



**HAL**  
open science

# Impact du Syndrome d'Apnées Hypopnées Obstructives du Sommeil sur la fonction endothéliale

Vanessa Bironneau

► **To cite this version:**

Vanessa Bironneau. Impact du Syndrome d'Apnées Hypopnées Obstructives du Sommeil sur la fonction endothéliale. Médecine humaine et pathologie. Université d'Angers, 2020. Français. NNT : 2020ANGE0014 . tel-03738026

**HAL Id: tel-03738026**

**<https://theses.hal.science/tel-03738026>**

Submitted on 25 Jul 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.

# THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE D'ANGERS  
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 605  
*Biologie Santé*  
Spécialité : « Physiologie et Physiopathologie humaine »

Par

**Vanessa BIRONNEAU**

**Impact du Syndrome d'Apnées Hypopnées Obstructives du Sommeil  
sur la fonction endothéliale**

Thèse présentée et soutenue à Angers, le 23 Mars 2020

Unité de recherche : INSERM U1063 SOPAM : « Stress Oxydant et Pathologies Métaboliques »

Thèse N° : (10)

## Rapporteurs avant soutenance :

Marie Pia D'ORTHO, PU-PH, Université de Paris Diderot  
Florence PINET, DR INSERM, Institut Pasteur de Lille

## Composition du Jury :

Prénom Nom Fonction et établissement d'exercice  
Président (*à préciser après la soutenance*)  
Marie Pia D'ORTHO, PU-PH, Université de Paris Diderot  
Florence PINET, DR INSERM, Institut Pasteur de Lille

Frédéric Gagnadoux, PU-PH, Université d'Angers  
Directeur de thèse  
Carmen MARTINEZ, DR CNRS, Université d'Angers  
Co-directeur de thèse

# Table des matières

Table des matières.....	2
Table des figures.....	5
Table des tableaux.....	6
Remerciements.....	7
Publications et communications.....	9
Publications.....	9
<i>Articles originaux</i> .....	9
<i>Participation à des ouvrages</i> .....	10
Communications.....	10
<i>Orales</i> .....	10
<i>Posters</i> .....	11
<i>Conférences sur invitation</i> .....	11
Liste des abréviations.....	12
Introduction générale.....	13
1. Comorbidités et risques cardiovasculaires du SAHOS.....	15
a. <i>SAHOS : généralités</i> .....	15
b. <i>Complications cardiovasculaires</i> .....	16
i. Hypertension artérielle.....	17
ii. Complication cardiaque.....	18
<b>1) <i>Infarctus du myocarde</i></b> .....	18
2) Trouble du rythme.....	18
iii. Accident vasculaire cérébral (AVC).....	18
iv. Maladies thromboemboliques et athérosclérose.....	19
c. <i>Autres comorbidités associées au SAHOS</i> .....	19
• Le diabète de type 2.....	20
o Généralités.....	20
o Diabète de type 2 et complications cardiovasculaires.....	20
o Diabète de type 2 et SAHOS.....	20
2. Fonction endothéliale.....	22

a.	<i>Physiologie de la fonction endothéliale</i> .....	22
b.	<i>Physiopathologie de la dysfonction endothéliale</i> .....	24
c.	<i>Evaluation de la fonction endothéliale in vivo</i> .....	25
i.	Réponse à l'hyperhémie .....	25
1)	Pléthysmographie.....	25
2)	Pléthysmographie digitale ou RH-PAT.....	26
3)	Dilatation liée au flux (FMD).....	27
ii.	Réponse aux molécules vasodilatatrices .....	27
1)	Injections intra coronaires.....	27
2)	Iontophorèse .....	28
d.	<i>Dysfonction endothéliale : facteur prédictif de maladies cardiovasculaires</i> .....	29
3.	Vésicules extracellulaires.....	30
a.	<i>Généralités</i> .....	30
b.	<i>Microvésicules et SAHOS</i> .....	32
c.	<i>Microvésicules et pathologies cardiovasculaires</i> .....	34
4.	miRNA.....	35
a.	<i>Généralités</i> .....	35
b.	<i>miRNA et SAHOS</i> .....	36
c.	<i>miRNA et pathologies cardiovasculaires</i> .....	38
Partie 1 : SAHOS et dysfonction endothéliale .....		40
1.	Objectif .....	40
2.	Projet 1 : Recherche d'une association indépendante entre la sévérité du SAHOS et la DE .....	41
a.	<i>Résultats expérimentaux : projet 1</i> .....	42
b.	<i>Conclusion Projet 1</i> .....	71
3.	Projet 2 : Rôle du SAHOS sur la dysfonction endothéliale des patients diabétiques de type 2 – DIVAS .....	72
a.	<i>Résultats expérimentaux : Projet 2</i> .....	73
b.	<i>Conclusion Projet 2</i> .....	84
4.	Conclusion partie 1 .....	85
Partie 2 : SAHOS et miRNA .....		86
Projet 3 : Modifications phénotypiques des miRNAs transportés par les microvésicules chez les patients apnéiques .....		86
1.	Objectif .....	86

2. Travail en cours : Méthodes, résultats et difficultés.....	87
a. Recueil des données cliniques et para cliniques.....	87
b. Isolement des MV .....	88
c. Etude des miRNA.....	89
i. Screening des miRNA .....	89
ii. Confirmation des miRNA d'intérêt par qRT-PCR :.....	90
1. Extraction des miRNA.....	90
2. RT-PCR .....	91
3. qPCR .....	91
d. Transfection des miR synthétiques et antagomir .....	93
e. Culture cellulaire .....	95
f. Angiogenèse.....	96
g. Western Blot .....	97
3. Conclusion .....	99
Discussion générale .....	100
Références.....	104
Annexes.....	115

