avec un objectif ultime d'améliorer la prise en charge des patients et leur proposer des stratégies thérapeutiques plus efficaces.



# **BIBLIOGRAPHIE**

- 1 Khayat R, Jarjoura D, Porter K et al. Sleep disordered breathing and post-discharge mortality in patients with acute heart failure. *Eur Heart J*. 2015;36(23):1463–1469.
- 2 Dematteis M, Godin-Ribuot D, Arnaud C et al. Cardiovascular consequences of sleep-disordered breathing: Contribution of animal models to understanding of the human disease. *Ilar J*. 2009;50(3):262–281.
- 3 Narkiewicz K, Somers VK. Sympathetic nerve activity in obstructive sleep apnoea. *Acta Physiol Scand*. 2003;177(0001-6772 (Print)):385–390.
- 4 Tamisier R, Pépin JL, Rémy J et al. 14 Nights of Intermittent Hypoxia Elevate Daytime Blood Pressure and Sympathetic Activity in Healthy Humans. *Eur Respir J*. 2011;37(1):119–128.
- 5 Peng YJ, Yuan G, Ramakrishnan D et al. Heterozygous HIF-1 $\alpha$  deficiency impairs carotid body-mediated systemic responses and reactive oxygen species generation in mice exposed to intermittent hypoxia. *J Physiol*. 2006;577(2):705–716.
- 6 Wehrens XHT, Marks AR. Molecular determinants of altered contractility in heart failure. *Ann Med*. 2004;36(SUPPL. 1):70–80.
- 7 Lavie L. *Restless Nights: Understanding Snoring and Sleep Apnea*. Yale University Press, 2008<https://www.degruyter.com/doi/book/10.12987/9780300128956> (accessed 10 Aug2020).
- 8 Benjafield AV, Ayas NT, Eastwood PR et al. Estimation of the global prevalence and burden of obstructive sleep apnoea: a literature-based analysis. *Lancet Respir Med*. 2019;7(8):687–698.
- 9 Coniglio AC, Mentz RJ. Sleep Breathing Disorders in Heart Failure. *Heart Fail Clin*. 2020;16(1):45–51.
- 10 Berry RB, Budhiraja R, Gottlieb DJ et al. Rules for scoring respiratory events in sleep: update of the 2007 AASM Manual for the Scoring of Sleep and Associated Events. Deliberations of the Sleep Apnea Definitions Task Force of the American Academy of Sleep Medicine. *J Clin Sleep Med JCSM Off Publ Am Acad Sleep Med*. 2012;8(5):597–619.
- 11 Foldvary-Schaefer NR, Waters TE. Sleep-Disordered Breathing. *Contin Minneap Minn*. 2017;23(4, Sleep Neurology):1093–1116.
- 12 Punjabi NM. The epidemiology of adult obstructive sleep apnea. *Proc Am Thorac Soc*. 2008;5(2):136–143.
- 13 Young T, Peppard PE, Gottlieb DJ. Epidemiology of obstructive sleep apnea: A population health perspective. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;165(9):1217–1239.
- 14 Sateia MJ. International classification of sleep disorders-third edition: highlights and modifications. *Chest*. 2014;146(5):1387–1394.
- 15 Malhotra A, White DP. Obstructive sleep apnoea. *Lancet Lond Engl*. 2002;360(9328):237–245.
- 16 Lévy P, Kohler M, McNicholas WT et al. Obstructive sleep apnoea syndrome. *Nat Rev Dis Primer*. 2015;1(June):15015.
- 17 Kapur VK, Auckley DH, Chowdhuri S et al. Clinical Practice Guideline for Diagnostic Testing for Adult Obstructive Sleep Apnea: An American Academy of Sleep Medicine Clinical Practice Guideline. *J Clin Sleep Med JCSM Off Publ Am Acad Sleep Med*. 2017;13(3):479–504.

- 18 Salloum A, Rowley JA, Mateika JH, Chowdhuri S, Omran Q, Badr MS. Increased propensity for central apnea in patients with obstructive sleep apnea: effect of nasal continuous positive airway pressure. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;181(2):189–193.
- 19 Javaheri S, Dempsey JA. Central sleep apnea. *Compr Physiol*. 2013;3(1):141–163.
- 20 Oldenburg O, Lamp B, Faber L, Teschler H, Horstkotte D, Töpfer V. Sleep-disordered breathing in patients with symptomatic heart failure. A contemporary study of prevalence in and characteristics of 700 patients. *Eur J Heart Fail*. 2007;9(3):251–257.
- 21 Dempsey JA. Central sleep apnea: misunderstood and mistreated! *F1000Research*. 2019;8. doi:10/gg7mfc.
- 22 Meza S, Mendez M, Ostrowski M, Younes M. Susceptibility to periodic breathing with assisted ventilation during sleep in normal subjects. *J Appl Physiol Bethesda Md 1985*. 1998;85(5):1929–1940.
- 23 Nakayama H, Smith CA, Rodman JR, Skatrud JB, Dempsey JA. Effect of ventilatory drive on carbon dioxide sensitivity below eupnea during sleep. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;165(9):1251–1260.
- 24 White DP. Pathogenesis of obstructive and central sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;172(11):1363–1370.
- 25 Dewan NA, Nieto FJ, Somers VK. Intermittent Hypoxemia and OSA. *Chest*. 2015;147(1):266–274.
- 26 He K, Kapur VK. Sleep-Disordered Breathing and Excessive Daytime Sleepiness. *Sleep Med Clin*. 2017;12(3):369–382.
- 27 Koch H, Schneider LD, Finn LA et al. Breathing Disturbances Without Hypoxia Are Associated With Objective Sleepiness in Sleep Apnea. *Sleep*. 2017;40(11). doi:10/ggzb7b.
- 28 Barbé F, Pericás J, Muñoz A, Findley L, Antó JM, Agustí AG. Automobile accidents in patients with sleep apnea syndrome. An epidemiological and mechanistic study. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;158(1):18–22.
- 29 Briançon-Marjollet A, Weiszenstein M, Henri M, Thomas A, Godin-Ribuot D, Polak J. The impact of sleep disorders on glucose metabolism: endocrine and molecular mechanisms. *Diabetol Metab Syndr*. 2015;7:25.
- 30 Cabrera-Aguilera I, Benito B, Tajés M et al. Chronic Sleep Fragmentation Mimicking Sleep Apnea Does Not Worsen Left-Ventricular Function in Healthy and Heart Failure Mice. *Front Neurol*. 2019;10:1364.
- 31 Kasai T, Bradley TD. Obstructive sleep apnea and heart failure: pathophysiologic and therapeutic implications. *J Am Coll Cardiol*. 2011;57(2):119–127.
- 32 Tuomilehto H, Seppä J, Uusitupa M. Obesity and obstructive sleep apnea--clinical significance of weight loss. *Sleep Med Rev*. 2013;17(5):321–329.
- 33 Lerousseau L. [Sleepiness, continuous positive airway pressure and the obstructive sleep apnea hypopnea syndrome]. *Rev Mal Respir*. 2018;35(2):116–133.
- 34 Giles TL, Lasserson TJ, Smith BJ, White J, Wright J, Cates CJ. Continuous positive airways pressure for obstructive sleep apnoea in adults. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006;(1):CD001106.
- 35 McEvoy RD, Antic NA, Heeley E et al. CPAP for Prevention of Cardiovascular Events in Obstructive Sleep Apnea. *N Engl J Med*. 2016;375(10):919–931.

- 36 Marin JM, Agusti A, Villar I et al. Association between treated and untreated obstructive sleep apnea and risk of hypertension. *JAMA*. 2012;307(20):2169–2176.
- 37 Guo J, Sun Y, Xue L-J et al. Effect of CPAP therapy on cardiovascular events and mortality in patients with obstructive sleep apnea: a meta-analysis. *Sleep Breath Schlaf Atm*. 2016;20(3):965–974.
- 38 Mehrtash M, Bakker JP, Ayas N. Predictors of Continuous Positive Airway Pressure Adherence in Patients with Obstructive Sleep Apnea. *Lung*. 2019;197(2):115–121.
- 39 Means MK, Edinger JD, Husain AM. CPAP compliance in sleep apnea patients with and without laboratory CPAP titration. *Sleep Breath Schlaf Atm*. 2004;8(1):7–14.
- 40 Baby BS, Aronow WS, Chandy D. Therapeutic options for obstructive sleep apnea. *Am J Ther*. 2013;20(5):534–542.
- 41 Teschler H, Döhring J, Wang YM, Berthon-Jones M. Adaptive pressure support servo-ventilation: a novel treatment for Cheyne-Stokes respiration in heart failure. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164(4):614–619.
- 42 Lévy P, Pépin J-L, Tamisier R, Neuder Y, Baguet J-P, Javaheri S. Prevalence and Impact of Central Sleep Apnea in Heart Failure. *Sleep Med Clin*. 2007;2(4):615–621.
- 43 Oldenburg O, Bitter T, Wiemer M, Langer C, Horstkotte D, Piper C. Pulmonary capillary wedge pressure and pulmonary arterial pressure in heart failure patients with sleep-disordered breathing. *Sleep Med*. 2009;10(7):726–730.
- 44 Pearse SG, Cowie MR. Sleep-disordered breathing in heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2016;18(4):353–361.
- 45 Bradley TD, Floras JS. Sleep apnea and heart failure: Part II: central sleep apnea. *Circulation*. 2003;107(13):1822–1826.
- 46 Bradley TD, Logan AG, Kimoff RJ et al. Continuous Positive Airway Pressure for Central Sleep Apnea and Heart Failure. *N Engl J Med*. 2005;353(19):2025–2033.
- 47 Cowie MR, Woehrle H, Wegscheider K et al. Adaptive Servo-Ventilation for Central Sleep Apnea in Systolic Heart Failure. *N Engl J Med*. 2015;373(12):1095–1105.
- 48 Abraham WT, Jagielski D, Oldenburg O et al. Phrenic nerve stimulation for the treatment of central sleep apnea. *JACC Heart Fail*. 2015;3(5):360–369.
- 49 Costanzo MR, Khayat R, Ponikowski P et al. Mechanisms and clinical consequences of untreated central sleep apnea in heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2015;65(1):72–84.
- 50 Swenson ER, Leatham KL, Roach RC, Schoene RB, Mills WJ, Hackett PH. Renal carbonic anhydrase inhibition reduces high altitude sleep periodic breathing. *Respir Physiol*. 1991;86(3):333–343.
- 51 Xie A, Skatrud JB, Morgan B et al. Influence of cerebrovascular function on the hypercapnic ventilatory response in healthy humans. *J Physiol*. 2006;577(Pt 1):319–329.
- 52 Baguet J-P, Barone-Rochette G, Pépin J-L. Hypertension and obstructive sleep apnoea syndrome: current perspectives. *J Hum Hypertens*. 2009;23(7):431–443.
- 53 Peppard PE, Young T, Palta M, Skatrud J. Prospective study of the association between sleep-disordered breathing and hypertension. *N Engl J Med*. 2000;342(19):1378–1384.

- 54 Belaidi E, Joyeux-Faure M, Ribuot C, Launois SH, Levy P, Godin-Ribuot D. Major Role for Hypoxia Inducible Factor-1 and the Endothelin System in Promoting Myocardial Infarction and Hypertension in an Animal Model of Obstructive Sleep Apnea. *J Am Coll Cardiol.* 2009;53(15):1309–1317.
- 55 Drager LF, Bortolotto LA, Lorenzi MC, Figueiredo AC, Krieger EM, Lorenzi-Filho G. Early Signs of Atherosclerosis in Obstructive Sleep Apnea. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;172(5):613–618.
- 56 Hayashi M, Fujimoto K, Urushibata K, Uchikawa S, Imamura H, Kubo K. Nocturnal Oxygen Desaturation Correlates With the Severity of Coronary Atherosclerosis in Coronary Artery Disease. *Chest.* 2003;124(3):936–941.
- 57 Arnaud C, Poulain L, Lévy P, Dematteis M. Inflammation contributes to the atherogenic role of intermittent hypoxia in apolipoprotein-E knock out mice. *Atherosclerosis.* 2011;219(2):425–431.
- 58 Arnaud C, Beguin PC, Lantuejoul S et al. The inflammatory preatherosclerotic remodeling induced by intermittent hypoxia is attenuated by RANTES/CCL5 inhibition. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;184(6):724–731.
- 59 Patel NJ, Wells QS, Huang S, Upender RP, Darbar D, Monahan K. Relation of Obstructive Sleep Apnea and a Common Variant at Chromosome 4q25 to Atrial Fibrillation. *Am J Cardiol.* 2017;119(9):1387–1391.
- 60 Gami AS, Olson EJ, Shen WK et al. Obstructive Sleep Apnea and the Risk of Sudden Cardiac Death. *J Am Coll Cardiol.* 2013;62(7):610–616.
- 61 Bober SL, Ciriello J, Jones DL. Atrial arrhythmias and autonomic dysfunction in rats exposed to chronic intermittent hypoxia. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol.* 2018;314(6):H1160–H1168.
- 62 Yang X, Zhang L, Liu H, Shao Y, Zhang S. Cardiac sympathetic denervation suppresses atrial fibrillation and blood pressure in a chronic intermittent hypoxia rat model of obstructive sleep apnea. *J Am Heart Assoc.* 2019;8(4). doi:10.1161/JAHA.118.010254.
- 63 May AM, Van Wagoner DR, Mehra R. OSA and Cardiac Arrhythmogenesis. *Chest.* 2017;151(1):225–241.
- 64 Morand J, Arnaud C, Pepin J-L, Godin-Ribuot D. Chronic intermittent hypoxia promotes myocardial ischemia-related ventricular arrhythmias and sudden cardiac death. *Sci Rep.* 2018;8(1):2997.
- 65 Garcia-Rio F, Alonso-Fernández A, Armada E et al. CPAP effect on recurrent episodes in patients with sleep apnea and myocardial infarction. *Int J Cardiol.* 2013;168(2):1328–1335.
- 66 Buchner S, Satzl A, Debl K et al. Impact of sleep-disordered breathing on myocardial salvage and infarct size in patients with acute myocardial infarction. *Eur Heart J.* 2014;35(3):192–199.
- 67 Arzt M, Hetzenecker A, Steiner S, Buchner S. Sleep-Disordered Breathing and Coronary Artery Disease. *Can J Cardiol.* 2015;31(7):909–917.
- 68 Belaidi E, Thomas A, Bourdier G et al. Endoplasmic reticulum stress as a novel inducer of hypoxia inducible factor-1 activity: Its role in the susceptibility to myocardial ischemia-reperfusion induced by chronic intermittent hypoxia. *Int J Cardiol.* 2016;210:45–53.
- 69 Bourdier G, Flore P, Sanchez H, Pepin J-L, Belaidi E, Arnaud C. High-intensity training reduces intermittent hypoxia-induced ER stress and myocardial infarct size. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol.*

2016;310(2):H279–H289.

70 Mazaki T, Kasai T, Yokoi H et al. Impact of sleep-disordered breathing on long-term outcomes in patients with acute coronary syndrome who have undergone primary percutaneous coronary intervention. *J Am Heart Assoc.* 2016;5(6):e003270.

71 Nakashima H. Obstructive sleep apnoea inhibits the recovery of left ventricular function in patients with acute myocardial infarction. *Eur Heart J.* 2006;27(19):2317–2322.

72 Yumino D, Wang H, Floras JS et al. Relationship between sleep apnoea and mortality in patients with ischaemic heart failure. *Heart.* 2009;95(10):819–824.

73 Lee C-H, Khoo S-M, Chan MY et al. Severe Obstructive Sleep Apnea and Outcomes Following Myocardial Infarction. *J Clin Sleep Med.* 2011;7(6):616–21.

74 Punjabi NM, Caffo BS, Goodwin JL et al. Sleep-disordered breathing and mortality: A prospective cohort study. *PLoS Med.* 2009;6(8). doi:10/fv4gqb.

75 Wang H, Parker JD, Newton GE et al. Influence of Obstructive Sleep Apnea on Mortality in Patients With Heart Failure. *J Am Coll Cardiol.* 2007;49(15):1625–1631.

76 Du Yunhui, Wang Xiao, Li Linyi et al. miRNA-Mediated Suppression of a Cardioprotective Cardiokine as a Novel Mechanism Exacerbating Post-MI Remodeling by Sleep Breathing Disorders. *Circ Res.* 2020;126(2):212–228.

77 Naghshin J, Rodriguez RH, Davis EM, Romano LC, McGaffin KR, O'Donnell CP. Chronic intermittent hypoxia exposure improves left ventricular contractility in transgenic mice with heart failure. *J Appl Physiol.* 2012;113(5):791–798.

78 Li S, Feng J, Wei S, Qian X, Cao J, Chen B. Delayed neutrophil apoptosis mediates intermittent hypoxia-induced progressive heart failure in pressure-overloaded rats. *Sleep Breath.* 2016;20(1):95–102.

79 Wang H, Naghavi M, Allen C et al. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet.* 2016;388(10053):1459–1544.

80 Forouzanfar MH, Afshin A, Alexander LT et al. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet.* 2016;388(10053):1659–1724.

81 Velagaleti RS, Pencina MJ, Murabito JM et al. Long-term trends in the incidence of heart failure after myocardial infarction. *Circulation.* 2008;118(20):2057–2062.

82 Taylor CJ, Ryan R, Nichols L, Gale N, Richard Hobbs FD, Marshall T. Survival following a diagnosis of heart failure in primary care. *Fam Pract.* 2017;34(2):161–168.

83 Khayat R, Small R, Rathman L et al. Sleep-Disordered breathing in heart failure: Identifying and treating an important but often unrecognized comorbidity in heart failure patients. *J Card Fail.* 2013;19(6):431–444.

84 Thygesen Kristian, Alpert Joseph S., Jaffe Allan S., Simoons Maarten L., Chaitman Bernard R., White Harvey D. Third Universal Definition of Myocardial Infarction. *Circulation.* 2012;126(16):2020–

2035.