## Table des figures

<b>Figure 1.</b> Mécanismes des atteintes vasculaires au cours du SAHOS (d'après (Stiefel et al., 2013).....	17
<b>Figure 2.</b> Corrélation positive entre le déséquilibre du diabète et la sévérité du SAHOS (Pamidi et Aronsohn, 2010).....	21
<b>Figure 3.</b> Relations physiopathologiques entre le SAHOS et le DT2. Modifié d'après Muraki et al., 2018. ....	22
<b>Figure 4.</b> Composition de la paroi artérielle.....	23
<b>Figure 5.</b> Technique de pléthysmographie. ....	26
<b>Figure 6.</b> RH-PAT : sonde de pléthysmographie (à gauche), tracé et calcul de l'index RH-PAT (à droite). ....	26
<b>Figure 7.</b> Technique de FMD (Daiber et al., 2019).....	27
<b>Figure 8.</b> Vasoréactivité dépendante de l'Ach lors d'une coronarographie (Daiber et al., 2017b).....	28
<b>Figure 9.</b> Biogenèse et libération des différentes vésicules extra cellulaires (d'après Yáñez-Mó et al., 2015). ....	30
<b>Figure 10.</b> Mécanismes aboutissant à la formation d'une MV ( d'après Mallocci et al., 2019). ....	31
<b>Figure 11.</b> Mécanismes d'interaction lors de la communication inter cellulaire entre la MV et la cellule cible (d'après (Mause and Weber, 2010). ....	32
<b>Figure 12.</b> Principales voies impliquant les MV dans la dysfonction endothéliale au cours du SAHOS (d'après (Trzepizur et al., 2014).....	33
<b>Figure 13.</b> Mécanismes de biogenèse des miRNA. Modifié d'après Li and Yang, 2013.....	36
<b>Figure 14.</b> Exemple de réponse décrite de la cellule endothéliale à l'HI (d'après Loscalzo, 2010). ....	37
<b>Figure 15.</b> Principaux miRNA et leur impact sur les mécanismes cellulaires conduisant à l'athérosclérose (à partir de (Laffont and Rayner, 2017). ....	39
<b>Figure 16.</b> Analyse en sous-groupes de la relation entre SAHOS et DE.....	71
<b>Figure 17.</b> Isolement des MV issues d'un patient. ....	88
<b>Figure 18.</b> Quantification relative du miR205 chez les patients apnéiques et les sujets contrôles.....	89
<b>Figure 19.</b> Expression du miR205 dans les MV de sujets sains en fonction du volume d'échantillon utilisé.....	92
<b>Figure 20.</b> Expression relative du miR205 (n=2).....	92
<b>Figure 21.</b> Schématisation de la transfection des miR205 synthétique dans les MV des sujets contrôles (A), et des antagomir 205 dans les MV des patients apnéiques (B).....	94
<b>Figure 22.</b> RT-qPCR du miR205 contenu dans les MV circulantes après transfection d'antagomir dans les MV de patients SAHOS (A) et de miR205 synthétique dans les MV de sujets contrôles (B). n=3. ....	95
<b>Figure 23.</b> Angogénèse des cellules EAhy926 sur puits Ibidi dans les différentes conditions de culture. ....	96
<b>Figure 24.</b> Matrigel lors des différentes conditions de traitement. ....	97
<b>Figure 25.</b> Expression des protéines pro-inflammatoires en fonction des conditions de culture des cellules EAhy926.....	98

## Table des tableaux

<b>Tableau 1.</b> <i>Les principales techniques utilisées pour l'évaluation de la fonction endothéliale in vivo ( d'après (Flammer et al., 2012a).....</i>	29
--	----

# Remerciements

Je tiens tout d'abord à présenter aux membres du jury toute ma gratitude et ma reconnaissance. Je remercie le Pr Marie Pia d'Ortho ainsi que le Dr Florence Pinet d'avoir accepté d'évaluer mon travail.

J'adresse mes remerciements au Pr Frédéric Gagnadoux et au Dr Carmen Martinez pour m'avoir encadré durant ce travail de thèse mais également lors de mon master 2. Merci pour votre disponibilité, vos conseils et votre aide précieuse dans la réalisation et la rédaction de ce manuscrit. J'ai énormément appris de vos connaissances, votre rigueur scientifique, votre curiosité lors de nos réunions et de nos échanges. Merci à vous deux.

Un grand merci au Dr Ramaroson Andriantsitohaina pour m'avoir accepté en thèse et accueilli au sein de votre laboratoire Stress Oxydant et pathologies métaboliques. Votre rigueur et votre exigence m'ont permis, je l'espère, de progresser tant sur la fond que sur la forme de mes recherches et de leur présentation.

Je remercie tous les membres de l'équipe de l'unité 1063, ainsi que les doctorants anciens et actuels. Vous m'avez tous apporté quelque chose que ce soit lors de réflexions scientifiques, l'apprentissage de différentes techniques alors que j'avais tout à apprendre lors de mes débuts en master 2. Vous m'avez également apporté votre soutien dans les moments plus difficiles. Grâce à vous tous, et à vos sourires et bonne humeur, il perdurait une ambiance agréable. Ça a été un plaisir de travailler avec vous tous.

Je remercie tout particulièrement Patricia, Luisa et Grégory, pour vos précieux conseils, votre patience et votre aide notamment pour l'apprentissage de nouvelles techniques et la mise en place de protocoles.

Je tiens à remercier le Pr Meurice, mon mentor. Depuis le début de mes études médicales, vous avez su me conseiller, me guider, me soutenir dans mon projet professionnel, avec toute la disponibilité, la patience et la gentillesse que l'on vous connaît. Vous avez également su me transmettre votre passion pour notre métier. Vos connaissances, votre jugement avisé, votre sens pédagogique et également vos qualités humaines sont des exemples pour moi. Un grand merci pour tout cela. Soyez certain de tout le respect et l'admiration que je vous porte.



Je remercie également mes collègues du service de pneumologie de Poitiers : Anne-Claire, Audrey, Elise, Émeline, Fabrice, Gaspard, Julien, Marion, Mylène. Votre compréhension et votre soutien pendant la période de rédaction en parallèle de mes activités de chef de clinique ont été importants pour moi. Merci pour avoir chacun accepté de modifier votre organisation afin de me libérer du temps pour la rédaction de ce manuscrit.

Merci à toute l'équipe de pneumologie, internes, infirmières, aides-soignantes, secrétaires.... Vos sourires sont contagieux. C'est un plaisir de travailler avec vous.

Je tiens à remercier de tout cœur ma famille, mes parents, Michelle et Jean-Pierre, ma sœur, Virginie, mon beau-frère, Benoit et mes nièces, Eloïse et Clara. Merci pour votre présence, votre soutien sans faille, votre patience et votre compréhension pour mes sautes d'humeur pendant les périodes plus difficiles. Les moments passés tous ensemble, en famille, sont une vraie bouffée d'oxygène !

Merci à toi Dim, l'homme qui partage ma vie. Depuis le début de ma thèse, nos vies ont connu de grands changements que ce soit professionnels pour nous deux, ou personnels. Certains difficiles et d'autres très joyeux avec notamment la naissance de nos filles ! La vie nous a mis à l'épreuve mais on lui prouve que l'on est plus fort. A chaque instant, tu es resté à mes côtés, tu sais me guider, me conseiller et me soutenir dans mes choix, et face aux difficultés. Tu m'apaises et me fait grandir.

A mes filles, Léa et Anaïs que j'aime d'un amour inconditionnel ! Les moments que l'on partage ensemble me ressourcent, me rappellent qu'il faut apprécier et profiter de chacun des petits plaisirs que la vie nous offre. Je vous promets de faire mon possible pour qu'ils soient les plus nombreux.

A tous ceux qui ne sont plus là, et qui me manquent...

# Publications et communications

## Publications

### Articles originaux

F Gagnadoux, JL Pépin, B Vielle, **V Bironneau**, F Chouet-Girard, S Launois, N Meslier, JC Meurice, XL Nguyen, A Paris, P Priou, R Tamisier, W Trzepizur, F Goupil, B Fleury. Impact of mandibular advancement therapy on endothelial function in severe obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med*, 2017.

**V Bironneau**, F Goupil, PH Ducluzeau, M Le Vaillant, P Abraham, S Henni, S Dubois, A Priou, N Meslier, C Sanguin, W Trzepizur, R Andriantsitohaina, MC Martinez, F Gagnadoux. Association between obstructive sleep apnea severity and endothelial dysfunction in patients with type 2 diabetes. *Cardiovasc Diabetol*, 2017

JC Meurice, E Antone, M Gilbert, A Watrin, **V Bironneau**. Syndrome d'apnées obstructives du sommeil : le traitement par pression positive continu. *Presse Méd*, 2017

F Gagnadoux, JL Pépin, B Vielle, **V Bironneau**, F Chouet-Girard, S Launois, N Meslier, JC Meurice, XL Nguyen, A Paris, P Priou, R Tamisier, W Trzepizur, F Goupil, B Fleury. Reply: the choice of indicators for obstructive sleep apnea treatment outcome evaluation: a matter of time dependent response ? *Am J Respir Critical Care Med*. 2017

W Trzepizur, **V Bironneau**, S Recoquillon, P Priou, N Meslier, JF Hamel, S Henni, A Darsonval, K Messaoudi, MC Martínez, R Andriantsitohaina, F Gagnadoux. Polyphenols Have No Impact on Endothelial Function in Patients with Obstructive Sleep Apnea: A Randomized Controlled Trial. *Nutr*. 2018 Apr 1;148(4):581-586.

S Recoquillon, JL Pépin, B Vielle, R Andriantsitohaina, **V Bironneau**, F Chouet-Girard, B Fleury, F Goupil, S Launois, MC Martinez, N Meslier, XL Nguyen, A Paris, P Priou, R Tamisier, W Trzepizur, F Gagnadoux. Effect of mandibular advancement therapy on inflammatory and metabolic biomarkers in patients with severe obstructive sleep apnoea: a randomised controlled trial. *Thorax*. 2019 May;74(5):496-499.

M. Patout, F. Gagnadoux, C. Rabec, W. Trzepizur, M. Georges, C. Perrin, R. Tamisier, J-L. Pépin, C. Llontop, V. Attali, F. Goutorbe, S. Pontier-Marchandise, P. Cervantes, **V. Bironneau**, A. Portmann, J. Delrieu, A. Cuvelier, J. F. Muir. AVAPS-AE vs ST mode: A randomised controlled trial in patients with obesity hypoventilation syndrome. *En cours de révision*

**V Bironneau**, R Tamisier, W Trzepizur, R Andriantsitohaina, M Berger, F Goupil, M Joyeux-Faure, I Jullian-Desayes, S Launois, M Le Vaillant, MC Martinez, F Roche, JL Pépin, F Gagnadoux. Obstructive sleep apnoea and endothelial dysfunction: an individual patient data meta-analysis. *En cours de révision*

## Participation à des ouvrages

**V Bironneau**, JC Meurice. Traitement du syndrome d'apnées / hypopnées obstructives au cours du sommeil. EMC. 2018

**V Bironneau**, JC Meurice. Démarche diagnostique et thérapeutique devant une suspicion de syndrome d'apnées obstructives du sommeil. EMC, AKOS (Traité de Médecine) 2019 :1-10

**V Bironneau**, JC Meurice. Médecine personnalisée dans les apnées obstructives du sommeil. Médecine du Sommeil, *sous presse*

## Communications

### Orales

**V Bironneau**, M Le Vaillant, R Andriantsitohaina, F Goupil, S Launois, JL Pépin, P Priou, W Trzepizur, MC Martinez, F Gagnadoux. Impact du Syndrome d'Apnées-Hypopnées Obstructives du Sommeil sur la fonction endothéliale chez les patients atteints de diabète de type 2 -*Etude DIVAS*, Congrès de Pneumologie de Langue Française, 2017.

**V Bironneau**, M Le Vaillant, R Andriantsitohaina, F Goupil, S Launois, JL Pépin, P Priou, W Trzepizur, MC Martinez, F Gagnadoux. Contributions des apnées obstructives du sommeil sur la dysfonction endothéliale. Congrès du sommeil, 2018

S Recoquillon, J-L Pépin, B Vielle, R Andriantsitohaina, **V Bironneau**, F Chouet-Girard, B Fleury, F Goupil, S Launois, M-C Martinez, N Meslier, X-L Nguyen, A Paris, P Priou, R Tamisier, W Trzepizu, F Gagnadoux. Effets de l'avancée mandibulaire sur les facteurs circulants dans le syndrome d'apnées du sommeil (SAS) sévère : un essai randomisé contrôlé Congrès du sommeil, 2018

**V. Bironneau**, R. Tamisier, W. Trzepizur, R Andriantsitohaina, M. Berger, F. Goupil, M. Joyeux-Faure, I. Jullian-Desayes, S. Launois, M. Le Vaillant, M.C. Martinez, F. Roche, J.L. Pépin, F. Gagnadoux. Obstructive sleep apnoea severity and endothelial dysfunction: an individual patient data meta-analysis. ERS, 2019

**V. Bironneau**, R. Tamisier, W. Trzepizur, R Andriantsitohaina, M. Berger, F. Goupil, M. Joyeux-Faure, I. Jullian-Desayes, S. Launois, M. Le Vaillant, M.C. Martinez, F. Roche, J.L. Pépin, F. Gagnadoux. Syndrome d'Apnées Obstructives du Sommeil et dysfonction endothéliale : une méta analyse. .  
Congrès du sommeil, 2019 et CPLF, 2020

## Posters

**V Bironneau**, F Goupil, PH Ducluzeau, M Le Vaillant, P Abraham, S Henni, S Dubois, A Priou, N Meslier, C Sanguin, W Trzepizur, R Andriantsitohaina, MC Martinez, F Gagnadoux. Association between obstructive sleep apnea severity and endothelial dysfunction in patients with type 2 diabetes.  
Sleep and breathing, 2017 : congrès international  
Le printemps de la cardiologie, 2017

**V. Bironneau**, F. Gagnadoux, P. Ingrand, S. Pontier, C. Iamandi, L. Portel, F. Martin, A Mallart, L. Lerousseau, D. Alfandary, V. Levrat, F. Portier, R. Tamisier, F. Goutorbe, C Rabec, F. Codron, G. Auregan, M. Mercy, V. Attali, F. Soyez, C. Launois, D. Recart, M. F. Vecchierini, J. C. Meurice. Factors influencing the level of efficient pressure in continuous positive-airway pressure to treat obstructive sleep apnea.  
Congrès de European Respiratory Society, 2018

M. Patout, F. Gagnadoux, C. Rabec, W. Trzepizur, M. Georges, C. Perrin, R. Tamisier, C. Llontop, F. Goutorbe, C. Gounane, S. Marchandise, P. Cervantes, **V. Bironneau**, A. Portmann, J. Delrieu, J-F. Muir, A. Cuvelier. Sleep quality using AVA™S-AE versus ST mode : a randomized controlled trial in patients with obesity hypoventilation syndrome.  
ATS, 2019