- 85 Sobel BE, Bresnahan GF, Shell WE, Yoder RD. Estimation of Infarct Size in Man and its Relation to Prognosis. *Circulation*. 1972;46(4):640–648.
- 86 Reimer KA, Lowe JE, Rasmussen MM, Jennings RB. The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation*. 1977;56(5):786–794.
- 87 Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial Reperfusion Injury. *N Engl J Med*. 2007;357(11):1121–1135.
- 88 Morciano G, Bonora M, Campo G et al. Mechanistic Role of mPTP in Ischemia-Reperfusion Injury. In: Santulli G (ed). *Mitochondrial Dynamics in Cardiovascular Medicine*. Springer International Publishing: Cham, 2017, pp 169–189.
- 89 Ong S-B, Samangouei P, Kalkhoran SB, Hausenloy DJ. The mitochondrial permeability transition pore and its role in myocardial ischemia reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol*. 2015;78:23–34.
- 90 Frangogiannis NG. Pathophysiology of Myocardial Infarction. In: Terjung R (ed). *Comprehensive Physiology*. John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2015, pp 1841–1875.
- 91 Richardson WJ, Clarke SA, Quinn TA, Holmes JW. Physiological Implications of Myocardial Scar Structure. *Compr Physiol*. 2015;5(4):1877–1909.
- 92 Cohn JN. Sympathetic Nervous System Activity and the Heart. *Am J Hypertens*. 1989;2(12\_Pt\_2):353S-356S.
- 93 Pantely GA, David Bristow J. Ischemic cardiomyopathy. *Prog Cardiovasc Dis*. 1984;27(2):95–114.
- 94 Kim GH, Uriel N, Burkhoff D. Reverse remodelling and myocardial recovery in heart failure. *Nat Rev Cardiol*. 2018;15(2):83–96.
- 95 Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling—concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. *J Am Coll Cardiol*. 2000;35(3):569–582.
- 96 Braunwald E. Heart Failure. *JACC Heart Fail*. 2013;1(1):1–20.
- 97 Cleutjens J, Kandala J, Guarda E, Guntaka R, Weber K. Regulation of collagen degradation in the rat myocardium after infarction. *J Mol Cell Cardiol*. 1995;27(6):1281–1292.
- 98 Bhatt AS, Ambrosy AP, Velazquez EJ. Adverse Remodeling and Reverse Remodeling After Myocardial Infarction. *Curr Cardiol Rep*. 2017;19(8):71.
- 99 Pfeffer JM, Pfeffer MA, Fletcher PJ, Braunwald E. Progressive ventricular remodeling in rat with myocardial infarction. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol*. 1991;260(5):H1406–H1414.
- 100 McKay RG, Pfeffer MA, Pasternak RC et al. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: a corollary to infarct expansion. *Circulation*. 1986;74(4):693–702.
- 101 Pfeffer M A, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation*. 1990;81(4):1161–1172.
- 102 Shanoff HM, Little JA, Csima A, Yano R. Heart size and ten-year survival after uncomplicated myocardial infarction. *Am Heart J*. 1969;78(5):608–614.
- 103 Kostuk WJ, Kazamias TM, Gander MP, Simon AL, Ross J. Left Ventricular Size after Acute

- Myocardial Infarction: Serial Changes and their Prognostic Significance. *Circulation*. 1973;47(6):1174–1179.
- 104 Grossman W, Jones D, McLaurin LP. Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J Clin Invest*. 1975;56(1):56–64.
- 105 Anversa P, Olivetti G, Capasso JM. Cellular basis of ventricular remodeling after myocardial infarction. *Am J Cardiol*. 1991;68(14):7–16.
- 106 Bernardo BC, Weeks KL, Pretorius L, McMullen JR. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: Experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacol Ther*. 2010;128(1):191–227.
- 107 van Berlo JH, Maillet M, Molkenin JD. Signaling effectors underlying pathologic growth and remodeling of the heart. *J Clin Invest*. 2013;123(1):37–45.
- 108 Schirone L, Forte M, Palmerio S et al. A Review of the Molecular Mechanisms Underlying the Development and Progression of Cardiac Remodeling. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:1–16.
- 109 Rose BA, Force T, Wang Y. Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling in the Heart: Angels Versus Demons in a Heart-Breaking Tale. *Physiol Rev*. 2010;90(4):1507–1546.
- 110 Cortés R, Rivera M, Roselló-Lletí E et al. Differences in MEF2 and NFAT Transcriptional Pathways According to Human Heart Failure Aetiology. *PLoS ONE*. 2012;7(2):e30915.
- 111 Molkenin J. Calcineurin/NFAT signaling regulates the cardiac hypertrophic response in coordination with the MAPKs. *Cardiovasc Res*. 2004;63(3):467–475.
- 112 Sharif-Naeini R, Folgering JHA, Bichet D et al. Sensing pressure in the cardiovascular system: Gq-coupled mechanoreceptors and TRP channels. *J Mol Cell Cardiol*. 2010;48(1):83–89.
- 113 Rowell J, Koitabashi N, Kass DA. TRP-ing up Heart and Vessels: Canonical Transient Receptor Potential Channels and Cardiovascular Disease. *J Cardiovasc Transl Res*. 2010;3(5):516–524.
- 114 Kuwahara K, Wang Y, McAnally J et al. TRPC6 fulfills a calcineurin signaling circuit during pathologic cardiac remodeling. *J Clin Invest*. 2006;116(12):3114–3126.
- 115 Izumo S, Lompré AM, Matsuoka R et al. Myosin heavy chain messenger RNA and protein isoform transitions during cardiac hypertrophy. Interaction between hemodynamic and thyroid hormone-induced signals. *J Clin Invest*. 1987;79(3):970–977.
- 116 Komuro I, Yazaki Y. Control of Cardiac Gene Expression by Mechanical Stress. *Annu Rev Physiol*. 1993;55(1):55–75.
- 117 Harvey PA, Leinwand LA. Cellular mechanisms of cardiomyopathy. *J Cell Biol*. 2011;194(3):355–365.
- 118 Baba M, Yoshida K, Ieda M. Clinical Applications of Natriuretic Peptides in Heart Failure and Atrial Fibrillation. *Int J Mol Sci*. 2019;20(11):2824.
- 119 Cohen-Solal A, Laribi S, Ishihara S et al. Prognostic markers of acute decompensated heart failure: The emerging roles of cardiac biomarkers and prognostic scores. *Arch Cardiovasc Dis*. 2015;108(1):64–74.
- 120 Creemers EE, Pinto YM. Molecular mechanisms that control interstitial fibrosis in the pressure-overloaded heart. *Cardiovasc Res*. 2011;89(2):265–272.



- 121 Segura AM, Frazier OH, Buja LM. Fibrosis and heart failure. *Heart Fail Rev.* 2014;19(2):173–185.
- 122 González A, Schelbert EB, Díez J, Butler J. Myocardial Interstitial Fibrosis in Heart Failure. *J Am Coll Cardiol.* 2018;71(15):1696–1706.
- 123 Sivasubramanian N, Coker ML, Kurrelmeier KM et al. Left Ventricular Remodeling in Transgenic Mice With Cardiac Restricted Overexpression of Tumor Necrosis Factor. *Circulation.* 2001;104(7):826–831.
- 124 Konstantinidis K, Whelan RS, Kitsis RN. Mechanisms of Cell Death in Heart Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32(7):1552–1562.
- 125 Gandhi MS, Kamalov G, Shahbaz AU et al. Cellular and molecular pathways to myocardial necrosis and replacement fibrosis. *Heart Fail Rev.* 2011;16(1):23–34.
- 126 Olivetti G. Acute Myocardial Infarction in Humans is Associated with Activation of Programmed Myocyte Cell Death in the Surviving Portion of the Heart. *J Mol Cell Cardiol.* 1996;28(9):2005–2016.
- 127 Vercammen D, Beyaert R, Denecker G et al. Inhibition of Caspases Increases the Sensitivity of L929 Cells to Necrosis Mediated by Tumor Necrosis Factor. *J Exp Med.* 1998;187(9):1477–1485.
- 128 Nakayama H, Chen X, Baines CP et al. Ca<sup>2+</sup>- and mitochondrial-dependent cardiomyocyte necrosis as a primary mediator of heart failure. *J Clin Invest.* 2007;117(9):2431–2444.
- 129 Zhou B, Tian R. Mitochondrial dysfunction in pathophysiology of heart failure. *J Clin Invest.* 2018;128(9):3716–3726.
- 130 Lázár E, Sadek HA, Bergmann O. Cardiomyocyte renewal in the human heart: insights from the fall-out. *Eur Heart J.* 2017;38(30):2333–2342.
- 131 Bergmann O, Zdunek S, Felker A et al. Dynamics of Cell Generation and Turnover in the Human Heart. *Cell.* 2015;161(7):1566–1575.
- 132 Ezekowitz JA, Kaul P, Bakal JA, Armstrong PW, Welsh RC, McAlister FA. Declining In-Hospital Mortality and Increasing Heart Failure Incidence in Elderly Patients With First Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2009;53(1):13–20.
- 133 Hunt SA, Abraham WT, Chin MH et al. ACC/AHA 2005 Guideline Update for the Diagnosis and Management of Chronic Heart Failure in the Adult—Summary Article: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure): Developed in Collaboration With the American College of Chest Physicians and the International Society for Heart and Lung Transplantation: Endorsed by the Heart Rhythm Society. *Circulation.* 2005;112(12):1825–1852.
- 134 Zile MR, Gaasch WH, Carroll JD et al. Heart Failure With a Normal Ejection Fraction: Is Measurement of Diastolic Function Necessary to Make the Diagnosis of Diastolic Heart Failure? *Circulation.* 2001;104(7):779–782.
- 135 LeWinter MM, Meyer M. Mechanisms of Diastolic Dysfunction in Heart Failure With a Preserved Ejection Fraction: If It’s Not One Thing It’s Another. *Circ Heart Fail.* 2013;6(6):1112–1115.
- 136 Dunlay SM, Roger VL, Redfield MM. Epidemiology of heart failure with preserved ejection fraction. *Nat Rev Cardiol.* 2017;14(10):591–602.
- 137 Suzuki S, Yoshihisa A, Sato Y et al. Association between sleep-disordered breathing and arterial

stiffness in heart failure patients with reduced or preserved ejection fraction: Arterial stiffness in HFpEF with SDB. *ESC Heart Fail.* 2018;5(3):284–291.

138 The Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study II (CIBIS-II): a randomised trial. *The Lancet.* 1999;353(9146):9–13.

139 Breckenridge R. Heart failure and mouse models. *Dis Model Mech.* 2010;3(3–4):138–143.

140 Bahit MC, Kochar A, Granger CB. Post-Myocardial Infarction Heart Failure. *JACC Heart Fail.* 2018;6(3):179–186.

141 Tokmakova M, Solomon SD. Inhibiting the renin–angiotensin system in myocardial infarction and heart failure: lessons from SAVE, VALIANT and CHARM, and other clinical trials: *Curr Opin Cardiol.* 2006;21(4):268–272.

142 Pitt B, Remme W, Zannad F et al. Eplerenone, a Selective Aldosterone Blocker, in Patients with Left Ventricular Dysfunction after Myocardial Infarction. *N Engl J Med.* 2003;348(14):1309–1321.

143 Wirtz HS, Sheer R, Honarpour N et al. Real-World Analysis of Guideline-Based Therapy After Hospitalization for Heart Failure. *J Am Heart Assoc.* 2020. doi:10/gg8fv4.

144 Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B et al. 2017 ACC/AHA/HFSA Focused Update of the 2013 ACCF/AHA Guideline for the Management of Heart Failure: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines and the Heart Failure Society of America. *Circulation.* 2017;136(6). doi:10/cwht.

145 Lerebours G. Le rythme sinusal: Mécanisme et fonction. *médecine/sciences.* 2007;23(6–7):657–662.

146 Bers DM. Cardiac excitation–contraction coupling. *Nature.* 2002;415(6868):198–205.

147 Yano M, Ikeda Y, Matsuzaki M. Altered intracellular Ca<sup>2+</sup> handling in heart failure. *J Clin Invest.* 2005;115(3):556–64.

148 Bers DM, Eisner DA, Valdivia HH. Sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> and heart failure roles of diastolic leak and Ca<sup>2+</sup> transport. *Circ Res.* 2003;93(6):487–490.

149 Piacentino V, Weber CR, Chen X et al. Cellular basis of abnormal calcium transients of failing human ventricular myocytes. *Circ Res.* 2003;92(6):651–658.

150 Sande JB, Sjaastad I, Hoen IB et al. Reduced level of serine16 phosphorylated phospholamban in the failing rat myocardium: a major contributor to reduced SERCA2 activity. *Cardiovasc Res.* 2002;53(2):382–391.

151 Hasenfuss G, Reinecke H, Studer R et al. Relation between myocardial function and expression of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase in failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res.* 1994;75(3):434–442.

152 Meissner G. Regulation of Ryanodine Receptor Ion Channels Through Posttranslational Modifications. In: *Current Topics in Membranes.* Elsevier, 2010, pp 91–113.

153 Hasenfuss G. Alterations of calcium-regulatory proteins in heart failure. *Cardiovasc Res.* 1998;37:279–289.

154 Larbig R, Torres N, Bridge JHB, Goldhaber JI, Philipson KD. Activation of reverse Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange by the Na<sup>+</sup> current augments the cardiac Ca<sup>2+</sup> transient: Evidence from NCX knockout mice. *J*

*Physiol.* 2010;588(17):3267–3276.

155 Cho GW, Altamirano F, Hill JA. Chronic heart failure: Ca<sup>2+</sup>, catabolism, and catastrophic cell death. *BBA - Mol Basis Dis.* 2016;1862:763–777.

156 Bers DM. Calcium Cycling and Signaling in Cardiac Myocytes. *Annu Rev Physiol.* 2008;70(1):23–49.

157 Smith MA, Schnellmann RG. Calpains, mitochondria, and apoptosis. *Cardiovasc Res.* 2012;96(1):32–37.

158 Duan DD. A Leakage Leads to Failure: Roles of Sarcoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup> Leak via RyR2 in Heart Failure Progression. *Hypertension.* 2010;55(4):849–851.

159 Ferrantini C, Crocini C, Coppini R et al. The transverse-axial tubular system of cardiomyocytes. *Cell Mol Life Sci.* 2013;70(24):4695–4710.

160 Dridi H, Kushnir A, Zalk R, Yuan Q, Melville Z, Marks AR. Intracellular calcium leak in heart failure and atrial fibrillation: a unifying mechanism and therapeutic target. *Nat Rev Cardiol.* 2020. doi:10.1038/s41569-020-0394-8.

161 Chen L, Zhang J, Hu X, Philipson KD, Scharf SM. The Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger-1 mediates left ventricular dysfunction in mice with chronic intermittent hypoxia. *J Appl Physiol.* 2010;109(6):1675–1685.

162 Chen L, Zhang J, Gan TX et al. Left ventricular dysfunction and associated cellular injury in rats exposed to chronic intermittent hypoxia. *J Appl Physiol Bethesda Md 1985.* 2008;104(1):218–223.

163 Yeung H-M, Hung M-W, Lau C-F, Fung M-L. Cardioprotective effects of melatonin against myocardial injuries induced by chronic intermittent hypoxia in rats. *J Pineal Res.* 2015;58(1):12–25.

164 Jiang S, Jiao G, Chen Y, Han M, Wang X, Liu W. Astragaloside IV attenuates chronic intermittent hypoxia-induced myocardial injury by modulating Ca<sup>2+</sup> homeostasis. *Cell Biochem Funct.* 2020;38(6):710–720.

165 Cardinali DP. *Autonomic nervous system: basic and clinical aspects.* 2018<https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&scope=site&db=nlebk&db=nlabk&AN=1570673> (accessed 2 Sep2020).

166 Netter FH, Richer J-P, Kamina P. *Atlas d'anatomie humaine.* 7e ed. 2019.

167 Zipes DP. Heart-brain interactions in cardiac arrhythmias: role of the autonomic nervous system. *Cleve Clin J Med.* 2008;75(Suppl\_2):S94–S94.

168 Gordan R, Gwathmey JK, Xie L-H. Autonomic and endocrine control of cardiovascular function. *World J Cardiol.* 2015;7(4):204.

169 Lympelopoulos A, Rengo G, Koch WJ. Adrenal adrenoceptors in heart failure: fine-tuning cardiac stimulation. *Trends Mol Med.* 2007;13(12):503–511.

170 Perez DM (ed.). *The adrenergic receptors: in the 21st century.* Humana Press: Totowa, NJ, 2006.

171 Woodcock EA, Du X-J, Reichelt ME, Graham RM. Cardiac 1-adrenergic drive in pathological remodelling. *Cardiovasc Res.* 2007;77(3):452–462.

172 Myslivecek J, Novakova M, Klein M. Receptor Subtype Abundance as a Tool for Effective Intracellular Signalling. *Cardiovasc Hematol Disord-Drug Targets.* 2008;8(1):66–79.