## Conférences sur invitation

Phénotypes du Syndrome d'apnées obstructives du sommeil. SAV, 2016

Médecine personnalisée dans la prise en charge du SAOS, SAV, 2019

Journées des Conseils appliqués en Sommeil, Diabète et Ventilation, 2019

Apnées du Sommeil : Causes et Conséquences

Apnées du sommeil et comorbidités

SAHOS et diabète de type 2

Workshop – PPC difficile : anticiper, dépister et conduite à tenir

Congrès de la SFRMS, novembre 2019

## Liste des abréviations

ACFA : Arythmie cardiaque par fibrillation auriculaire  
Ach : Acétylcholine  
AOMI : Artériopathie oblitérante des membres inférieure  
AVC : Accident Vasculaire Cérébral  
CE : Cellule endothéliale  
CV : Cardio-vasculaires  
DE : Dysfonction endothéliale  
DT2 : Diabète de type 2  
eMV : Microvésicules issues des cellules endothéliales  
eNOS : Endothéliale nitrique oxyde synthase  
Et : Endothéline  
HbA1c : Hémoglobine glyquée  
HDL : Lipides de haute densité  
HIF-1 : Hypoxia-inducible factor 1  
HTA : Hypertension Artérielle  
IAH : Index d'apnées hypopnées  
IDM : Infarctus du Myocarde  
IMC : Index de Masse Corporelle  
LDL : Lipides de faible densité  
MiRNA / miR : miRNA  
MMP : Métalloprotéinases  
MV : Microvésicules  
NFS : Numération Formule Sanguine  
NO : Monoxyde d'azote  
NOS : Synthase de NO  
OAM : Orthèse d'avancée mandibulaire  
PAS : Pression artérielle systolique  
PAD : Pression artérielle diastolique  
PI3-K : Phosphatidylinositol 3-kinase  
PAF : Platelet activating factor  
PPP : Plasma pauvre en plaquettes  
PRP : Plasma riche en plaquettes  
RHI : Index de Réactivité Hyperhémique  
ROS : Reactive oxygen species  
SAHOS : Syndrome d'Apnées Hypopnées Obstructives du sommeil  
SDE : Somnolence diurne excessive  
VAS : Voies aériennes supérieures  
VE : Vésicules extracellulaires

## Introduction générale

Le Syndrome d'Apnées Hypopnées Obstructives du Sommeil (SAHOS) est une pathologie secondaire à des collapsus itératifs, partiels ou complets, des voies aériennes supérieures (VAS). Il est défini par un Index d'Apnées Hypopnées du sommeil (IAH), déterminé par un enregistrement polygraphique ou polysomnographique nocturne, supérieur à 5/heure. On parle de SAHOS sévère lorsque cet index est supérieur à 30/heure.

Le SAHOS est une pathologie responsable de conséquences immédiates telles que l'hypoxie intermittente (HI) et la fragmentation du sommeil, mais également de conséquences à long terme. En effet, le SAHOS est associé à un risque accru de complications cardio-vasculaires (CV) et métaboliques. La physiopathologie impliquée est encore mal définie mais plusieurs hypothèses sont explorées telles que le stress oxydant ou la dysfonction endothéliale (DE).

Le SAHOS est associé à des comorbidités comme l'obésité ou encore le diabète de type 2 (DT2). Or, ces comorbidités sont également responsables de complications CV. Par exemple, le DT2 est un risque accru d'infarctus du myocarde (IDM).

Les microvésicules (MV) pourraient contribuer à la DE mise en évidence au cours du SAHOS. Ce sont de petites vésicules dont le diamètre varie de 0,1 à 1 $\mu$ m. Elles font donc partie de la famille des vésicules extracellulaires (VE). La formation des MV résulte de processus par bourgeonnement, aussi bien physiologiques que pathologiques : soit un processus apoptotique, soit un stimulus physique ou chimique.

Elles sont composées d'une double membrane originaire de la membrane plasmique de la cellule souche. Elles peuvent contenir des protéines, des lipides mais également du matériel génétique tel que les miRNAs. Les MV jouent ainsi un rôle majeur dans la communication intercellulaire et pourraient ainsi expliquer en partie la DE au cours du SAHOS.

Dans le cadre du SAHOS, le taux global de MV circulantes est similaire chez des sujets sains ou porteurs d'un SAHOS. Cependant, leur phénotype diffère et leurs propriétés fonctionnelles diffèrent. Les MV au cours de cette pathologie sont responsables d'une diminution de la biodisponibilité du monoxyde d'azote (NO) ainsi qu'une augmentation de l'expression des molécules d'adhésion à l'endothélium. Les MV au cours du SAHOS sont également responsables d'une hyperréactivité vasculaire avec un rôle central et obligatoire de l'endothélium. Cette hyperréactivité pouvant être lié à une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Les MV de patients apnéiques favorisent également les phénomènes d'angiogenèse secondaire à la libération d'endothéline-1 (Et-1).

Il a également été montré qu'au cours du DT2, comorbidité reconnue du SAHOS, les MV de ces patients sont modifiées sur un plan quantitatif et phénotypique. De plus, les MV circulantes de ces patients agissent sur la cellule endothéliale en diminuant la production de NO et en augmentant la production de ROS. Les MV sont ainsi impliquées dans la DE observée au cours du diabète.

Parmi les molécules bioactives transférées par les MV, on retrouve les miRNA. Il s'agit de petits segments d'ARN simples brins, non codant, de 18 à 23 nucléotides. Leur fonction est le contrôle post-transcriptionnel en s'appariant à un ARN messager spécifique. Lors de cet appariement, le miRNA pourra cliver l'ARN ou encore réprimer ou activer la traduction. Or, différentes études ont permis d'isoler des miRNA impliqués dans la DE et les maladies CV.

Dans ce travail, nous avons donc évalué l'impact du SAHOS, par rapport à celui des comorbidités et entre autres celui du DT2, sur la DE en partie responsable des complications CV qui en résultent. Puis, nous avons cherché à identifier les miRNA présents au sein de ces MV et à définir leur rôle éventuel dans la DE médiée par les MV.

# **1. Comorbidités et risques cardiovasculaires du SAHOS**

## **a. SAHOS : généralités**

Le SAHOS est défini par l'existence de troubles respiratoires au cours du sommeil. Cette pathologie, réellement connue depuis les années 70, est caractérisée par des collapsus itératifs, partiels ou complets, des VAS au cours de sommeil et responsables de l'apparition des hypopnées et apnées. Il en résulte alors des micro-éveils avec une déstructuration du sommeil mais également une HI du fait des désaturations itératives.

La symptomatologie est essentiellement marquée par une somnolence diurne excessive (évaluée par le score d'Epworth) et des ronflements nocturnes. On peut également retrouver la description d'apnées par le conjoint, une nycturie, des réveils nocturnes, des céphalées matinales, des troubles de l'humeur et de la concentration...