- 173 Lympopoulos A, Rengo G, Koch WJ. Adrenergic nervous system in heart failure: pathophysiology and therapy. *Circ Res*. 2013;113(6):739–753.
- 174 Fujita T, Umemura M, Yokoyama U, Okumura S, Ishikawa Y. The role of Epac in the heart. *Cell Mol Life Sci*. 2017;74(4):591–606.
- 175 Cachelin AB, de Peyer JE, Kokubun S, Reuter H. Ca<sup>2+</sup> channel modulation by 8-bromocyclic AMP in cultured heart cells. *Nature*. 1983;304(5925):462–464.
- 176 Solaro RJ, Moir AJG, Perry SV. Phosphorylation of troponin I and the inotropic effect of adrenaline in the perfused rabbit heart. *Nature*. 1976;262(5569):615–617.
- 177 Sadayappan S, de Tombe PP. Cardiac myosin binding protein-C as a central target of cardiac sarcomere signaling: a special mini review series. *Pflug Arch - Eur J Physiol*. 2014;466(2):195–200.
- 178 Mattiazzi A, Mundiña-Weilenmann C, Guoxiang C, Vittone L, Kranias E. Role of phospholamban phosphorylation on Thr17 in cardiac physiological and pathological conditions. *Cardiovasc Res*. 2005;68(3):366–375.
- 179 Mattiazzi A, Mundinaweilenmann C, Guoxiang C, Vittone L, Kranias E. Role of phospholamban phosphorylation on Thr17 in cardiac physiological and pathological conditions. *Cardiovasc Res*. 2005;68(3):366–375.
- 180 El-Armouche A, Eschenhagen T.  $\beta$ -Adrenergic stimulation and myocardial function in the failing heart. *Heart Fail Rev*. 2009;14(4):225–241.
- 181 Gurevich VV, Gurevich EV. GPCR Signaling Regulation: The Role of GRKs and Arrestins. *Front Pharmacol*. 2019;10:125.
- 182 Cotecchia S, del Vescovo CD, Colella M, Caso S, Diviani D. The  $\alpha$ 1-adrenergic receptors in cardiac hypertrophy: Signaling mechanisms and functional implications. *Cell Signal*. 2015;27(10):1984–1993.
- 183 Peaston RT, Weinkove C. Measurement of catecholamines and their metabolites. *Ann Clin Biochem*. 2004;41(1):17–38.
- 184 Eisenhofer G. The role of neuronal and extraneuronal plasma membrane transporters in the inactivation of peripheral catecholamines. *Pharmacol Ther*. 2001;91(1):35–62.
- 185 Triposkiadis F, Karayannis G, Giamouzis G, Skoularigis J, Louridas G, Butler J. The Sympathetic Nervous System in Heart Failure. Physiology, Pathophysiology, and Clinical Implications. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54(19):1747–1762.
- 186 Aubert AE, Ramaekers D, Beckers F et al. The analysis of heart rate variability in unrestrained rats. Validation of method and results. *Comput Methods Programs Biomed*. 1999;60(3):197–213.
- 187 Persson PB, Kirchheim HR (eds.). *Baroreceptor Reflexes*. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 1991 doi:10.1007/978-3-642-76366-3.
- 188 Guimarães GV, Belli JFC, Bacal F, Bocchi EA. Behavior of Central and Peripheral Chemoreflexes in Heart Failure. *Arq Bras Cardiol*. 2011;96(2):161–167.
- 189 Lampert R, Ickovics JR, Viscoli CJ, Horwitz RI, Lee FA. Effects of propranolol on recovery of heart rate variability following acute myocardial infarction and relation to outcome in the Beta-Blocker Heart

Attack Trial. *Am J Cardiol.* 2003;91(2):137–142.

190 Bisognano JD, Weinberger HD, Bohlmeier TJ et al. Myocardial-directed overexpression of the human beta1-adrenergic receptor in transgenic mice. *J Mol Cell Cardiol.* 2000;32(5):817–830.

191 Engelhardt S, Hein L, Wiesmann F, Lohse MJ. Progressive hypertrophy and heart failure in beta1-adrenergic receptor transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(12):7059–7064.

192 Engelhardt S, Boknik P, Keller U, Neumann J, Lohse MJ, Hein L. Early impairment of calcium handling and altered expression of junctin in hearts of mice overexpressing the  $\beta$ 1-adrenergic receptor. *FASEB J.* 2001;15(14):1–18.

193 Wang JJ-C, Rau C, Avetisyan R et al. Genetic Dissection of Cardiac Remodeling in an Isoproterenol-Induced Heart Failure Mouse Model. *PLoS Genet.* 2016;12(7):e1006038.

194 Galindo CL, Skinner MA, Errami M et al. Transcriptional profile of isoproterenol-induced cardiomyopathy and comparison to exercise-induced cardiac hypertrophy and human cardiac failure. *BMC Physiol.* 2009;9:23.

195 Bristow MR, Ginsburg R, Minobe W et al. Decreased Catecholamine Sensitivity and  $\beta$ -Adrenergic-Receptor Density in Failing Human Hearts. *N Engl J Med.* 1982;307(4):205–211.

196 Engelhardt S, Böhm M, Erdmann E, Lohse MJ. Analysis of beta-adrenergic receptor mRNA levels in human ventricular biopsy specimens by quantitative polymerase chain reactions: Progressive reduction of beta1-adrenergic receptor mRNA in heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 1996;27(1):146–154.

197 Bristow MR, Ginsburg R, Umans V et al. Beta 1- and beta 2-adrenergic-receptor subpopulations in nonfailing and failing human ventricular myocardium: coupling of both receptor subtypes to muscle contraction and selective beta 1-receptor down-regulation in heart failure. *Circ Res.* 1986;59(3):297–309.

198 Strulovici B, Cerione R, Kilpatrick B, Caron M, Lefkowitz R. Direct demonstration of impaired functionality of a purified desensitized beta-adrenergic receptor in a reconstituted system. *Science.* 1984;225(4664):837–840.

199 Lympelopoulous A, Rengo G, J. Koch W. GRK2 Inhibition in Heart Failure: Something Old, Something New. *Curr Pharm Des.* 2012;18(2):186–191.

200 Schumacher SM, Gao E, Zhu W et al. Paroxetine-mediated GRK2 inhibition reverses cardiac dysfunction and remodeling after myocardial infarction. *Sci Transl Med.* 2015;7(277):277ra31-277ra31.

201 Lympelopoulous A, Rengo G, Funakoshi H, Eckhart AD, Koch WJ. Adrenal GRK2 upregulation mediates sympathetic overdrive in heart failure. *Nat Med.* 2007;13(3):315–323.

202 Lympelopoulous A, Rengo G, Gao E, Ebert SN, Dorn GW, Koch WJ. Reduction of Sympathetic Activity via Adrenal-targeted GRK2 Gene Deletion Attenuates Heart Failure Progression and Improves Cardiac Function after Myocardial Infarction. *J Biol Chem.* 2010;285(21):16378–16386.

203 Powell JM, Ebin E, Borzak S, Lympelopoulous A, Hennekens CH. Hypothesis: Paroxetine, a G Protein-Coupled Receptor Kinase 2 (GRK2) Inhibitor Reduces Morbidity and Mortality in Patients With Heart Failure. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2017;22(1):51–53.

204 Urbanik D, Gać P, Martynowicz H et al. Obstructive sleep apnea as a predictor of reduced heart rate variability. *Sleep Med.* 2018. doi:10.1016/j.sleep.2018.09.014.

- 205 Szollosi I, Krum H, Kaye D, Naughton MT. Sleep Apnea in Heart Failure Increases Heart Rate Variability and Sympathetic Dominance. *Sleep*. 2007;30(11):1509–1514.
- 206 Tamisier R, Weiss JW, Pépin JL. Sleep biology updates: Hemodynamic and autonomic control in sleep disorders. *Metabolism*. 2018;84:3–10.
- 207 Narkiewicz K, Kato M, Phillips BG, Pesek CA, Davison DE, Somers VK. Nocturnal Continuous Positive Airway Pressure Decreases Daytime Sympathetic Traffic in Obstructive Sleep Apnea. *Circulation*. 1999;100(23):2332–2335.
- 208 Peng Y-J, Overholt JL, Kline D, Kumar GK, Prabhakar NR. Induction of sensory long-term facilitation in the carotid body by intermittent hypoxia: Implications for recurrent apneas. *Proc Natl Acad Sci*. 2003;100(17):10073–10078.
- 209 Li M, Zheng C, Sato T, Kawada T, Sugimachi M, Sunagawa K. Vagal Nerve Stimulation Markedly Improves Long-Term Survival After Chronic Heart Failure in Rats. *Circulation*. 2004;109(1):120–124.
- 210 De Ferrari GM, Crijns HJGM, Borggrefe M et al. Chronic vagus nerve stimulation: a new and promising therapeutic approach for chronic heart failure. *Eur Heart J*. 2011;32(7):847–855.
- 211 De Ferrari GM, Stolen C, Tuinenburg AE et al. Long-term vagal stimulation for heart failure: Eighteen month results from the NEural Cardiac TherApy foR Heart Failure (NECTAR-HF) trial. *Int J Cardiol*. 2017;244:229–234.
- 212 Kostrzewa RM, Jacobowitz DM. Pharmacological actions of 6-hydroxydopamine. *Pharmacol Rev*. 1974;26(3):199–288.
- 213 Raffel DM, Chen W, Sherman PS, Gildersleeve DL, Jung Y-W. Dependence of cardiac 11C-meta-hydroxyephedrine retention on norepinephrine transporter density. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med*. 2006;47(9):1490–1496.
- 214 Jiang YH, Jiang P, Yang JL et al. Cardiac dysregulation and myocardial injury in a 6-hydroxydopamine-induced rat model of sympathetic denervation. *PLoS ONE*. 2015;10(7):1–19.
- 215 Burgi K, Cavalleri MT, Alves AS, Britto LRG, Antunes VR, Michelini LC. Tyrosine hydroxylase immunoreactivity as indicator of sympathetic activity: simultaneous evaluation in different tissues of hypertensive rats. *Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol*. 2011;300(2):R264–R271.
- 216 Perlini S, Ferrero I, Palladini G et al. Survival Benefits of Different Antiadrenergic Interventions in Pressure Overload Left Ventricular Hypertrophy/Failure. *Hypertension*. 2006;48(1):93–97.
- 217 Pardini BJ, Lund DD, Schmid PG. Organization of the sympathetic postganglionic innervation of the rat heart. *J Auton Nerv Syst*. 1989;28(3):193–201.
- 218 Manousiouthakis E, Mendez M, Garner MC, Exertier P, Makita T. Venous endothelin guides sympathetic innervation of the developing mouse heart. *Nat Commun*. 2014;5(1):3918.
- 219 Shen MJ, Zipes DP. Role of the Autonomic Nervous System in Modulating Cardiac Arrhythmias. *Circ Res*. 2014;114(6):1004–1021.
- 220 Wilde AAM, Bhuiyan ZA, Crotti L et al. Left Cardiac Sympathetic Denervation for Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia. *N Engl J Med*. 2008;358(19):2024–2029.
- 221 Xiong L, Liu Y, Zhou M et al. Targeted ablation of cardiac sympathetic neurons attenuates adverse

- postinfarction remodelling and left ventricular dysfunction. *Exp Physiol*. 2018;103(9):1221–1229.
- 222 Ziegler KA, Ahles A, Wille T, Kerler J, Ramanujam D, Engelhardt S. Local sympathetic denervation attenuates myocardial inflammation and improves cardiac function after myocardial infarction in mice. *Cardiovasc Res*. 2018;114(2):291–299.
- 223 Ames MK, Atkins CE, Pitt B. The renin-angiotensin-aldosterone system and its suppression. *J Vet Intern Med*. 2019;33(2):363–382.
- 224 Floras JS. Sympathetic Nervous System Activation in Human Heart Failure. Clinical Implications of an Updated Model. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54(5):375–385.
- 225 Pfeffer JM, Fischer TA, Pfeffer MA. Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition and Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction. *Annu Rev Physiol*. 1995;57(1):805–826.
- 226 Sánchez-Álvarez C, González-Vélez M, Stilp E, Ward C, Mena-Hurtado C. Renal sympathetic denervation in the treatment of resistant hypertension. *Yale J Biol Med*. 2014;87(4):527–535.
- 227 Tan LB, Jalil JE, Pick R, Janicki JS, Weber KT. Cardiac myocyte necrosis induced by angiotensin II. *Circ Res*. 1991;69(5):1185–1195.
- 228 Jugdutt BI. Apoptosis after reperfused myocardial infarction: Role of angiotensin II. *Exp Clin Cardiol*. 2004;9(4):219–228.
- 229 Li Y, Xia X, Zheng H et al. Angiotensin II enhances carotid body chemoreflex control of sympathetic outflow in chronic heart failure rabbits. *Cardiovasc Res*. 2006;71(1):129–138.
- 230 Møller D. Abnormal vasoactive hormones and 24-hour blood pressure in obstructive sleep apnea. *Am J Hypertens*. 2003;16(4):274–280.
- 231 Pépin J-L, Tamisier R, Barone-Rochette G, Launois SH, Lévy P, Baguet J-P. Comparison of Continuous Positive Airway Pressure and Valsartan in Hypertensive Patients with Sleep Apnea. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;182(7):954–960.
- 232 Linz D, Hohl M, Nickel A et al. Effect of Renal Denervation on Neurohumoral Activation Triggering Atrial Fibrillation in Obstructive Sleep Apnea. *Hypertension*. 2013;62(4):767–774.
- 233 Takahashi K, Ueda S, Kobayashi T et al. Chronic intermittent hypoxia-mediated renal sympathetic nerve activation in hypertension and cardiovascular disease. *Sci Rep*. 2018;8(1):17926.
- 234 Fletcher EC, Bao G, Li R. Renin Activity and Blood Pressure in Response to Chronic Episodic Hypoxia. *Hypertension*. 1999;34(2):309–314.
- 235 Morgan BJ, Schrimpf N, Rothman M et al. Effect of Chronic Intermittent Hypoxia on Angiotensin II Receptors in the Central Nervous System. *Clin Exp Hypertens*. 2019;41(2):130–136.
- 236 Lavie L. Oxidative stress in obstructive sleep apnea and intermittent hypoxia – Revisited – The bad ugly and good: Implications to the heart and brain. *Sleep Med Rev*. 2015;20:27–45.
- 237 Belch JJ, Bridges AB, Scott N, Chopra M. Oxygen free radicals and congestive heart failure. *Heart*. 1991;65(5):245–248.
- 238 Hill MF, Singal PK. Antioxidant and oxidative stress changes during heart failure subsequent to myocardial infarction in rats. *Am J Pathol*. 1996;148(1):291–300.
- 239 Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Oxidative stress and heart failure. *Am J Physiol Heart Circ*

*Physiol.* 2011;301(6):H2181-2190.

240 Lavie L. Obstructive sleep apnoea syndrome – an oxidative stress disorder. *Sleep Med Rev.* 2003;7(1):35–51.

241 Franco CMR, Lima AMJ, Ataíde L et al. Obstructive Sleep Apnea Severity Correlates with Cellular and Plasma Oxidative Stress Parameters and Affective Symptoms. *J Mol Neurosci.* 2012;47(2):300–310.

242 Schulz R, Mahmoudi S, Hattar K et al. Enhanced Release of Superoxide from Polymorphonuclear Neutrophils in Obstructive Sleep Apnea: Impact of Continuous Positive Airway Pressure Therapy. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;162(2):566–570.

243 Ramond A, Godin-Ribuot D, Ribaut C et al. Oxidative stress mediates cardiac infarction aggravation induced by intermittent hypoxia. *Fundam Clin Pharmacol.* 2013;27(3):252–261.

244 Totoson P, Fhayli W, Faury G et al. Atorvastatin protects against deleterious cardiovascular consequences induced by chronic intermittent hypoxia. *Exp Biol Med.* 2013;238(2):223–232.

245 Chen L, Einbinder E, Zhang Q, Hasday J, Balke CW, Scharf SM. Oxidative Stress and Left Ventricular Function with Chronic Intermittent Hypoxia in Rats. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;172(7):915–920.

246 Pai P, Lai CJ, Lin C-Y, Liou Y-F, Huang C-Y, Lee S-D. Effect of superoxide anion scavenger on rat hearts with chronic intermittent hypoxia. *J Appl Physiol.* 2016;120(8):982–990.

247 Peng Y-J, Prabhakar NR. Reactive oxygen species in the plasticity of respiratory behavior elicited by chronic intermittent hypoxia. *J Appl Physiol.* 2003;94(6):2342–2349.

248 Wang GL, Semenza GL. Purification and Characterization of Hypoxia-inducible Factor 1. *J Biol Chem.* 1995;270(3):1230–1237.

249 Semenza GL. Regulation of Oxygen Homeostasis by Hypoxia-Inducible Factor 1. *Physiology.* 2009;24(2):97–106.

250 Schödel J, Oikonomopoulos S, Ragoussis J, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Mole DR. High-resolution genome-wide mapping of HIF-binding sites by ChIP-seq. *Blood.* 2011;117(23):e207-217.

251 Lando D. FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev.* 2002;16(12):1466–1471.

252 Lin S-C, Liao W-L, Lee J-C, Tsai S-J. Hypoxia-regulated gene network in drug resistance and cancer progression. *Exp Biol Med.* 2014;239(7):779–792.

253 Hölscher M, Schäfer K, Krull S et al. Unfavourable consequences of chronic cardiac HIF-1 $\alpha$  stabilization. *Cardiovasc Res.* 2012;94(1):77–86.

254 Bekeredjian R, Walton CB, MacCannell KA et al. Conditional HIF-1 $\alpha$  expression produces a reversible cardiomyopathy. *PLoS ONE.* 2010;5(7):1–11.

255 Li G, Lu W, Wu X et al. Admission hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  levels and in-hospital mortality in patients with acute decompensated heart failure. *BMC Cardiovasc Disord.* 2015;15:79.

256 Yuan G, Nanduri J, Khan S, Semenza GL, Prabhakar NR. Induction of HIF-1 $\alpha$  expression by intermittent hypoxia: involvement of NADPH oxidase, Ca<sup>2+</sup> signaling, prolyl hydroxylases, and mTOR. *J Cell Physiol.* 2008;217(3):674–685.