Bien que le dépistage se soit largement développé ces dernières décennies, le diagnostic reste encore insuffisant et le SAHOS sous-évalué. Le diagnostic repose sur des critères cliniques (avec la présence des symptômes précédemment cités) mais surtout sur les résultats de la polygraphie ou polysomnographie. Le SAHOS sera alors défini par un IAH supérieure à 5/h. Cet enregistrement nocturne va également permettre de définir la gravité du syndrome :

- SAHOS léger :  $5/h \leq IAH < 15/h$
- SAHOS modéré :  $15/h \leq IAH < 30/h$
- SAHOS sévère :  $IAH \geq 30/h$ .

Cette pathologie, initialement considérée comme bénigne, est actuellement un véritable problème de santé publique. En effet, sa prévalence ne cesse d'augmenter. Bien que les différentes études ou cohortes, du fait de populations très hétérogènes, retrouvent des chiffres très variables (Kapur, 2010), les dernières études épidémiologiques retrouvent 12 à 49% des hommes et 6 à 24% des femmes d'âge moyen à avancé, porteurs d'un SAHOS (Heinzer et al., 2015; Peppard et al., 2013).

Au décours des différentes études épidémiologiques, il a été décrit plusieurs facteurs de risque de développer un SAHOS. Parmi cela, nous retrouvons le genre masculin, l'âge et l'obésité. En effet, l'ensemble des données concordent pour dire que la prévalence du SAHOS est 2 à 4 fois plus importante chez les hommes que chez les femmes. Cependant, si cela est vrai avant 50 ans, cette différence s'efface après la ménopause pour retrouver un risque similaire dans les deux populations (Trzepizur and Gagnadoux, 2014). Certaines des hypothèses pouvant expliquer cette différence sont une répartition des tissus mous différente en fonction du genre ou encore l'impact du statut hormonal avec un effet protecteur des hormones féminines. L'âge semble également être un facteur de risque. En effet, chez les hommes, la prévalence augmente progressivement jusqu'à l'âge de 65 ans. Après 70 ans, il semblerait que la prévalence stagne voire diminue. Une des hypothèses explicatives est la surmortalité dans cette population apnéique du fait entre autres des complications CV. Enfin et surtout, le facteur dont l'impact sur le risque de survenue d'un SAHOS semble le plus important, est l'obésité. En effet, il a été décrit l'existence d'une corrélation entre la sévérité du SAHOS et l'index de masse corporelle (IMC). La physiopathologie repose sur une infiltration des tissus mous des VAS et notamment du pharynx ou encore de la langue, par du tissu adipeux. Cette infiltration est responsable d'une diminution du calibre des VAS.

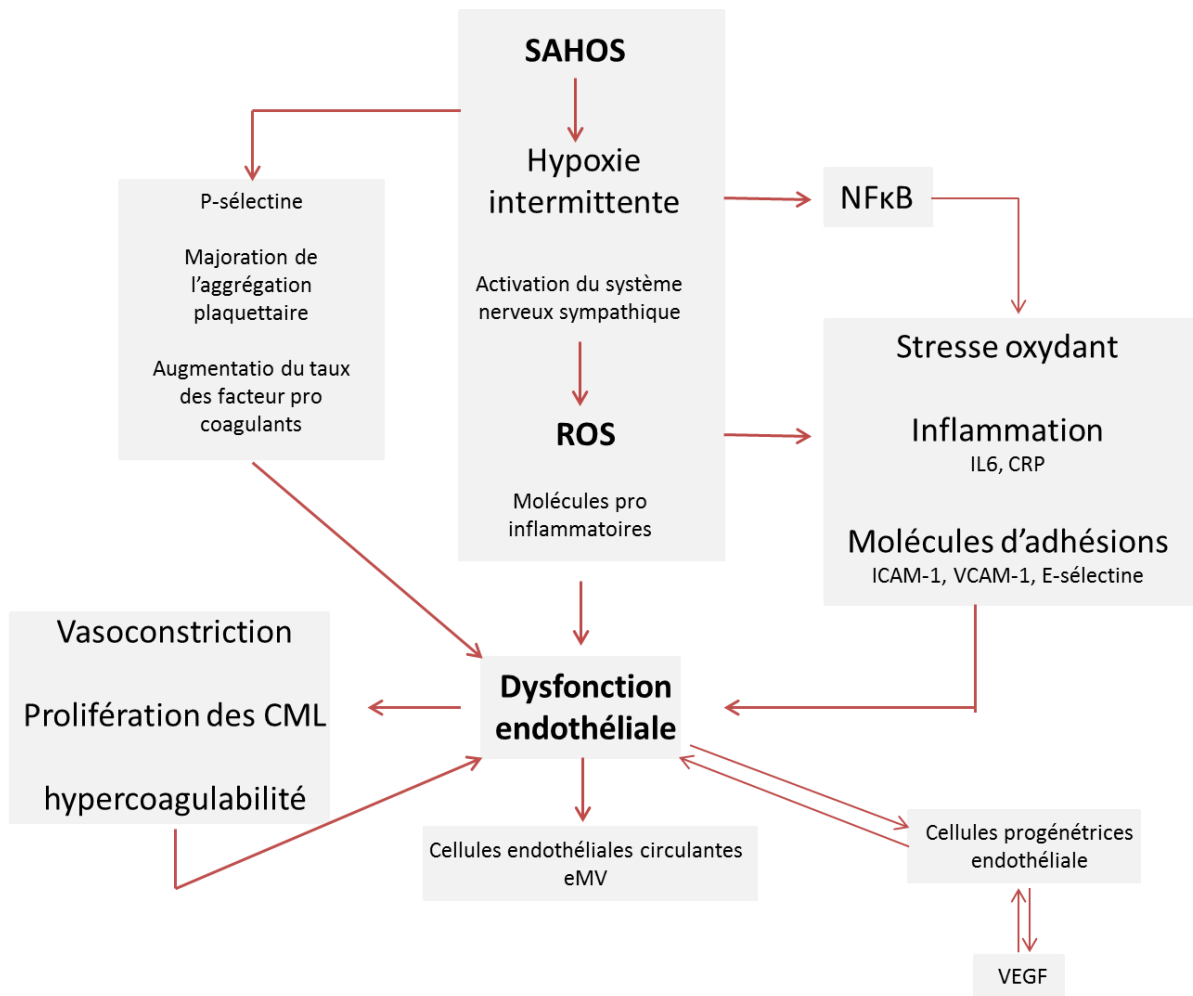


Le traitement de 1<sup>ère</sup> intention et de référence pour un SAHOS sévère est la ventilation par pression positive continue (PPC) ("Haute Autorité de Santé - Évaluation clinique et économique des dispositifs médicaux et prestations associées pour prise en charge du syndrome d'apnées hypopnées obstructives du sommeil (SAHOS)," n.d.). Ce système permet de créer une véritable attelle pneumatique des VAS pour lutter contre le collapsus. Doivent s'y associer des mesures hygiéno-diététiques avec notamment une hygiène de sommeil dont l'éviction de l'alcool et des hypnotiques. Une prise en charge diététique et nutritionnelle doit être proposée à tout patient dont l'IMC est supérieure à 25 kg/m<sup>2</sup>.

D'autres alternatives peuvent être proposées, en fonction des différentes situations : orthèse d'avancée mandibulaire (OAM) (Carberry et al., 2018), mesures positionnelles (Ravesloot et al., 2017) (dans le cas précis des SAHOS positionnels), traitement chirurgical (amygdalectomie, chirurgie d'avancée mandibulaire...), prise en charge de la musculature des VAS (stimulation du nerf hypoglosse (Schwartz et al., 2001), rééducation des VAS...)...

## **b. Complications cardiovasculaires**

Il existe, dans la population des patients apnéiques, une surmortalité, d'autant plus si le SAHOS est sévère. Or, cette surmortalité est en lien avec une pathologie CV, secondaire au SAHOS. En effet, il a été montré que le SAHOS est un facteur de risque indépendant de différentes pathologies CV telles que : l'hypertension artérielle (HTA), l'IDM, les troubles du rythme cardiaque (Linz and Arzt, 2015), les accidents vasculaires cérébraux (AVC), les pathologies thromboemboliques (figure 1).



**Figure 1.** Mécanismes des atteintes vasculaires au cours du SAHOS (d'après (Stiefel et al., 2013)  
 ROS : Reactive oxygen species, eMV : Microvésicules issues des cellules endothéliales

### ***i. Hypertension artérielle***

L'ensemble des données épidémiologiques concordent pour conclure au lien étroit qu'il existe entre SAHOS et HTA. Il a été observé une grande prévalence de SAHOS chez les patients hypertendus. Cette prévalence est d'autant plus importante (83%) qu'il s'agisse d'une HTA réfractaire (Logan et al., 2001). A l'inverse, les patients réalisant des apnées au cours du sommeil présentent un risque élevé de développer à court terme, une HTA. En effet, les patients avec un SAHOS sévère ont 3,2 fois plus de risque de développer une HTA (Peppard et al., 2000).

Du fait de la physiopathologie en cause, le SAHOS est bien un facteur de risque indépendant de l'HTA. En effet, le SAHOS active le système rénine-angiotensine-aldostérone. Mais il va également être responsable d'un stress oxydant et d'une DE causés par les apnées (Torres et al., 2015). De plus, comme cela sera décrit plus tard, la

prévalence de l'obésité est importante chez les patients apnéiques. Or, l'obésité est également un risque d'HTA.

Cependant, le rôle du SAHOS dans l'apparition et la sévérité d'une HTA semble limité dans le temps, en fonction de l'âge. Effectivement, l'implication semble nulle après 60 ans (Haas et al., 2005). Par ailleurs, il semblerait que ce lien soit plus important chez l'homme que chez la femme (Hedner et al., 2006).

## ***ii. Complication cardiaque***

### ***1) Infarctus du myocarde***

Dans le cadre d'une revue de la littérature récente portant sur 3 études, soit 5067 patients, le lien entre IDM et SAHOS a été confirmé, qu'il s'agisse d'infarctus léthal ou non (Porto et al., 2017). En effet, 12,7% de ses patients apnéiques ont présenté un évènement cardiaque qui a été fatal dans 25,6% des cas.

Selon l'équipe de Kendzerska (Kendzerska et al., 2014a), le facteur prédictif du risque d'IDM ou de toute autre atteinte cardiaque dans le cadre d'un SAHOS n'est pas uniquement la sévérité de l'IAH mais également d'autres paramètres comme l'index de désaturation, le nombre de micro éveils, la durée ainsi que la qualité du sommeil, la somnolence diurne excessive (SDE) ou encore la fréquence cardiaque.

De plus, le risque de récurrence d'un IDM dans les suites d'un épisode aiguë est d'autant plus important que le patient présente un SAHOS. La mortalité par un évènement cardiaque ischémique sera également plus important chez ces patients (Milleron et al., 2004).

### ***2) Trouble du rythme***

Certaines équipes ont mis en évidence un risque accru de trouble du rythme chez les patients apnéiques. Cependant, cette conclusion est variable selon les auteurs. Il semblerait que la prévalence de l'arythmie cardiaque par fibrillation auriculaire (ACFA) soit plus élevée lorsque le patient présente des apnées. De la même façon, le risque de récurrence d'ACFA après une cardio-version est majoré chez ces patients.

De plus, la prévalence de l'ACFA croît avec la sévérité du SAHOS. Il existe en effet une corrélation entre la prévalence de l'apparition de troubles du rythme et l'IAH (Khalyfa and Gozal, 2018).

## ***iii. Accident vasculaire cérébral (AVC)***

De nombreuses études épidémiologiques ont démontré que le SAHOS est un facteur de risque indépendant d'AVC (Redline et al., 2010). En effet, lorsque le patient présente des apnées non traitées, son risque de faire un AVC augmente d'un facteur 2. Ceci peut être en lien, notamment, à l'HI ou encore à l'activation sympathique au cours du sommeil (Javaheri et al., 2017a).

Il existe un lien entre AVC au cours du sommeil et SAHOS (Mohammad et al., 2019). Ce fait est en partie expliqué par l'absence de diminution de la tension artérielle au cours de

la nuit mais également directement par l'HI qui peut être dans certains cas profonde (Yoshida et al., 2016).

De façon générale, il semblerait que c'est le risque thromboembolique, en lien avec un trouble du rythme ou encore du fait d'une hypercoagulabilité, qui soit en grande partie responsable de ce risque accru d'AVC chez les patients apnéiques (Alexiev et al., 2018). Ceci est d'autant plus vrai que le SAHOS est fréquemment associé à d'autres facteurs de risque indépendants d'AVC tel que : l'ACFA, les maladies coronariennes, le diabète. De plus, il existe une vasoconstriction en réponse aux apnées. En effet, suite à l'apnée, il existe un micro éveil responsable d'une hyperventilation pour compenser l'hypercapnie consécutive à l'apnée. Cette hyperventilation va aboutir à une hypocapnie et elle-même à une vasoconstriction. Chez des patients qui présentent déjà une pathologie vasculaire, ces vasoconstrictions itératives peuvent favoriser les phénomènes d'ischémie (McKee and Auckley, 2019).

#### ***iv. Maladies thromboemboliques et athérosclérose***

Il est décrit dans la littérature que le SAHOS, via notamment l'athérosclérose, joue un rôle dans les maladies thromboemboliques veineuses et artérielles. L'équipe de Lin (Lin et al., 2017) a ainsi pu montrer récemment l'existence d'évènements cardiaques graves et notamment d'IDM chez les patients apnéiques. Il a également été prouvé que l'importance de la plaque d'athérome coronarienne ainsi que de la sténose coronarienne est corrélée à la sévérité du SAHOS (Umut Somuncu et al., 2019).