- 257 Moulin S, Thomas A, Arnaud C et al. Cooperation Between Hypoxia-Inducible Factor 1 $\alpha$  and Activating Transcription Factor 4 in Sleep Apnea-Mediated Myocardial Injury. *Can J Cardiol.* 2020;36(6):936–940.
- 258 Park A-M, Suzuki YJ. Effects of intermittent hypoxia on oxidative stress-induced myocardial damage in mice. *J Appl Physiol.* 2007;102(5):1806–1814.
- 259 Lam AKM, Galione A. The endoplasmic reticulum and junctional membrane communication during calcium signaling. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1833(11):2542–2559.
- 260 Michalak M, Opas M. Endoplasmic and sarcoplasmic reticulum in the heart. *Trends Cell Biol.* 2009;19(6):253–259.
- 261 Schröder M, Kaufman RJ. The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem.* 2005;74:739–789.
- 262 Groenendyk J, Sreenivasaiah PK, Kim DH, Agellon LB, Michalak M. Biology of endoplasmic reticulum stress in the heart. *Circ Res.* 2010;107(10):1185–1197.
- 263 Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol.* 2000;2(6):326–332.
- 264 Hu H, Tian M, Ding C, Yu S. The C/EBP Homologous Protein (CHOP) Transcription Factor Functions in Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Apoptosis and Microbial Infection. *Front Immunol.* 2018;9:3083.
- 265 Groenendyk J, Agellon LB, Michalak M. Coping with endoplasmic reticulum stress in the cardiovascular system. *Annu Rev Physiol.* 2013;75:49–67.
- 266 Krebs J, Agellon LB, Michalak M. Ca(2+) homeostasis and endoplasmic reticulum (ER) stress: An integrated view of calcium signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;460(1):114–121.
- 267 Ortega A, Roselló-Lletí E, Tarazón E et al. Endoplasmic reticulum stress induces different molecular structural alterations in human dilated and ischemic cardiomyopathy. *PloS One.* 2014;9(9):e107635.
- 268 Fu Hai Ying, Okada Ken-ichiro, Liao Yulin et al. Ablation of C/EBP Homologous Protein Attenuates Endoplasmic Reticulum–Mediated Apoptosis and Cardiac Dysfunction Induced by Pressure Overload. *Circulation.* 2010;122(4):361–369.
- 269 Yao Y, Lu Q, Hu Z, Yu Y, Chen Q, Wang QK. A non-canonical pathway regulates ER stress signaling and blocks ER stress-induced apoptosis and heart failure. *Nat Commun.* 2017;8(1):133.
- 270 Okada K, Minamino T, Tsukamoto Y et al. Prolonged endoplasmic reticulum stress in hypertrophic and failing heart after aortic constriction: possible contribution of endoplasmic reticulum stress to cardiac myocyte apoptosis. *Circulation.* 2004;110(6):705–712.
- 271 Zhou S, Yin X, Zheng Y et al. Metallothionein prevents intermittent hypoxia-induced cardiac endoplasmic reticulum stress and cell death likely via activation of Akt signaling pathway in mice. *Toxicol Lett.* 2014;227(2):113–123.
- 272 Ding W, Zhang X, Huang H et al. Adiponectin protects rat myocardium against chronic intermittent hypoxia-induced injury via inhibition of endoplasmic reticulum stress. *PloS One.* 2014;9(4):e94545.
- 273 Litwin SE, Katz SE, Morgan JP, Douglas PS. Serial echocardiographic assessment of left ventricular

- geometry and function after large myocardial infarction in the rat. *Circulation*. 1994;89(1):345–354.
- 274 Electrophysiology Task Force of the European Society of Cardiology the North American Society of Pacing. Heart Rate Variability. *Circulation*. 1996;93(5):1043–1065.
- 275 Cerutti C, Gustin MP, Paultre CZ et al. Autonomic nervous system and cardiovascular variability in rats: a spectral analysis approach. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol*. 1991. doi:10/ggsjs7.
- 276 Xie F, Xiao P, Chen D, Xu L, Zhang B. miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant Mol Biol*. 2012. doi:10/fzh3hk.
- 277 Schneider J, Lothar A, Hein L, Gilsbach R. Chronic cardiac pressure overload induces adrenal medulla hypertrophy and increased catecholamine synthesis. *Basic Res Cardiol*. 2011;106(4):591–602.
- 278 Lindsey ML, Bolli R, Canty JM et al. Guidelines for experimental models of myocardial ischemia and infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2018;314(4):H812–H838.
- 279 Belaidi E, Morand J, Gras E, Pépin J-L, Godin-Ribuot D. Targeting the ROS-HIF-1-endothelin axis as a therapeutic approach for the treatment of obstructive sleep apnea-related cardiovascular complications. *Pharmacol Ther*. 2016;168:1–11.
- 280 Cheong HI, Asosingh K, Stephens OR et al. Hypoxia sensing through  $\beta$ -adrenergic receptors. *JCI Insight*. 2016;1(21). doi:10/ggf78x.
- 281 Zhuo X-Z, Wu Y, Ni Y-J et al. Isoproterenol instigates cardiomyocyte apoptosis and heart failure via AMPK inactivation-mediated endoplasmic reticulum stress. *Apoptosis Int J Program Cell Death*. 2013;18(7):800–810.
- 282 Delbrel E, Soumare A, Naguez A et al. HIF-1 $\alpha$  triggers ER stress and CHOP-mediated apoptosis in alveolar epithelial cells, a key event in pulmonary fibrosis. *Sci Rep*. 2018;8(1):1–14.
- 283 Reboul C, Boissière J, André L et al. Carbon monoxide pollution aggravates ischemic heart failure through oxidative stress pathway. *Sci Rep*. 2017;7(January):1–11.
- 284 George I, Sabbah HN, Xu K, Wang N, Wang J.  $\beta$ -Adrenergic receptor blockade reduces endoplasmic reticulum stress and normalizes calcium handling in a coronary embolization model of heart failure in canines. *Cardiovasc Res*. 2011;91(3):447–455.
- 285 Sánchez-de-la-Torre M, Sánchez-de-la-Torre A, Bertran S et al. Effect of obstructive sleep apnoea and its treatment with continuous positive airway pressure on the prevalence of cardiovascular events in patients with acute coronary syndrome (ISAACC study): a randomised controlled trial. *Lancet Respir Med*. 2019;0(0). doi:10/gghv55.
- 286 Bugiardini R, Yoon J, Kedev S et al. Prior Beta-Blocker Therapy for Hypertension and Sex-Based Differences in Heart Failure Among Patients With Incident Coronary Heart Disease. *Hypertension*. 2020;76(3):819–826.
- 287 Linz D, Denner A, Illing S et al. Impact of obstructive and central apneas on ventricular repolarisation: lessons learned from studies in man and pigs. *Clin Res Cardiol*. 2016;105(8):639–647.
- 288 Yu J, Zhou Z, McEvoy RD et al. Association of Positive Airway Pressure With Cardiovascular Events and Death in Adults With Sleep Apnea: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA*. 2017;318(2):156.

- 289 Peker Y, Glantz H, Eulenburg C, Wegscheider K, Herlitz J, Thunström E. Effect of Positive Airway Pressure on Cardiovascular Outcomes in Coronary Artery Disease Patients with Nonsleepy Obstructive Sleep Apnea. The RICCADSA Randomized Controlled Trial. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016;194(5):613–620.
- 290 Barbé F, Sánchez-de-la-Torre A, Abad J et al. Effect of obstructive sleep apnoea on severity and short-term prognosis of acute coronary syndrome. *Eur Respir J*. 2015;45(2):419–427.
- 291 Zapater A, Sánchez-de-la-Torre M, Benítez ID et al. The Effect of Sleep Apnea on Cardiovascular Events in Different Acute Coronary Syndrome Phenotypes. *Am J Respir Crit Care Med*. 2020. doi:10/gg58h5.
- 292 Punjabi NM, Patil S, Crainiceanu C, Aurora RN. Variability and Misclassification of Sleep Apnea Severity Based on Multi-Night Testing. *Chest*. 2020;158(1):365–373.
- 293 Heinzer R, Eckert D. Treatment for obstructive sleep apnoea and cardiovascular diseases: are we aiming at the wrong target? *Lancet Respir Med*. 2019;0(0). doi:10/gghv56.
- 294 Pressman GS. Sleep disordered breathing and cardiovascular health – Is AHI adequate? *Int J Cardiol*. 2018;271:289–290.
- 295 Linz D, Loffler KA, Sanders P et al. Low Prognostic Value of Novel Nocturnal Metrics in Patients With OSA and High Cardiovascular Event Risk. *Chest*. 2020;:S0012369220318833.
- 296 Linz D, Linz B, Heijman J. Sleep Apnea, Intermittent Hypoxemia, and Effects on Ischemic Myocardial Damage: Friend or Foe? *Can J Cardiol*. 2020;36(6):809–812.
- 297 McCraty R, Zayas MA. Cardiac coherence, self-regulation, autonomic stability, and psychosocial well-being. *Front Psychol*. 2014;5:1090.
- 298 Tiller WA, McCraty R, Atkinson M. Cardiac coherence: a new, noninvasive measure of autonomic nervous system order. *Altern Ther Health Med*. 1996;2(1):52–65.
- 299 Drager LF, Polotsky VY, O'Donnell CP, Cravo SL, Lorenzi-Filho G, Machado BH. Translational approaches to understanding metabolic dysfunction and cardiovascular consequences of obstructive sleep apnea. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol*. 2015;309(7):H1101–H1111.
- 300 Kent BD, McNicholas WT, Ryan S. Insulin resistance, glucose intolerance and diabetes mellitus in obstructive sleep apnoea. *J Thorac Dis*. 2015;7(8):1343–1357.
- 301 Borel A-L, Monneret D, Tamisier R et al. The Severity of Nocturnal Hypoxia but Not Abdominal Adiposity Is Associated with Insulin Resistance in Non-Obese Men with Sleep Apnea. *PLoS ONE*. 2013;8(8):e71000.
- 302 Thomas A, Belaidi E, Moulin S et al. Chronic Intermittent Hypoxia Impairs Insulin Sensitivity but Improves Whole-Body Glucose Tolerance by Activating Skeletal Muscle AMPK. *Diabetes*. 2017;66(12):2942–2951.
- 303 Riehle C, Abel ED. Insulin Signaling and Heart Failure. *Circ Res*. 2016;118(7):1151–1169.

# ANNEXES

# 1. REPONSE CARDIOMETABOLIQUE DE SOURIS MAIGRES ET OBESES EXPOSEES A L'HYPOXIE INTERMITTENTE

Au cours de ma thèse, j'ai également participé à la caractérisation de la réponse cardiometabolique de souris exposées à l'hypoxie intermittente.

Le syndrome métabolique est une combinaison de troubles métaboliques comme l'obésité, la dyslipidémie, l'insulino-résistance, souvent associé à des altérations cardiovasculaires comme l'hypertension artérielle ou des coronaropathies. Les TRS comme le SAOS participent au développement du syndrome métabolique<sup>299</sup>. En effet, le métabolisme du glucose est dérégulé chez les patients souffrant de SAOS, la prévalence de l'insulino-résistance et du diabète de type 2 est plus importante dans cette population<sup>300</sup>. La sévérité des désaturations lors des apnées est corrélée à l'insulino-résistance chez les patients SAOS<sup>301</sup>.

Notre laboratoire a récemment montré que 2 semaines d'hypoxie intermittente induisent une insulino-résistance systémique et modifie la voie de signalisation de l'insuline dans le foie, le tissu adipeux, et le muscle strié chez la souris<sup>302</sup>.

Comme décrit précédemment, l'hypoxie intermittente seule induit un remodelage cardiaque et une dysfonction contractile. L'insulino-résistance, indépendamment de l'hypoxie intermittente, contribue également au remodelage et à la dysfonction contractile cardiaque. L'hyperinsulinémie soutenue, induite par l'insulino-résistance, phosphoryle le récepteur à l'insuline (IRS1) et Akt contribuant au remodelage ventriculaire<sup>303</sup> (Figure 58).

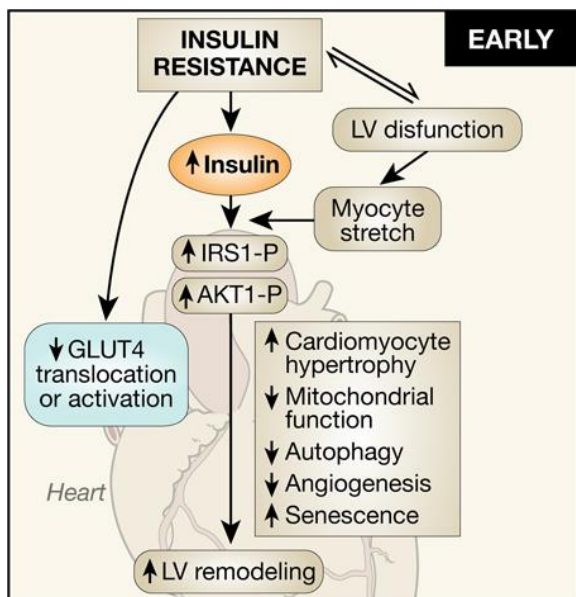


Figure 58. Insulino-résistance et remodelage ventriculaire<sup>303</sup>.

Cependant l'impact de l'insulino-résistance induite par hypoxie intermittente sur la signalisation insulinique cardiaque, le remodelage et la fonction cardiaque reste peu connu.

L'objectif de cette étude est d'évaluer les effets de l'hypoxie intermittente sur la signalisation insulinique, le remodelage et la fonction cardiaque chez la souris maigre et obèse.

Des souris C57BL/6J ont été nourries avec un régime gras (HFD : *high fat diet*) ou un régime contrôle (LFD : *low fat diet*) pendant 20 semaines. Au cours des 6 dernières semaines les souris ont été exposées à l'hypoxie intermittente ou à la normoxie. A la 4<sup>e</sup> semaine d'exposition la fonction et le remodelage cardiaque ont été évalués par échocardiographie. A la 5<sup>e</sup> semaine la glycémie à jeun, l'insulinémie et un test de tolérance à l'insuline ont été réalisés. Les tissus prélevés à la 6<sup>e</sup> semaines ont permis d'évaluer le remodelage cardiaque par des techniques histologiques (hypertrophie, fibrose). Avant le prélèvement, la moitié des souris ont eu une injection d'insuline afin d'évaluer la réponse insulinique des acteurs de la voie de signalisation par western blot.

Cette étude a permis de montrer que l'hypoxie intermittente induit bien une hyperinsulinémie associée à une fibrose cardiaque chez les souris maigres. Cependant sur la fonction cardiaque, 4 semaines d'hypoxie intermittente induisent une réponse cardiaque adaptative chez les souris maigres. L'hypoxie intermittente chez les souris obèses n'induit pas un remodelage cardiaque ou une dysfonction plus importante que ne le fait déjà le régime (Figure 59).

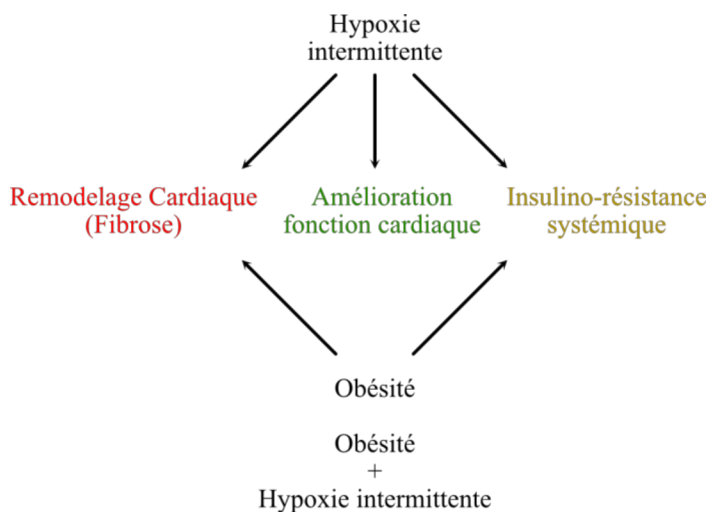


Figure 59. L'hypoxie intermittente induit une insulino-résistance et une fibrose cardiaque.

*Under review in The Journal of Physiology*

**New insights in the cardiometabolic response to intermittent hypoxia in lean and obese mice**

Maximin Détrait<sup>1</sup>, MSc, Mélanie Pesse<sup>1</sup>, MSc\*, Clément Calissi<sup>1</sup>, MSc\*, Jacques Brocard<sup>2</sup>, PhD, Sophie Bouyon<sup>1</sup>, MSc, Guillaume Vial<sup>1</sup>, PhD, Jean-Louis Pépin<sup>1</sup>, MD-PhD, Elise Belaidi<sup>1</sup>, PhD\*\* and Claire Arnaud<sup>1</sup>, PharmD-PhD<sup>#,\*\*</sup>

**Authors' affiliations:**

<sup>1</sup>Univ. Grenoble Alpes, Inserm, CHU Grenoble Alpes, HP2, 38000 Grenoble, France

<sup>2</sup>Univ. Grenoble Alpes, Inserm, CHU Grenoble Alpes, GIN, 38000 Grenoble, France

**\*Co-second authors**

**#Corresponding author**

**\*\*Co-senior authors**

**Corresponding author:**

Claire Arnaud

Laboratoire HP2, Université Grenoble Alpes, INSERM U1042

Place du Commandant Nal,

Faculté de Médecine de Grenoble,

38700 La Tronche

France.

Email address: [claire.arnaud@univ-grenoble-alpes.fr](mailto:claire.arnaud@univ-grenoble-alpes.fr)

## **Abstract**

**Background** Chronic intermittent hypoxia (IH) is the major feature of obstructive sleep apnea syndrome (OSA), well-known to induce cardiometabolic complications, such as cardiac remodeling and contractile dysfunction and systemic insulin resistance. We previously demonstrated that IH induces hyperinsulinemia and associated altered insulin signaling in adipose tissue and liver and skeletal muscle, but simultaneous impact of IH on cardiac insulin signaling and functional/structural consequences remains unknown. Therefore, the aims of the present study were to investigate in both lean and obese mice the effects of chronic IH on: 1) cardiac insulin signaling; and 2) cardiac remodeling and function.

**Methods** C57BL/6J male mice were fed either low-fat (LFD) or high-fat (HFD) diet for 20 weeks, and exposed to IH (21-5% FiO<sub>2</sub>, 60sec cycle, 8h/day) or normoxia (N) for the last 6 weeks. Systemic insulin sensitivity was evaluated by an insulin tolerance test (ITT). Cardiac remodeling and contractile function were assessed by cardiac ultrasonography. Ultimately, hearts were withdrawn for biochemical and histological analysis.

**Results** In LFD mice, IH induced hyperinsulinemia and systemic insulin resistance that was associated with increased phosphorylations of cardiac insulin receptor and Akt on Tyr1150 and Ser473 residues, respectively. In addition, IH significantly increased cardiac interstitial fibrosis and cardiac contractility. In the HFD group exhibiting basal hyperinsulinemia and systemic insulin resistance, IH did not exert any additional effect, nor on insulin/Akt signaling, nor on cardiac remodeling and function.

**Conclusion** Our present study suggests that, despite systemic insulin resistance, 6 weeks IH exposure mediate an adaptive cardiac response in lean but not in obese mice. Further studies are needed to investigate which specific mechanisms are involved and to determine the long-term evolution of cardiac responses to IH.



## Introduction

Obstructive sleep apnea (OSA) is a common sleep disordered-breathing that represents a major public health problem, due to its high prevalence – it affects 10-15% of the population – and its links with metabolic diseases (Drager *et al.*, 2013). In addition, OSA is recognized as an independent risk factor for cardiovascular (hypertension, coronary diseases, heart failure) and metabolic (insulin resistance, type 2 diabetes) disorders (Levy *et al.*, 2015). OSA is characterized by repeated episodes of partial or complete obstruction of the upper airway that leads to sleep fragmentation, intrathoracic pressure swings and chronic intermittent hypoxia (IH), which is recognized as the major feature of OSA inducing cardiovascular and metabolic dysfunctions (Levy *et al.*, 2015).