Concernant le risque thromboembolique, il a été montré une augmentation du risque d'embolie pulmonaire chez les patients apnéiques avec un risque accru de récurrence en cas de SAHOS (Alonso-Fernández et al., 2016; Berghaus et al., 2016). Ce risque accru d'athérosclérose en lien avec le SAHOS, et plus précisément l'HI, s'explique par l'inflammation chronique qui en résulte, associée notamment à une prolifération cellulaire du muscle lisse vasculaire. Ces deux phénomènes vont favoriser l'athérosclérose notamment via la sécrétion d'agents pro inflammatoires tels que l'interleukine 6 et HIF-1 (hypoxia-inducible factor) (Kyotani et al., 2019).

Le phénomène thromboembolique s'explique quant à lui par l'expression de protéines pro thrombotiques dans un contexte d'inflammation systémique.

#### **c. Autres comorbidités associées au SAHOS**

D'autres comorbidités sont décrites avec une prévalence augmentée lors de la présence d'apnées du sommeil. Il s'agit notamment des pathologies endocriniennes telles que l'hypothyroïdie, l'acromégalie, un retard staturopondéral chez les enfants apnéiques du fait d'une diminution de la sécrétion d'hormone de croissance. On retrouve également les complications neurologiques avec notamment les neuropathies périphériques (Lüdemann et al., 2001). Des cas de névrite optique ont également été décrits. Cependant, l'impact réel du SAHOS dans ces pathologies reste encore incertain puisque peu d'études ont montré ce lien.

Il semblerait que la prévalence des cancers ainsi que la mortalité qui en découle soit plus importante chez les patients présentant un SAHOS sévère.

De la même façon, on retrouve une prévalence augmentée des troubles métaboliques dont la dyslipidémie et le diabète de type 2 (DT2).

- **Le diabète de type 2 :**

- **Généralités**

Le DT2 est une pathologie chronique définie par une hyperglycémie à jeun supérieure à 1.26g/l à deux reprises. Elle est secondaire à un déficit en sécrétion d'insuline ou une insulino-résistance ou encore les 2 phénomènes associés. Au cours des dernières années, la prévalence n'a fait qu'augmenter pour atteindre près de 5% de patients diabétiques traités. Cette prévalence augmente avec l'âge et est plus élevée chez l'homme. La mortalité toute cause de ces patients est près de 2 fois supérieure à celle de la population générale notamment en lien avec une pathologie CV (HAS, 2015).

Les facteurs de risque sont multiples. Le principal est sans aucun doute l'obésité. Il faut savoir que 40% des hommes et 47% des femmes diabétiques de type 2 sont obèses. D'autres facteurs de risque sont décrits tels que l'âge supérieur à 45ans, la sédentarité, l'origine géographique, un antécédent familial au premier degré ou encore un antécédent de diabète gestationnel.

La prise en charge va reposer sur une éducation thérapeutique avec la mise en place de mesures hygiéno-diététiques. S'en suit la mise en place d'un traitement médicamenteux avec en première intention la metformine (biguanides). Ce traitement peut aboutir si nécessaire des injections d'insuline pluriquotidiennes.

- **Diabète de type 2 et complications cardiovasculaires**

Les complications CV au cours du DT2 sont largement décrites et sont en lien avec des altérations micro et macro angiopathiques.

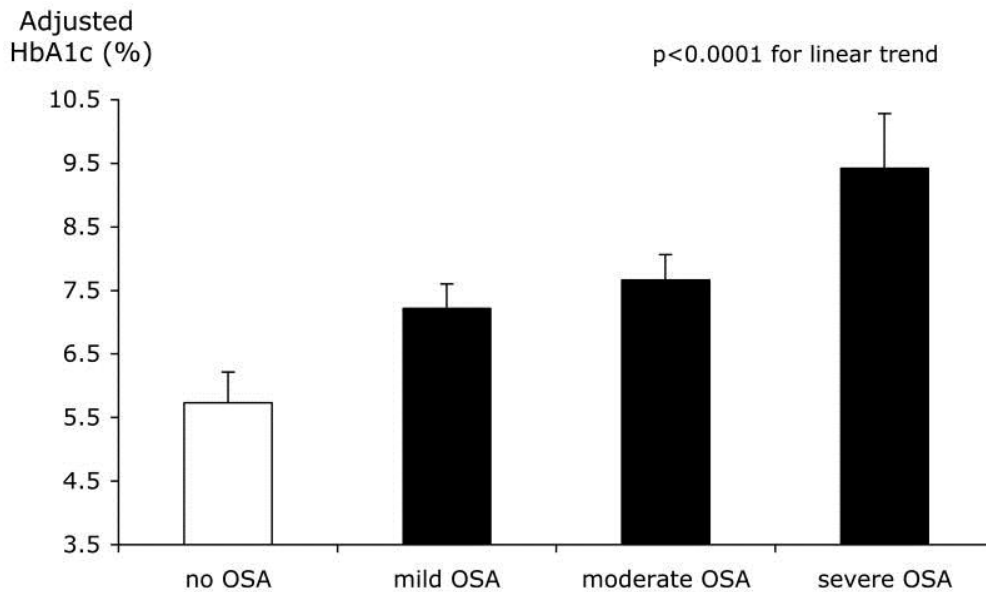
Les macro-angiopathies vont engendrer des complications CV et cérébro-vasculaires : insuffisance coronarienne, artériopathie oblitérante des membres inférieures (AOMI), AVC. Ces complications, 2 à 3 fois plus fréquentes que dans la population générale, vont être responsables de près de 50% de la mortalité des patients diabétiques.

La physiopathologie de ces complications CV repose sur une DE (Tooke and Hannemann, 2000), associée à une augmentation du stress oxydant et une diminution de la production du NO (Paneni et al., 2013).

- **Diabète de type 2 et SAHOS**

Des études ont montré qu'il existe un lien bidirectionnel entre le DT2 et le SAHOS (Aurora and Punjabi, 2013). Selon des données qui sont relativement anciennes maintenant, 15 à 30 % des patients souffrant d'un SAHOS ont également un diabète. Ces données ont été confirmées par une méta analyse récente (Anothaisintawee et al., 2016).

A contrario, 70 % des diabétiques développent un SAHOS modéré à sévère (Pamidi and Tasali, 2012). De plus, il a été décrit une corrélation positive entre la sévérité du SAHOS et les difficultés d'équilibration du diabète, évalué via l'HbA1c (Pamidi et al., 2010) (figure 2).