Experimental studies in rodents demonstrated that chronic IH, *per se*, is responsible for systemic insulin resistance (Drager *et al.*, 2015) and alterations in tissue-specific insulin signaling pathway (i.e. liver, adipose tissue and muscle) (Thomas *et al.*, 2017). These effects of IH exposure on metabolic dysfunctions have been described in several models (i.e. lean or obese animals) and following different time-courses of IH exposure (i.e. short-term and long-term) (Murphy *et al.*, 2017; Thomas *et al.*, 2017). Conversely, studies reporting the impact of IH on cardiac remodeling and function are more controversial. Whereas some studies demonstrated initial adaptive cardiac responses to chronic IH (Naghshin *et al.*, 2009; Naghshin *et al.*, 2012; Rodriguez *et al.*, 2014), others showed that IH induces pathologic cardiac remodeling and contractile dysfunctions (Chen *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2010; Yin *et al.*, 2014). Several factors could influence the pathophysiological response to chronic IH. Among them, the presence of comorbidities, such as obesity, could drive the transition from an initial adaptive state (i.e. cardiac remodeling) to a late maladaptive response (i.e. contractile dysfunction) (Yin *et al.*, 2012).

Independently of IH, insulin resistance contributes to cardiac remodeling and contractile dysfunction. In early stages of metabolic dysfunctions, insulinemia is increased to maintain glucose homeostasis. Hyperinsulinemia results in “sustained” myocardial IRS1 and Akt phosphorylation that contribute to left ventricular remodeling. Later, and despite persistent hyperinsulinemia, glucose homeostasis is no longer regulated and cardiac insulin resistance occurs, participating to cardiac contractile dysfunctions (Riehle & Abel, 2016). This deleterious impact of hyperinsulinemia on cardiac remodeling and contractile dysfunction is well-described

in animal models of obesity-induced insulin resistance (Riehle & Abel, 2016) and has also been described to exacerbate systolic dysfunction induced by pressure overload (Shimizu *et al.*, 2010).

Currently, we demonstrated previously that IH induces hyperinsulinemia and associated altered insulin signaling in adipose tissue, liver and skeletal muscle (Thomas *et al.*, 2017), but the impact of IH-induced insulin resistance on cardiac insulin signaling and functional/structural cardiac consequences remains unknown. Therefore, the aims of the present study were to investigate, in both lean and obese mice, the effects of chronic IH on: 1) cardiac insulin signaling; and 2) cardiac remodeling and function.

## **Material and Methods**

### **Ethical approval**

All experiments were performed in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Institutes of Health publication 85-23, revised 1996) and have received approval from the ethical committee of the Université Grenoble Alpes and the “Ministère de l’enseignement supérieur et de la recherche” (no. 2256.02).

### **Animals and experimental design**

Twenty-eight 5-week-old male C57BL/6J mice (Janvier) were housed under standard conditions in conventional cages with *ad libitum* access to water and food. Mice were randomized into two groups fed either a control low-fat (LFD) diet (10 kcal% Fat, catalogue no. D12450J, Research Diets, New Brunswick, USA) or a high fat (HFD) diet (60 kcal% Fat, catalogue no. D12492, 60% fat, Research Diets) for 20 weeks (n = 14 per group). During the last 6 weeks of the protocol, each group of mice was randomized into two subgroups (n = 7 per group), exposed to normoxia (N) or chronic intermittent hypoxia (IH) (Figure 1A). The animals were exposed in their housing cages to 60 seconds IH cycles (inspired oxygen fraction oscillating from 21% to 5% every 30 seconds), for 8 hours during sleeping time (6am – 2pm). In parallel, control animals were exposed to similar air-air cycles (21% O<sub>2</sub>), in order to reproduce equivalent levels of noise and air turbulences related to gas circulation as IH, without hypoxia. At 4 weeks exposure, mice were submitted to cardiac ultrasonography; at 5 weeks, fasting glycemia and insulinemia were measured and an intraperitoneal (i.p) insulin tolerance test (ipITT) was performed; tissue sampling was realized at 6 weeks. Experimental design is summarized in Figure 1B.

### **Insulin tolerance test**

The week before mice euthanasia, an intraperitoneal (i.p) insulin tolerance test (ipITT) was performed by a training technician, to assess whole-body insulin sensitivity. Briefly, mice were fasted for 6 hours and insulin was administered (0.5 U/kg total body weight, i.p). Blood samples were drawn from the tail vein at different time points (0-15-30-45-60 and 90 min) to determine blood glucose concentrations using a glucometer (One Touch VERIO). Fasting insulinemia was measured using a commercial insulin kit (Millipore).

### **Cardiac ultrasonography**

Cardiac ultrasonography was performed by a trained technician during the fourth week of exposure, using a Vevo 2100 imaging system from Visual Sonics with a 22-55 MHz MS550D transducer. Mice were anaesthetized with isoflurane (1%) supplemented with O<sub>2</sub> (99%). Body temperature, respiratory rate and ECG were monitored and heart rate was maintained at 350-400 beats/min during the measurements of cardiac parameters. Systolic function parameters, including the ejection fraction (EF) and fractional shortening (FS) were measured by two-dimensional parasternal short-axis imaging plane of M-mode traces close to the papillary muscle level.

### **Heart sampling**

At the end of IH or N exposure, mice were fasted for 6 hours, then euthanized by cervical dislocation, after an insulin (0,5U/kg total body weight, i.p) or NaCl (100 µL/kg body weight, i.p) injection (n = 3 and 4 for NaCl and insulin administration respectively). Fifteen minutes later, hearts were rapidly sampled and weighted. The mid-ventricular part of heart was fixed in paraformaldehyde (PFA) for histology study. Apex and bases of hearts were quickly frozen, for protein biology analysis.

### **Western blot analysis**

Snap-frozen hearts were homogenized and lysed using ceramic beads in Precellys 24 (5000 rpm, 2x10s-5s) to extract nuclear and cytosolic proteins (Nuclear Extract protocol, Active Motif). Protein concentration was calculated using a Bradford assay (Bradford reagent, Sigma-Aldrich). Cytosolic proteins (30µg) were separated by 8-10% SDS polyacrylamide gels and transferred to polyvinylidene difluoride membranes. Next, membranes were blocked for 1h at room temperature with 5% non-fat milk in TRIS- buffered saline (TBS) with Tween 20 (0.1%). Membranes were then incubated overnight at 4°C with the following primary antibodies in TBS-Tween 20 - 5% non-fat milk: <sup>Ser473</sup>phospho-Akt, <sup>Tyr1150</sup>phospho-IRβ, Akt1 (1:1000, Millipore), Irβ (1:1000, Santa Cruz Biotechnology) and α-tubulin (1:2000, Santa Cruz Biotechnology). Membranes were then incubated for 1h at room temperature with the appropriate horseradish peroxidase-conjugated anti-IgG (1:5000, Jackson ImmunoResearch). Proteins were visualised by enhanced chemiluminescence with the Western Blot ECL substrate (Clarity, Bio-Rad) and video acquisition (chemidoc-xrs-system, Bio- Rad). Relative amount of protein was quantified by densitometry (Image Lab, Bio-Rad) and expressed as a ratio of the appropriate loading control. Phosphorylated proteins were expressed relative to total protein, and

nonphosphorylated proteins were expressed relative to tubulin. Finally, proteins expressions of all the groups were expressed in fold increase relative to the LFD-NaCl group

### **RT-qPCR**

Total mRNA was extracted from snap-frozen heart using TRI reagent (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's specifications. Total RNA (0.1 µg) was reversely transcribed to cDNA using iScript Reverse Transcription Supermix (C-1000 Thermal Cycler, Bio-Rad). Quantitative real-time PCR was then performed using SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad) and PCR primers (Sigma-Aldrich). mRNA expression was normalized to Actin mRNA levels and expressed as fold change compared to Normoxic mice using  $2^{\Delta\Delta C_t}$  method (where  $C_t$  is threshold cycle). Primers are listed in supplemental Table 1.

### **Histology**

Mouse hearts tissue were fixed in PFA then embedded in paraffin and serially sectioned at 5 µm on a microtome. Tissue sections were stained with Sirius red to assess interstitial fibrosis. Briefly, paraffin embedded sections were deparaffinized and washed in distilled water. Slides were then stained for one hour with Sirius red (0.1% of Sirius red in saturated aqueous picric acid) and washed twice in acetic acid solution (0.5%). Slides were rinsed using absolute alcohol, dehydrated, cleared and then mounted for observation. Images were acquired using axioscan (Zeiss, Göttingen, Germany, X20). Three mice per group were used and 10 to 12 images per mice were analyzed in left and right ventricles and septum by a blinded experimenter. Briefly, interstitial fibrosis was automatically segmented from these images, based on its specific reddish hue, with the help of a home-made ImageJ macro (<https://github.com/jbrocardplatim/Cardiac-Fibrosis>, code available in supplementary data). Percentages of fibrosis were then calculated as the area of fibrosis divided by the area of the stained tissue. In order to determine cardiomyocytes cross-sectional area, tissue sections were stained with Wheat germ agglutinin (WGA) Oregon Green 488 conjugate (Molecular Probes). Staining was performed following standard procedures and images were acquired using the confocal microscopy (LSM5 10 Meta confocal microscope; Zeiss, Oberkochen, Germany). Cross-sectional area analysis (three mice per group, 10 to 15 images per mice and 50 cardiomyocytes per image) was performed by a blinded experimenter using Image J (*Stochastic watershed* plugin, adapted by Dr A. Fertin, TIMC-IMAG-UMR5525, France).

### **Statistical analysis**

All data are expressed as mean  $\pm$  SEM. For each comparison group, normality and equal variance were tested using Shapiro-Wilk and Bartlett tests, respectively. When these assumptions were met, results were analyzed using Student t-tests or 2-way ANOVA, followed by post hoc Tuckey's multiple comparison tests. In other conditions and when sample size was too small, Kruskal-Wallis test was used, followed by Dunn's multiple comparison tests (GraphPad Prism Software). Differences between groups were considered statistically significant at  $p < 0.05$ .

## Results

### Impact of high-fat diet on metabolic and cardiac parameters

HFD significantly increased body weight (Figure 2A), fasting blood glucose (Figure 2C) and plasma insulin levels (Figure 2D). This was associated with a global reduction of systemic insulin response during ipITT (Figure 2E). Concomitantly, under basal conditions, HFD significantly increased basal phosphorylations of insulin receptor  $\beta$  and Akt on Tyr1150 (Figure 2F) and Ser473 (Figure 2G) respectively. In addition, whereas IR $\beta$  and Akt phosphorylations were respectively 1.8 and 2.2 fold increased in the LFD group, insulin administration did not increase IR $\beta$  and Akt phosphorylation states in the HFD group (Figures 2F and 2G). Regarding cardiac remodeling and function, HFD significantly increased heart weight-to-tibia length ratio (Figure 2B), interventricular septum thickness, without any significant effect on ejection fraction and fractional shortening (Supplemental Table 2).

### Cardiometabolic impact of chronic intermittent hypoxia in LFD mice

In the LFD mice, IH had no effect on final body weight (Figure 3A). IH did not change fasting glucose levels (Figure 3C) but significantly increased plasma insulin levels (Figure 3D). To further investigate the effect of IH on systemic response to insulin, mice were subjected to an insulin tolerance test *in vivo*. IH mice exhibited an impaired whole-body insulin sensitivity compared to normoxic mice (Figure 3E). Insulin-induced increase in Tyr1150IR $\beta$  and Ser473Akt phosphorylations observed in normoxic mice was blunted in hypoxic ones (Figures 3F and 3G). Of note, IH induced an increase in IR $\beta$  and Akt phosphorylations in basal conditions (Figures 3F and 3G), suggesting that IH, *per se*, upregulates cardiac insulin signaling. Regarding cardiac impact, IH induced interstitial fibrosis, as shown by Sirius red staining (Figures 4A and 4B) that was associated with a trend to increase in *Coll1a1* mRNA expression (Figure 4C). Cardiomyocytes cross-sectional areas, assessed through Wheat germ agglutinin (WGA) staining, were not different between LFD-N and LFD-IH groups (Figures 4D and 4E) and we did not observe any re-expression of the fetal gene program (Figure 4F). Finally, in the LFD mice, IH induced a reduction in left ventricular diameter (LVDs) ( $2.654 \pm 0.214$  vs  $3.161 \pm 0.099^*$  in IH vs N respectively,  $*p < 0.05$ ) (Table 1). This was associated with a significant increase in ejection fraction ( $57.5 \pm 4.80$  vs  $45.2 \pm 2.2\%^*$  in IH vs N respectively,  $*p < 0.05$ ) and fractional shortening ( $26.8 \pm 1.1$  vs  $22.2 \pm 1.3\%$  in IH vs N respectively,  $*p < 0.05$ ) (Table 1 and Figure 4G).

### **Cardiometabolic impact of chronic intermittent hypoxia in HFD mice**

We first validated that HFD mice induced metabolic disorders (Supplemental Table 1 and Figure 2). Then, we evaluated whether IH could exert additive effects in a model of diet-induced obesity. In HFD conditions, IH reduced body weight (Figure 5A) and fasting blood glucose levels (Figure 5C). We did not observe any effect of IH on fasting plasma insulin (Figure 5D), nor on the dynamic response to insulin (ITT) (Figure 5E), nor on IR $\beta$  and Akt phosphorylation states in basal and post-insulin injection situations (Figures 5F and 5G). In the same manner, we did not observe any changes in heart weight-to-tibia length ratio (Figure 5B), cardiac fibrosis and cardiomyocytes size between HFD-N and HFD-IH mice (Figure 6A-F). We only observed a significantly decrease in interventricular septum thickness in HFD-IH compared to HFD-N (Table 2), that was not associated with changes in ejection fraction ( $45.8 \pm 2.5$  vs  $49.4 \pm 3.7\%$  in IH vs N respectively) and fractional shortening ( $22.6 \pm 1.5$  vs  $24.9 \pm 2.3\%$  in IH vs N respectively) (Table 2 and Figure 6G).



## Discussion

Exposure to IH induces systemic insulin resistance and alters the insulin signaling pathway in the main metabolic organs (i.e. adipose tissue, liver and skeletal muscle); however, the cardiac impact of this IH-induced insulin resistance remains unclear. In the present study, we demonstrated that, in lean mice, 6 weeks exposure to IH is responsible for hyperinsulinemia, systemic insulin resistance, cardiac insulin signaling modifications, cardiac interstitial fibrosis and increased cardiac contractility. Interestingly, in diet-induced obese mice already exhibiting basal hyperinsulinemia and systemic insulin resistance, IH did not exert additional systemic metabolic alterations, nor on cardiac insulin signaling, nor on cardiac remodeling and function.

### Cardiometabolic response to chronic IH in lean mice

According to the literature (Muhl & Pfeilschifter, 2003; Drager *et al.*, 2015; Murphy *et al.*, 2017; Thomas *et al.*, 2017) and although body weight and fasting blood glucose were similar to normoxic mice, low-fat diet mice exposed to chronic IH exhibited common features of systemic insulin resistance, such as increased fasting plasma insulin levels and impaired glucose response to insulin during ITT. Moreover, basal cardiac insulin signaling was unexpectedly upregulated under IH conditions, with increased phosphorylation states of both insulin receptor and Akt, whereas the response to exogenous insulin stimulation was blunted compared to normoxic mice. These results in myocardium partially differ from those we previously obtained in the main insulin-targeted tissues (i.e., WAT, skeletal muscle, and liver) showing that IH alters insulin-signaling pathway by lowering the insulin-induced phosphorylation of IR and downstream targets, with no modifications in basal conditions (Murphy *et al.*, 2017; Thomas *et al.*, 2017). This suggests a specific response to IH depending on the metabolic organ and the underlying molecular mechanisms remain to be elucidated.

In cardiac tissue, such hyperactivation of insulin/Akt signaling pathway has already been described in other pathophysiological contexts, such as early stages of heart failure (i.e. pressure overload model) (Shimizu *et al.*, 2010) or metabolic syndrome (i.e. ob/ob mice) (Cook *et al.*, 2010). In these two models, insulin/Akt signaling hyperactivation results, in part, from compensatory hyperinsulinemia and promotes early adaptive cardiac response and a metabolic switch from fatty acid oxidation to glycolytic way (Riehle & Abel, 2016). However, persistent and excessive signaling is associated with adverse LV remodeling (hypertrophy and/or cardiac fibrosis) and subsequent cardiac dysfunction (Riehle & Abel, 2016).

In the present study, we further demonstrated an increased cardiac contractility in the IH group, suggesting an adaptive cardiac response to 4 weeks IH in lean mice. This was

associated with increased cardiac interstitial fibrosis, but not cardiac hypertrophy. These results are in accordance with previous studies demonstrating that 4 weeks IH increased cardiac contractility, independently of cardiac hypertrophy (Naghshin *et al.*, 2009; Naghshin *et al.*, 2012; Rodriguez *et al.*, 2014), whereas other studies demonstrated cardiac remodeling (i.e. apoptosis, interstitial fibrosis, hypertrophy) and contractile dysfunction (i.e. reduction of ejection fraction) (Chen *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2010) upon IH exposure. These discrepancies could be explained by the several experimental parameters such as rodent species, genetic background, as well as hypoxia pattern and duration. Taken together, these results also suggest that the cardiac response to IH could be biphasic, with an early adaptive response, followed by a maladaptive remodeling and subsequent functional failure.

Several mechanisms could be involved in these cardiac responses to IH. As described above, hyperinsulinemia could contribute to early increased cardiac contractility (Riehle & Abel, 2016) and previous studies also underlined the contributing role of IH-induced sympathetic activation (Tamisier *et al.*, 2011; Bourdier *et al.*, 2016; Morand *et al.*, 2018), showing that beta-blocker prevents IH-induced increased cardiac contractility (Naghshin *et al.*, 2009). In addition, as hyperinsulinemia, sympathetic activation induces a short-term adaptive response to stress that can become maladaptive when activation is sustained and persistent over the time, ultimately contributing to cardiac pathological remodeling and contractile dysfunction (El-Armouche & Eschenhagen, 2009). Taken together, this suggest that, in early stages of IH exposure, both hyperinsulinemia and sympathetic activation could represent adaptive mechanisms that, with prolonged exposure or in presence of comorbidities might ultimately induce pathological remodeling and contractile dysfunction.

### **Cardiometabolic response to chronic IH in diet-induced obese mice**

Obesity is the most prevalent comorbidities of OSA (Levy *et al.*, 2015) and could exert synergistic effects to IH on myocardium (Yin *et al.*, 2012). As currently described in the literature, our experimental model of diet-induced obesity led to systemic insulin resistance with increased levels of fasting blood glucose and insulin, and a global altered response to insulin compared to mice fed with low fat diet. In the same manner than in lean mice exposed to IH, we showed that high fat diet upregulated cardiac insulin/Akt signaling in the basal state that could result from hyperinsulinemia, whereas response to insulin stimulation was blunted, suggesting an insulin resistance state (Cook *et al.*, 2010; Riehle & Abel, 2016). These mice also exhibited cardiac hypertrophy that were not associated with contractile dysfunction. Interestingly, exposure of these diet-induced obese mice to IH did not exert any additive effect,

nor on systemic metabolic parameters, nor on cardiac insulin/Akt signaling, cardiac remodeling and function. The lack of systemic metabolic effect of IH in obese mice are concordant with our previous study demonstrating that IH exerts synergistic effect with obesity on insulin resistance only after body weight adjustment (Murphy *et al.*, 2017). Such body weight matching was not possible in the present study, due to the few numbers of mice used. In addition, contrary to lean mice, IH did not increase cardiac contractility in obese mice, which could traduce that obese mice cannot develop an adaptive cardiac response to IH. Same results were reported by Rodriguez *et al.* who demonstrated that ob/ob mice failed to develop an adaptive contractile response to IH, together with an inability to increase glycolysis rate (Rodriguez *et al.*, 2014). In addition, while we proposed that sympathetic activation could have contributed to the adaptive contractile response to IH, previous study showed that high fat diet impaired cardiac beta-adrenergic signaling in early stages of diabetes without any effect on global cardiac function (Fu *et al.*, 2017). Thus, this altered beta-adrenergic signaling may explain, at least in part, the inability of obese mice to increase cardiac contractility to IH.

In conclusion, in early stages of IH exposure, hyperinsulinemia could mediate an adaptive cardiac response in lean mice, which is not the case in obese mice. Further studies are needed to decipher specific mechanisms and to determine whether longer IH exposure would ultimately induce pathological remodeling and contractile dysfunction, with specific kinetics in lean and obese mice.

## Tables and figures legends

**Table 1.** Echocardiographic parameters assessed in LFD mice. LFD, low fat diet; N, normoxia; IH, intermittent hypoxia; HR, heart rate; IVSd, diastolic interventricular septum; IVSs, systolic interventricular septum; LVDd, diastolic left ventricular diameter; LVDs, systolic left ventricular diameter; LVPWd, diastolic left ventricular posterior wall; LVPWs, systolic left ventricular posterior wall; EF, ejection fraction; FS, fractional shortening. Results are expressed as means  $\pm$  SEM (n=7 per group), \* p<0.05, compared to LFD-N mice.

**Table 2.** Echocardiographic parameters assessed in HFD mice. HFD, high fat diet; N, normoxia; IH, intermittent hypoxia; HR, heart rate; IVSd, diastolic interventricular septum; IVSs, systolic interventricular septum; LVDd, diastolic left ventricular diameter; LVDs, systolic left ventricular diameter; LVPWd, diastolic left ventricular posterior wall; LVPWs, systolic left ventricular posterior wall; EF, ejection fraction; FS, fractional shortening. Results are expressed as means  $\pm$  SEM (n=7 per group), \* p<0.05, compared to HFD-N mice.

**Figure 1.** Experimental groups (A) and study design (B).

**Figure 2.** Impact of 20 weeks high fat diet (HFD) on body weight (A) and heart weight-to-tibia length ratio (HW/TL) (B). Fasted blood glucose (C) and plasma insulin (D) levels were monitored after 19 weeks diet and insulin tolerance test was realized (E). Data are expressed as means  $\pm$  SEM (n=7). The protein expression of IR $\beta$ , Akt, and phosphorylation states on Tyr<sup>1150</sup>IR $\beta$  and Ser<sup>473</sup>Akt were determined by Western blot (F and G) and quantified by densitometric analysis. The phospho-to-total ratios were calculated and expressed as fold change relative to LFD control mice. Data are expressed as means  $\pm$  SEM (n=3-4), \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\*p<0.001, compared to LFD.

**Figure 3.** Impact of 6 weeks IH on metabolic parameters in LFD mice. Body weight (A) and heart weight-to-tibia length ratio (HW/TL) (B) were monitored after 20 weeks diet and 6 weeks IH exposure. Fasted blood glucose (C) and plasma insulin (D) levels were monitored after 19 weeks LFD and insulin tolerance test was realized (E). Data are expressed as means  $\pm$  SEM (n=7). The protein expression of IR $\beta$ , Akt and phosphorylation states on Tyr<sup>1150</sup>IR $\beta$  and Ser<sup>473</sup>Akt were determined under basal conditions or 15min after insulin injection by Western blot (F and G) and quantified by densitometric analysis. The phospho-to-total ratios were calculated and

expressed as fold change relative to LFD control mice. Data are expressed as means  $\pm$  SEM (n=3-4), \* p<0.05, \*\* p<0.01, compared to LFD-N.

**Figure 4.** Impact of 6 weeks IH on cardiac remodeling and function in LFD mice. Quantification of cardiac interstitial fibrosis expressed as percentage of tissue area (10-12 images analyzed per mice; 3 mice per group) (A). Representative images of interstitial fibrosis in N and IH mice (B). mRNA expression of fibrosis markers *Colla1*, *Col3a1*, *Ctgf* and *Tgfb* (n=3) (C). Cardiomyocyte cross-sectional (CSA) area quantification (around 500 cardiomyocytes analyzed; 3 mice per group) (D) and representative WGA stainings (E). Quantification of mRNA expression of markers of cardiac hypertrophy, *Acta1*, *Nppa* and *Nppb* (n=3) (F). Echocardiographic assessment of ejection fraction in LFD mice (n=7) (G). Data are expressed as means  $\pm$  SEM, \* p<0.05.

**Figure 5.** Impact of 6 weeks IH on metabolic parameters in HFD mice. Body weight (A) and heart weight-to-tibia length ratio (HW/TL) (B) were monitored after 20 weeks diet and 6 weeks IH exposure. Fasted blood glucose (C) and plasma insulin (D) levels were monitored after 19 weeks HFD and insulin tolerance test was realized (E). Data are expressed as means  $\pm$  SEM (n=7). The protein expression of IR $\beta$ , Akt and phosphorylation states on Tyr<sup>1150</sup>IR $\beta$  and Ser<sup>473</sup>Akt were determined under basal conditions or 15min after insulin injection by Western blot (F and G) and quantified by densitometric analysis. The phospho-to-total ratios were calculated and expressed as fold change relative to HFD control mice. Data are expressed as means  $\pm$  SEM (n=3-4), \* p<0.05.

**Figure 6.** Impact of 6 weeks IH on cardiac remodeling and function in HFD mice. Quantification of cardiac interstitial fibrosis expressed as percentage of tissue area (10-12 images analyzed per mice; 3 mice per group) (A). Representative images of interstitial fibrosis in N and IH mice (B). mRNA expression of fibrosis markers *Colla1*, *Col3a1*, *Ctgf* and *Tgfb* (n=3) (C). Cardiomyocyte cross-sectional area (CSA) quantification (around 500 cardiomyocytes analyzed; 3 mice per group) (D) and representative WGA stainings (E). Quantification of mRNA expression of markers of cardiac hypertrophy, *Acta1*, *Nppa* and *Nppb* (n=3) (F). Echocardiographic assessment of ejection fraction in HFD mice (n=7) (G). Data are expressed as means  $\pm$  SEM.

## Online supplemental material and data

### Quantification of cardiac interstitial fibrosis

Code for ImageJ macro (<https://github.com/jbrocardplatim/Cardiac-Fibrosis>)

```
//Automatic quantification of fibrosis in Sirius red-stained heart sections imaged with an
//AxioScan.Z1 * Claire Arnaud, HP2 @Jacques Brocard, 2019
run("Set Measurements...", "area mean standard redirect=None decimal=3");getPixelSize(unit,
pw, ph, pd);
if (unit=="inches"){
    run("Properties...", "channels=1 slices=1 frames=1 unit=microns pixel_width=0.22
    pixel_height=0.22 voxel_depth=1");
    run("Save");
    getPixelSize(unit, pw, ph, pd);
}
titre=getTitle();
dir=getDirectory("image");
titre=substring(titre,0,lengthOf(titre)-4);

//Splitting and smoothing of the original images
run("Duplicate...", "title=image");
run("Split Channels");
selectWindow("image (blue)");
run("Smooth");
selectWindow("image (green)");
run("Smooth");
selectWindow("image (red)");
run("Smooth");
imageCalculator("Add create 32-bit", "image (green)", "image (blue)");
selectWindow("Result of image (green)");
//Production of a dark image of the tissue
resetMinAndMax();
run("Enhance Contrast", "saturated=0.35");
setOption("ScaleConversions", true);
run("8-bit");
//Image data harvesting and subsequent adaptation of the threshold
run("Set Measurements...", "area mean standard limit redirect=None decimal=3");
run("Select All");
run("Measure");
moy=getResult("Mean",0);
sd=getResult("StdDev",0);
setAutoThreshold("Default");
setThreshold(0, moy+sd-10);
//setThreshold(0, 200);
setOption("BlackBackground", true);
run("Convert to Mask");
tis=titre+"_tissue.tif";
saveAs("Tiff", dir+tis);

//Production of an image = green/(red+blue) -> fibrosis
imageCalculator("Add create 32-bit", "image (blue)", "image (red)");
```

```

rename("BG");
imageCalculator("Divide create 32-bit", "image (green)", "BG");
rename("FIB");
run("8-bit");
run("Invert");
run("Duplicate...", " ");
run("Gaussian Blur...", "sigma=32");
imageCalculator("Subtract create", "FIB", "FIB-1");
selectWindow("Result of FIB");
setAutoThreshold("Default dark");
//Use of fixed threshold for a given series of staining...
setThreshold(36,255);
run("Convert to Mask");
//... and discard small regions (<10 pixels) to detect real fibrosis
run("Analyze Particles...", "size=10-Infinity pixel show=Masks in_situ");
fib=titre+"_fibrosis.tif";
saveAs("Tiff", dir+fib);

selectWindow("BG");
close();
selectWindow("FIB");
close();
selectWindow("FIB-1");
close();
selectWindow("image (blue)");
close();
selectWindow("image (green)");
close();
selectWindow("image (red)");
close();

selectWindow(fib);
setAutoThreshold("Default dark");
//run("Threshold...");
run("Measure");
imageCalculator("Add", tis, fib);
setAutoThreshold("Default dark");
run("Measure");
close();
close();

fib_area=floor(getResult("Area",1));
tis_area=floor(getResult("Area",2));

selectWindow("Results");
run("Close");

print(titre);
//Print results as pixels and percentages
print("fibrosis area:", fib_area);

```

```
print("tissue area:",tis_area);  
print("%fibrosis area:",floor(10000*fib_area/tis_area)/100);  
print("");
```

**Supplemental Table 1.** Primers sequences.

**Supplemental Table 2.** Echocardiographic parameters assessed in LFD and HFD mice. LFD, low fat diet; HFD, high fat diet; HR, heart rate; IVSd, diastolic interventricular septum; IVSs, systolic interventricular septum; LVDd, diastolic left ventricular diameter; LVDs, systolic left ventricular diameter; LVPWd, diastolic left ventricular posterior wall; LVPWs, systolic left ventricular posterior wall; EF, ejection fraction; FS, fractional shortening. Results are expressed as means  $\pm$  SEM (n=7). \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\*p<0.001 compared to LFD mice.



## References

- Bourdier G, Flore P, Sanchez H, Pepin JL, Belaidi E & Arnaud C. (2016). High-intensity training reduces intermittent hypoxia-induced ER stress and myocardial infarct size. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **310**, H279-289.
- Chen L, Einbinder E, Zhang Q, Hasday J, Balke CW & Scharf SM. (2005). Oxidative stress and left ventricular function with chronic intermittent hypoxia in rats. *Am J Respir Crit Care Med* **172**, 915-920.
- Chen L, Zhang J, Gan TX, Chen-Izu Y, Hasday JD, Karmazyn M, Balke CW & Scharf SM. (2008). Left ventricular dysfunction and associated cellular injury in rats exposed to chronic intermittent hypoxia. *J Appl Physiol (1985)* **104**, 218-223.
- Chen L, Zhang J, Hu X, Philipson KD & Scharf SM. (2010). The Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger-1 mediates left ventricular dysfunction in mice with chronic intermittent hypoxia. *J Appl Physiol (1985)* **109**, 1675-1685.
- Cook SA, Varela-Carver A, Mongillo M, Kleinert C, Khan MT, Leccisotti L, Strickland N, Matsui T, Das S, Rosenzweig A, Punjabi P & Camici PG. (2010). Abnormal myocardial insulin signalling in type 2 diabetes and left-ventricular dysfunction. *Eur Heart J* **31**, 100-111.
- Drager LF, Polotsky VY, O'Donnell CP, Cravo SL, Lorenzi-Filho G & Machado BH. (2015). Translational approaches to understanding metabolic dysfunction and cardiovascular consequences of obstructive sleep apnea. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **309**, H1101-1111.
- Drager LF, Togeiro SM, Polotsky VY & Lorenzi-Filho G. (2013). Obstructive sleep apnea: a cardiometabolic risk in obesity and the metabolic syndrome. *J Am Coll Cardiol* **62**, 569-576.
- El-Armouche A & Eschenhagen T. (2009). Beta-adrenergic stimulation and myocardial function in the failing heart. *Heart Fail Rev* **14**, 225-241.
- Fu Q, Hu Y, Wang Q, Liu Y, Li N, Xu B, Kim S, Chiamvimonvat N & Xiang YK. (2017). High-fat diet induces protein kinase A and G-protein receptor kinase phosphorylation of beta2 -adrenergic receptor and impairs cardiac adrenergic reserve in animal hearts. *J Physiol* **595**, 1973-1986.
- Levy P, Kohler M, McNicholas WT, Barbe F, McEvoy RD, Somers VK, Lavie L & Pepin JL. (2015). Obstructive sleep apnoea syndrome. *Nat Rev Dis Primers* **1**, 15015.
- Morand J, Arnaud C, Pepin JL & Godin-Ribuot D. (2018). Chronic intermittent hypoxia promotes myocardial ischemia-related ventricular arrhythmias and sudden cardiac death. *Sci Rep* **8**, 2997.
- Muhl H & Pfeilschifter J. (2003). Anti-inflammatory properties of pro-inflammatory interferon-gamma. *Int Immunopharmacol* **3**, 1247-1255.
- Murphy AM, Thomas A, Crinion SJ, Kent BD, Tambuwala MM, Fabre A, Pepin JL, Roche HM, Arnaud C & Ryan S. (2017). Intermittent hypoxia in obstructive sleep apnoea mediates insulin resistance through adipose tissue inflammation. *Eur Respir J* **49**, 1601731.
- Naghshin J, McGaffin KR, Witham WG, Mathier MA, Romano LC, Smith SH, Janczewski AM, Kirk JA, Shroff SG & O'Donnell CP. (2009). Chronic intermittent hypoxia increases left ventricular contractility in C57BL/6J mice. *J Appl Physiol (1985)* **107**, 787-793.

- Naghshin J, Rodriguez RH, Davis EM, Romano LC, McGaffin KR & O'Donnell CP. (2012). Chronic intermittent hypoxia exposure improves left ventricular contractility in transgenic mice with heart failure. *J Appl Physiol (1985)* **113**, 791-798.
- Riehle C & Abel ED. (2016). Insulin Signaling and Heart Failure. *Circ Res* **118**, 1151-1169.
- Rodriguez RH, Bickta JL, Murawski P & O'Donnell CP. (2014). The impact of obesity and hypoxia on left ventricular function and glycolytic metabolism. *Physiol Rep* **2**, e12001.
- Shimizu I, Minamino T, Toko H, Okada S, Ikeda H, Yasuda N, Tateno K, Moriya J, Yokoyama M, Nojima A, Koh GY, Akazawa H, Shiojima I, Kahn CR, Abel ED & Komuro I. (2010). Excessive cardiac insulin signaling exacerbates systolic dysfunction induced by pressure overload in rodents. *J Clin Invest* **120**, 1506-1514.
- Tamisier R, Pepin JL, Remy J, Baguet JP, Taylor JA, Weiss JW & Levy P. (2011). 14 nights of intermittent hypoxia elevate daytime blood pressure and sympathetic activity in healthy humans. *Eur Respir J* **37**, 119-128.
- Thomas A, Belaidi E, Moulin S, Horman S, van der Zon GC, Viollet B, Levy P, Bertrand L, Pepin JL, Godin-Ribuot D & Guigas B. (2017). Chronic Intermittent Hypoxia Impairs Insulin Sensitivity but Improves Whole-Body Glucose Tolerance by Activating Skeletal Muscle AMPK. *Diabetes* **66**, 2942-2951.
- Yin X, Zheng Y, Liu Q, Cai J & Cai L. (2012). Cardiac response to chronic intermittent hypoxia with a transition from adaptation to maladaptation: the role of hydrogen peroxide. *Oxid Med Cell Longev* **2012**, 569520.
- Yin X, Zhou S, Zheng Y, Tan Y, Kong M, Wang B, Feng W, Epstein PN, Cai J & Cai L. (2014). Metallothionein as a compensatory component prevents intermittent hypoxia-induced cardiomyopathy in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* **277**, 58-66.

Figures

**Table 1**

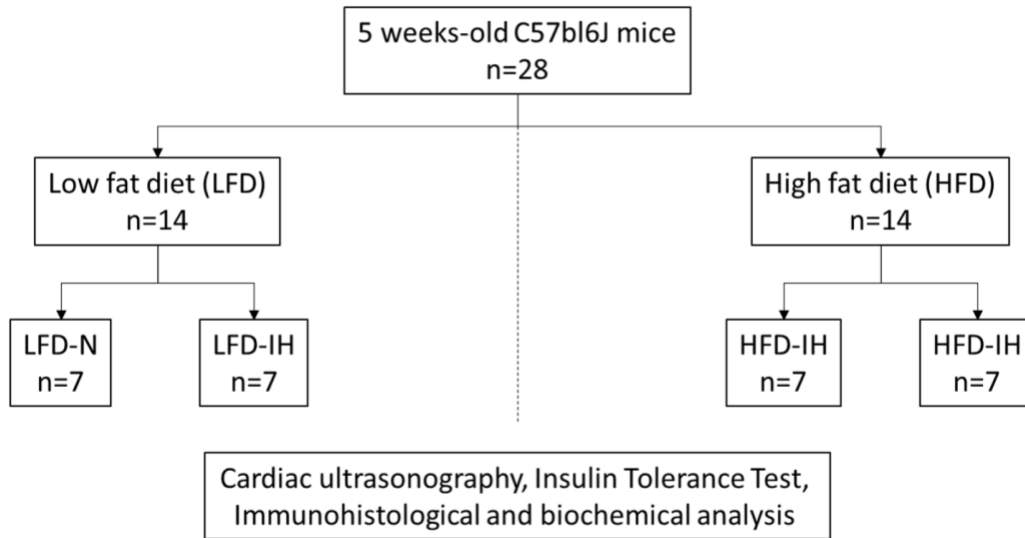
	<b>LFD-N</b>	<b>LFD-IH</b>
HR (beats/min)	357 ± 15	372 ± 21
IVSd (mm)	0,688 ± 0,022	0,744 ± 0,020
IVSs (mm)	0,941 ± 0,025	1,021 ± 0,056
LVDd (mm)	4,062 ± 0,083	3,785 ± 0,134
LVDs (mm)	3,161 ± 0,099	2,654 ± 0,214*
LVPWd (mm)	0,722 ± 0,022	0,692 ± 0,021
LVPWs (mm)	0,929 ± 0,017	0,983 ± 0,051
EF (%)	45,2 ± 2,2	57,5 ± 4,8*
FS (%)	22,2 ± 1,3	26,8 ± 1,1

**Table 2**

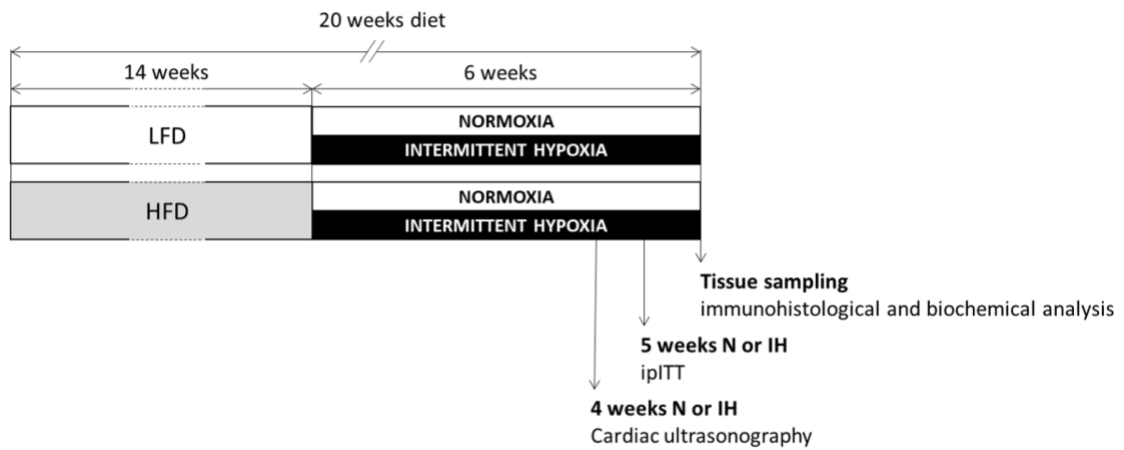
	<b>HFD-N</b>	<b>HFD-IH</b>
HR (beats/min)	355 ± 14	337 ± 12
IVSd (mm)	0,868 ± 0,028	0,716 ± 0,027*
IVSs (mm)	1,182 ± 0,038	0,980 ± 0,034*
LVDd (mm)	4,184 ± 0,173	4,121 ± 0,101
LVDs (mm)	3,157 ± 0,203	3,193 ± 0,123
LVPWd (mm)	0,843 ± 0,035	0,777 ± 0,020
LVPWs (mm)	1,099 ± 0,061	0,980 ± 0,042
EF (%)	49,4 ± 3,7	45,8 ± 2,5
FS (%)	24,9 ± 2,3	22,6 ± 1,5

**Figure 1**

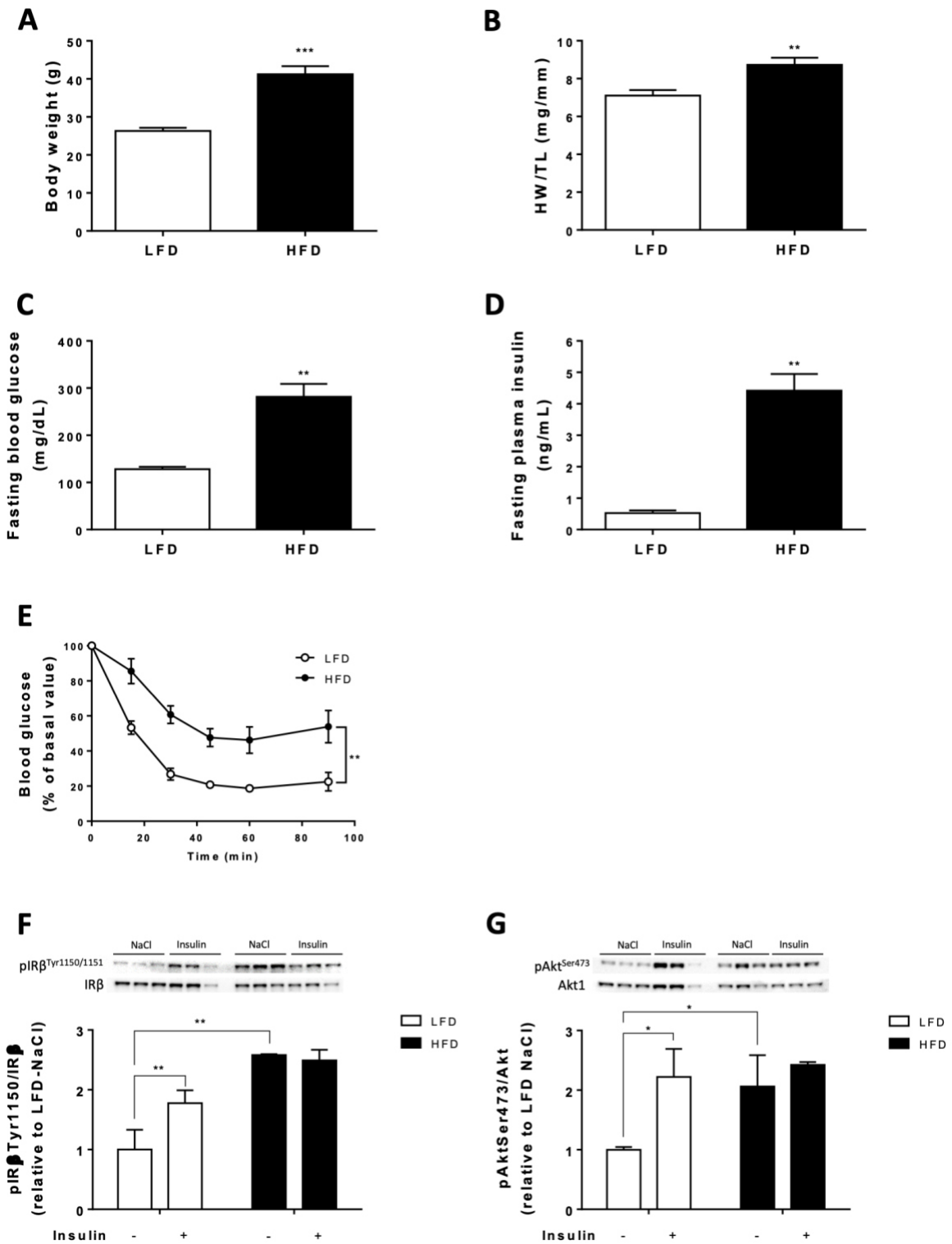
**A**



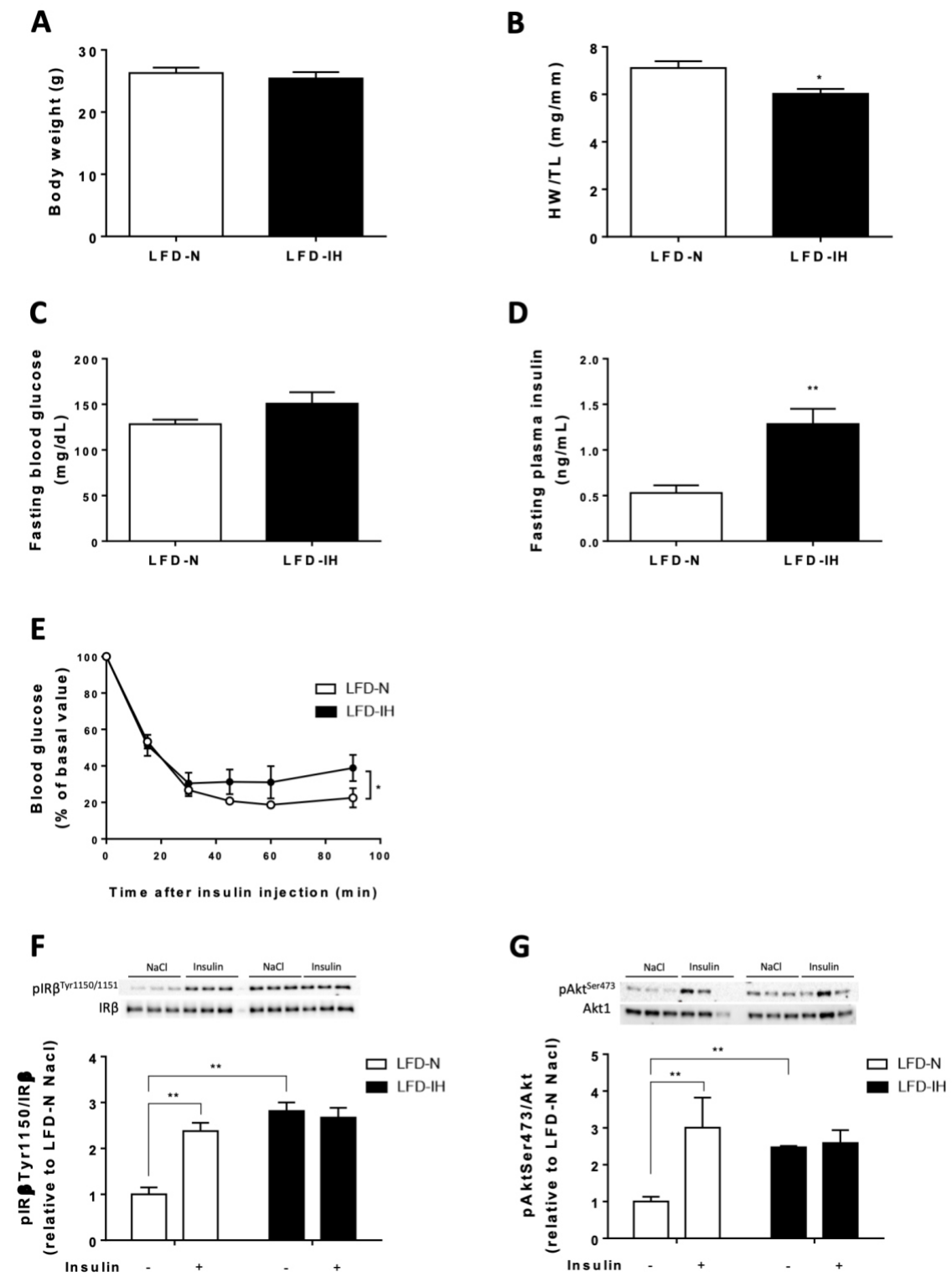
**B**



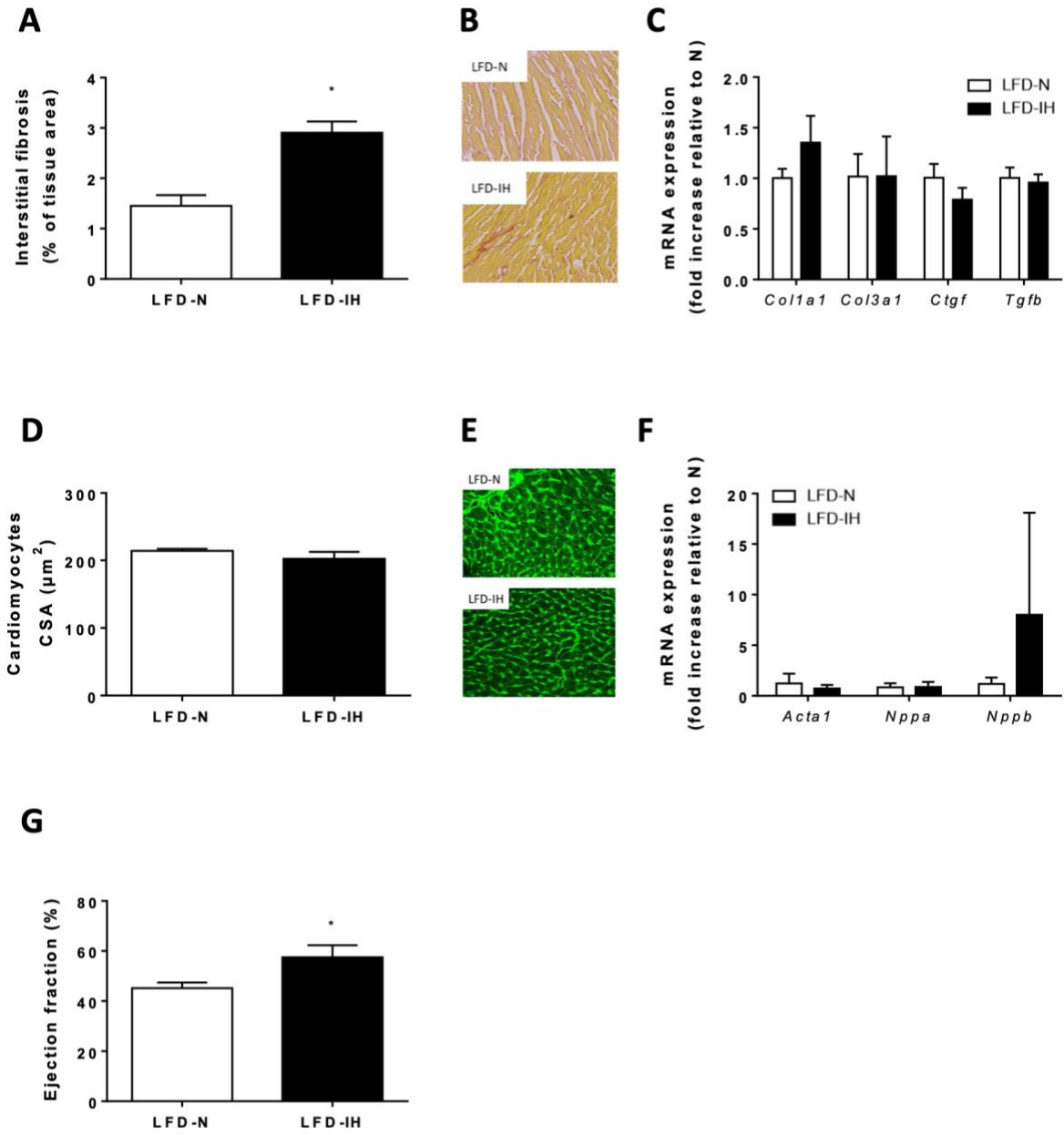
**Figure 2**



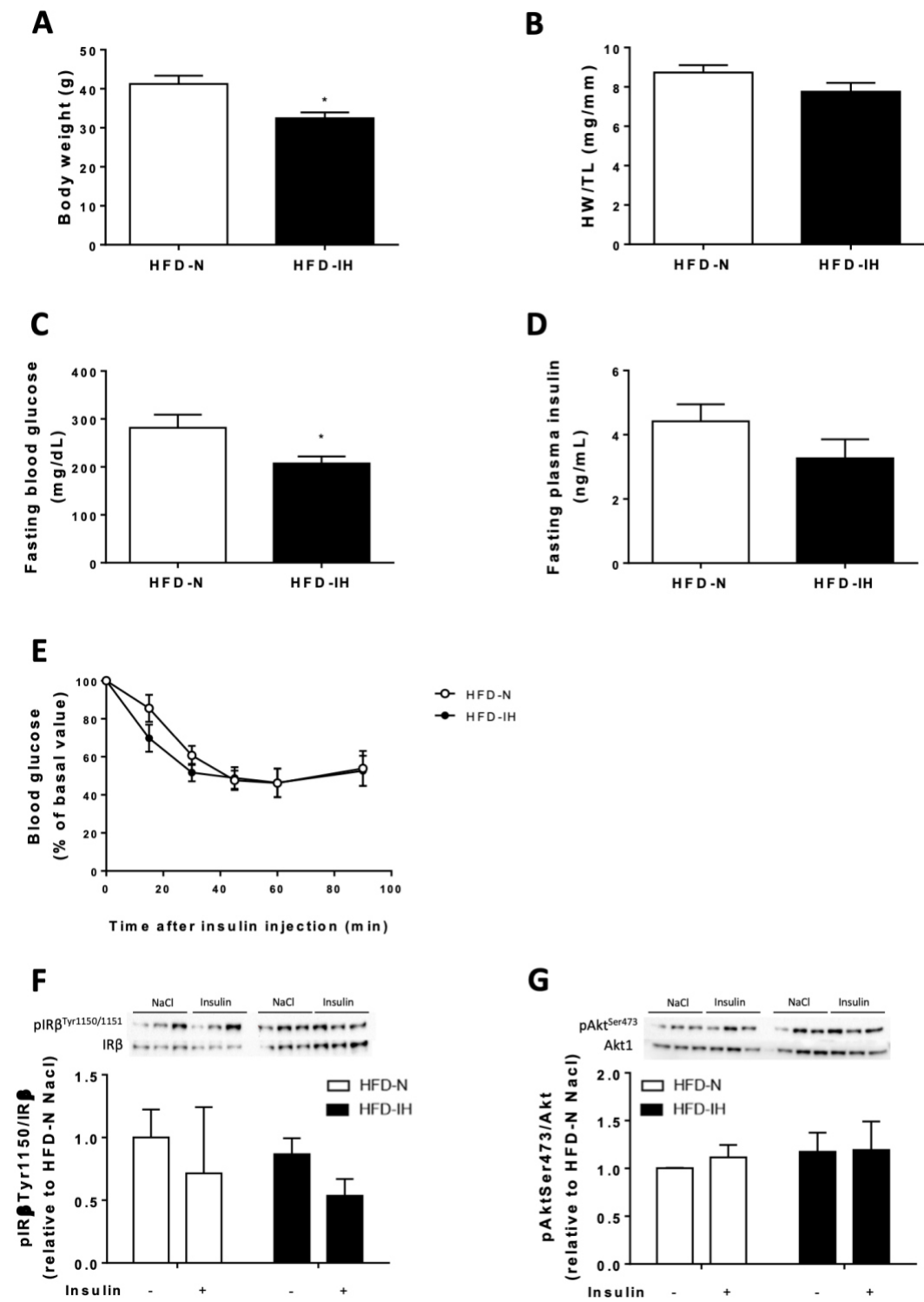
**Figure 3**



**Figure 4**

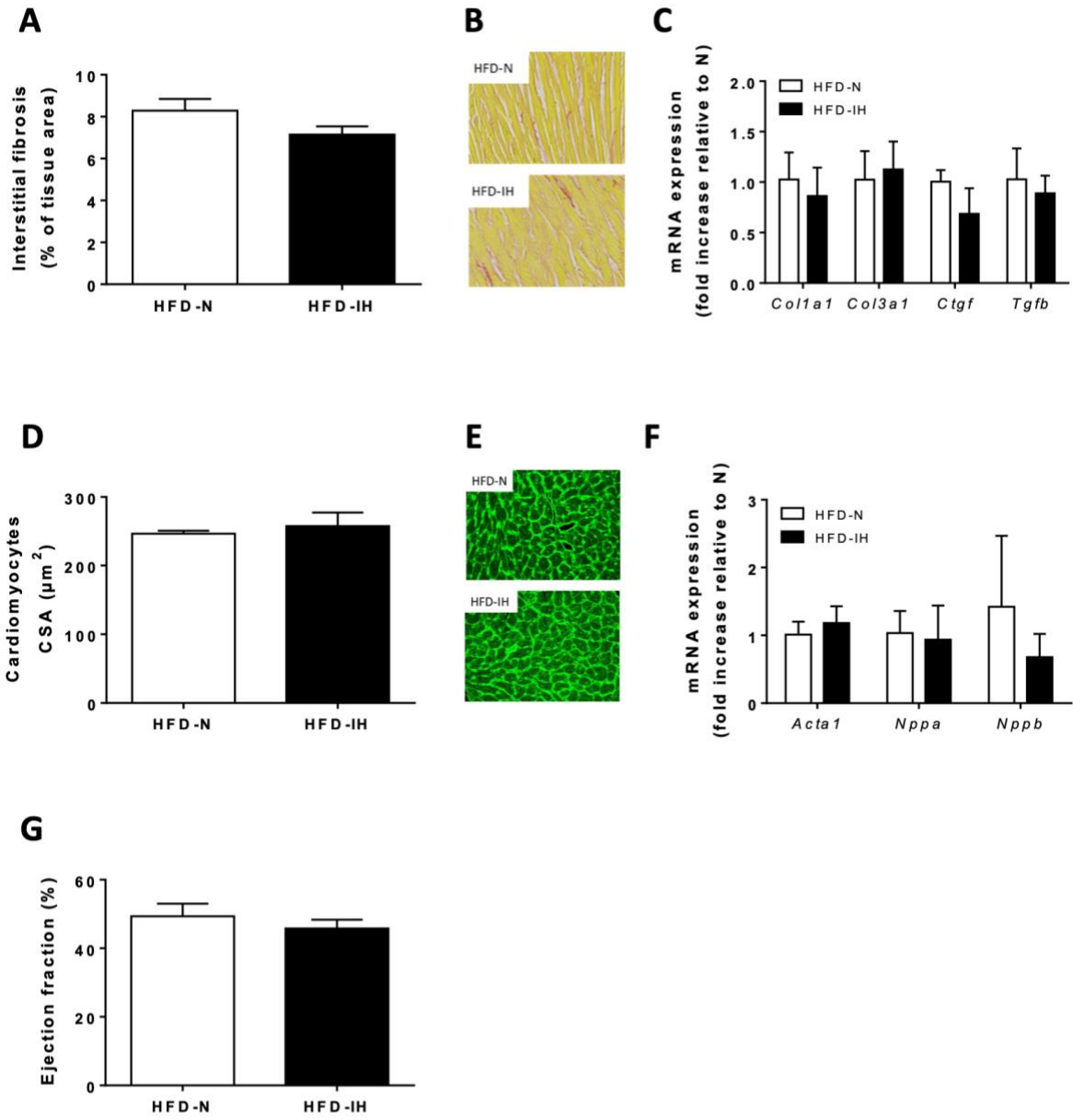


**Figure 5**





**Figure 6**



## Supplemental Table 1

	Forward	Reverse
<i>Col1a1</i>	GCGAAGGCAACAGTCGATTC	CCCAAGTCCGGTGTGACTC
<i>Col3a1</i>	CAGCTGGCCTCCTCAGACTT	GCTGTTTTGCAGTGGTATGTAATG
<i>Tgfβ1</i>	GCTGCTGACCCCACTGAT	GCCACTGCCGGACAACCTC
<i>Acta1</i>	GGCTCCCAGCACCATGAAGA	CAGCACGATTGTCGATTGTCG
<i>Nppa</i>	AGGCCATATTGGAGCAAATC	CTCCTCCAGGTGGTCTAGCA
<i>Nppb</i>	AACAACCTCAGCCCGTCAC	AGGCCATATTGGAGCAAATC

## Supplemental Table 2

	LFD	HFD
HR (beats/min)	357 ± 15	355 ± 14
IVSd (mm)	0,688 ± 0,022	0,868 ± 0,028**
IVSs (mm)	0,941 ± 0,025	1,182 ± 0,038**
LVDd (mm)	4,062 ± 0,083	4,184 ± 0,173
LVDs (mm)	3,161 ± 0,099	3,157 ± 0,203
LVPWd (mm)	0,722 ± 0,022	0,843 ± 0,035
LVPWs (mm)	0,929 ± 0,017	1,099 ± 0,061
EF (%)	45,2 ± 2,2	49,4 ± 3,7
FS (%)	22,2 ± 1,3	24,9 ± 2,3

## 2. EXPORTATION DES RESULTATS DE L'ANALYSE STATISTIQUE SUR RSTUDIO

Au cours de ma thèse je me suis intéressé au code R, afin d'effectuer mon plan statistique à l'aide d'un logiciel open-source. Le résultat des tests statistiques n'étant pas toujours très lisible pour des néophytes, j'ai cherché à exporter mes résultats pour qu'ils soient accessibles à tous.

Sur le logiciel Rstudio, à l'aide du code R et Knitr, j'ai exporté mes résultats en fichier .HTML pouvant être lu sur n'importe quel navigateur internet.

L'intégralité des variables à analyser, la localisation des bases de données etc. sont listées dans un tableur (Tableau 6). R lit ce tableur (matrice), récupère les données, effectue l'intégralité de tous les tests statistiques pour toutes les variables d'intérêt, crée les graphiques associés et exporte tout en .HTML (Figure 60, Figure 61, Figure 62, Figure 63, Figure 64 et Figure 65).

DATA_LOCALISATION	EXCELFEUIL	VARIABLE	NAME	YLAB	ANIMAL_EXCLUSION	JUSTIFICATION_EXCLUSION
Localisation de la base de données sur l'ordinateur	Feuilles de la base de données où sont les données	Nom de la variable dans la base de données	Nom qu'aura la variable dans le fichier HTML final	Nom de l'axe des ordonnées sur les graphiques	Animaux exclus de l'analyse	Justification de l'exclusion

Tableau 6. Matrice type, référençant l'emplacement des bases de données avec les variables à analyser.

La matrice fait référence aux différentes bases de données où les données sont rangées en colonne pour chaque variable (Tableau 7).

NAME	LIGATURE	EXPOSURE	SYMPATHECTOMY	SURGERY_DATE	OBSERVATIONS	VARIABLE_1	VARIABLE_2	VARIABLE_...
Nom de l'animal	MI Ou SHAM	IH Ou N	CSD Ou SHAM	DD/MM/AAAA	...	...	...	...

Tableau 7. Type de base de données interrogées par R.

Les premières colonnes permettent l'identification des animaux.

- Echo - EF (0w)
- Echo - FS (0w)
- Echo - LVIDd (0w)
- Echo - LVIDs (0w)
- Echo - LVPWd (0w)
- Echo - LVPWs (0w)
- Echo - IVSd (0w)
- Echo - IVSs (0w)
- Echo - Heart rate (0w)
- Echo - EF (6w)
- Echo - FS (6w)
- Echo - LVIDd (6w)
- Echo - LVIDs (6w)
- Echo - LVPWd (6w)
- Echo - LVPWs (6w)
- Echo - IVSd (6w)
- Echo - IVSs (6w)
- Echo - Heart rate (6w)
- Echo - EF (12w)
- Echo - FS (12w)

### Echo - EF (0w)

Data

Homoscedasticity

Normality

Non-parametric Test

Parametric Test

Graphs

**Variable:**  
ECHO\_0W\_EF

**Data table:**

x2	y1
MI CSD IH	40.14927
MI CSD IH	45.34676
MI IH	39.57680
MI IH	32.40193

**Descriptive Statistics**

x	N	mean	median	sd	sem
MI N	10	38.83772	40.25602	4.40815	1.393979
MI IH	11	41.22070	41.31087	5.19855	1.567422
MI CSD IH	9	39.77924	39.51181	4.87561	1.625203

### Echo - FS (0w)

Data

Homoscedasticity

Normality

Non-parametric Test

Parametric Test

Graphs

**Variable:**  
ECHO\_0W\_FS

**Data table:**

Figure 60. Aperçu du fichier .HTML généré (Données)

Sur la partie gauche de l'image se trouve l'intégralité des variables analysées. Sur la partie centrale en gras on retrouve le nom de la variable analysée (Echo – EF (0w)) et ensuite différents onglets en commençant par « Data », référençant le nom de la variable dans la base de données (ECHO\_0W\_EF), l'intégralité des données bruts (Data table :), puis des statistiques descriptives pour les différents groupes (nombre d'animaux par groupes ; moyennes ; médianes etc.).

### Echo - EF (12w)

Data

Homoscedasticity

Normality

Non-parametric Test

Parametric Test

Graphs

**Bartlett Test**

	x
statistic.Bartlett's K-squared	0.793004425553163
parameter.df	2
p.value	0.672668788233847
data.name	y1 by x
method	Bartlett test of homogeneity of variances

**Levene Test**

	x
Df1	2.0000000
Df2	27.0000000
F value1	0.2129017
F value2	NA
Pr(>F)1	0.8095794
Pr(>F)2	NA

Figure 61. Aperçu du fichier .HTML généré (Homoscédasticité).

Le test de Bartlett et Levene permettent d'évaluer l'homoscédasticité c'est-à-dire l'homogénéité des variances.

Data	Homoscedasticity	Normality	Non-parametric Test	Parametric Test	Graphs
<b>Shapiro Test</b>					
<b>x</b>					
statistic.W	0.768984114612773				
p.value	0.00607810378462349				
method	Shapiro-Wilk normality test				
data.name	y1[which(x == "MI N")]				
<b>x</b>					
statistic.W	0.957215508355489				
p.value	0.736538573306326				
method	Shapiro-Wilk normality test				
data.name	y1[which(x == "MI IH")]				
<b>x</b>					
statistic.W	0.883085168608566				
p.value	0.169163783150983				
method	Shapiro-Wilk normality test				
data.name	y1[which(x == "MI CSD IH")]				

Figure 62. Aperçu du fichier .HTML généré (Normalité).

Le test de Shapiro permet d'évaluer la normalité de la variable et vérifier que la distribution des valeurs respecte la loi normale.

## Echo - EF (12w)

Data	Homoscedasticity	Normality	Non-parametric Test	Parametric Test	Graphs
<b>Kruskall</b>					
<b>x</b>					
statistic.Kruskal-Wallis chi-squared	10.5408797653959				
parameter.df	2				
p.value	0.00514134848529742				
method	Kruskal-Wallis rank sum test				
data.name	y1 and as.factor(x)				
<b>Post-hoc - Dunn Test</b>					
	<b>MI CSD IH</b>	<b>MI IH</b>			
MI IH	0.0455833	NA			
MI N	1.0000000	0.0072245			

Figure 63. Aperçu du fichier .HTML généré (Test non-paramétrique).

Le programme effectue ensuite les tests non-paramétriques, Kruskal-Wallis et le test post-hoc de Dunn.

# Echo - EF (12w)

Data Homoscedasticity Normality Non-parametric Test Parametric Test Graphs

## One-Way ANOVA

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
as.factor(x)	2	250.37	125.19	6.46	0.0051
Residuals	27	523.09	19.37		

## Post-hoc - Tukey

	diff	lwr	upr	p adj
MI IH-MI CSD IH	-6.064767	-10.969942	-1.159592	0.0131297
MI N-MI CSD IH	-0.134764	-5.149091	4.879563	0.9975551
MI N-MI IH	5.930003	1.161628	10.698378	0.0125786

Figure 64. Aperçu du fichier .HTML généré (Test paramétrique).

Puis il effectue les tests paramétriques, One-way ANOVA et le test post-hoc de Tukey.

## Echo - EF (12w)

Data Homoscedasticity Normality Non-parametric Test Parametric Test Graphs

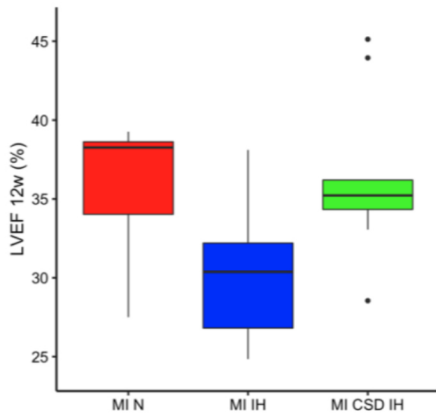


Figure 1: Median in box plot

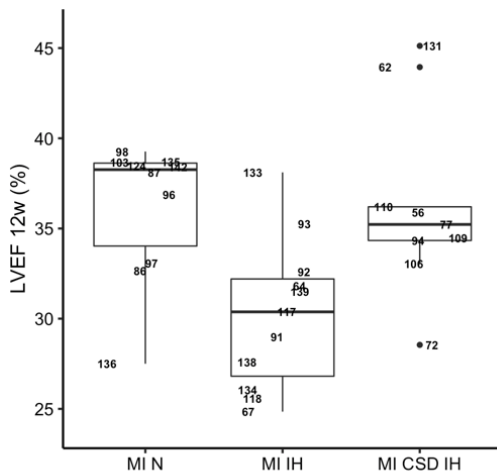


Figure 2: Median in box plot with animal ID

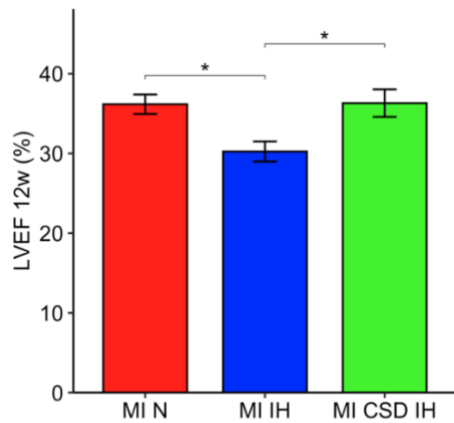


Figure 3: Histogram mean with sem of Echo - EF (12w) .

Number of animals: MI N: 10; MI IH: 11; MI CSD IH: 9.

This statistical analysis is non-parametric with kruskall wallis pvalue = 0.01. \* for p-value < 0.05.

Figure 65. Aperçu du fichier .HTML généré (Graphiques).

Pour finir, 3 types de graphiques sont générés, un box plot classique, un autre où chaque nom d'animal est affiché afin de les identifier plus facilement, puis un histogramme des moyennes. Sur l'histogramme, la significativité est automatiquement reportée. Le programme choisi le résultat du test paramétrique ou non paramétrique en fonction du respect de l'homoscédasticité et de la variance. Il affiche ensuite en légende le nombre d'animaux par groupe et le test effectué.

### 3. COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES – PRESENTATIONS – POSTERS

#### PRÉSENTATIONS ORALES

*Role of intermittent hypoxia-induced cardiac sympathetic overactivity on ischemic cardiomyopathy progression*

- **Printemps de la cardiologie 2019** Lille :

*Impact of intermittent hypoxia on ischemic cardiomyopathy, focus on sympathetic activity*

- **Congrès de l'European Respiratory Society (ERS) 2018** Paris
- **Congrès de l'International Society for Heart Research (ISHR) Young investigators 2018** Amsterdam

#### PRÉSENTATIONS DE POSTERS

*Impact of cardiac sympathetic denervation on IH-induced ischemic cardiomyopathy aggravation*

- **Printemps de la cardiologie 2020** e-congrès
- **Congrès de l'European Respiratory Society (ERS) 2020** e-congrès

*Impact de la dénervation cardiaque sur l'aggravation de la cardiopathie ischémique causée par l'hypoxie intermittente chez le rat.*

- **Le congrès du sommeil 2019** Lille

*Role of intermittent hypoxia-induced cardiac sympathetic overactivity on ischemic cardiomyopathy progression*

- **Journée de la Recherche Médicale (JRM) 2019** Grenoble : (**Prix Poster fondamental**)

*Mechanisms involved in the deleterious impact of intermittent hypoxia on ischemic cardiomyopathy*

- **International Society for Heart Research (ISHR) 2018** Amsterdam
- **Journée de la Recherche Médicale (JRM) 2018** Grenoble
- **Journée Annuelle du Doctorant EDCSV (JAD) 2018** Grenoble
- **Printemps de la cardiologie 2018** Montpellier

*Impact of four weeks intermittent hypoxia on calcium handling proteins in a rat model of post-ischemic heart failure*

- **Printemps de la cardiologie 2017** Nantes