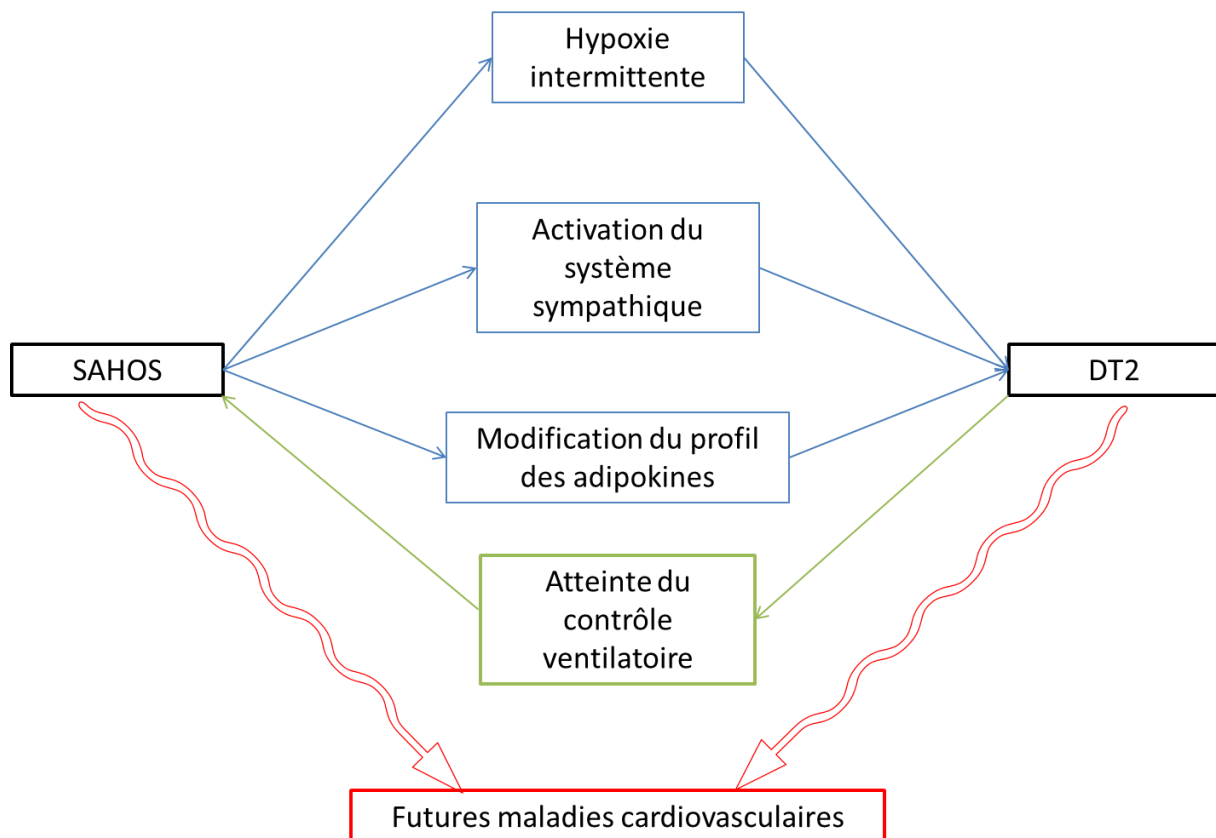


**Figure 2.** Corrélation positive entre le déséquilibre du diabète et la sévérité du SAHOS (Pamidi et Aronsohn, 2010).

Ces 2 pathologies ont un facteur de risque commun important qui est l'obésité. Cependant, chaque pathologie elle-même, du fait de ses complications, peut favoriser l'apparition de l'autre. En effet, le DT2, du fait de ses complications neurologiques, peut favoriser l'apparition d'un SAHOS. A l'inverse, le SAHOS peut entraîner le développement d'un diabète par le biais de l'insulino-résistance. Plusieurs hypothèses sont avancées pour expliquer ce lien bidirectionnel.

Tout d'abord, le DT2 va pouvoir entraîner une neuropathie périphérique qui peut atteindre les muscles des VAS. Cela peut entraîner une hypotonie des VAS et ainsi favoriser l'apparition d'apnées. Par ailleurs, le DT2 peut altérer la commande respiratoire et favoriser une instabilité respiratoire qui est décrite comme pouvant être impliquée dans le développement d'un SAHOS.

A l'inverse, le SAHOS va entraîner, notamment via l'HI, une inflammation systémique et chronique. Il va également activer le système sympathique ou encore modifier la sécrétion d'adipokines. Tous ces phénomènes vont aboutir à une insulino-résistance puis à un DT2 (figure 3).



**Figure 3.** Relations physiopathologiques entre le SAHOS et le DT2. Modifié d'après Muraki et al., 2018.

## 2. Fonction endothéliale

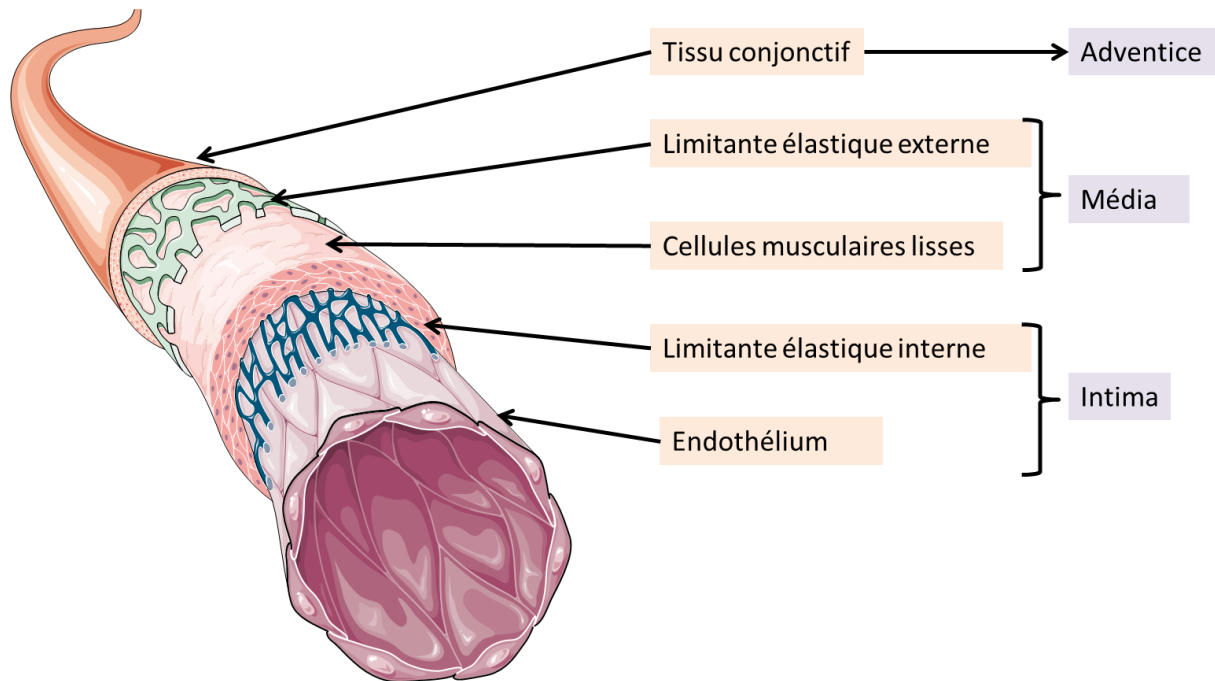
### a. Physiologie de la fonction endothéliale

L'endothélium a une place centrale dans l'homéostasie vasculaire. C'est un organe à part entière dont les rôles sont multiples dans la physiologie et physiopathologie vasculaire. Comme décrit initialement, l'endothélium a un rôle de barrière, mais il rentre également en jeu dans la régulation de la vasomotricité, l'angiogenèse ou encore la réponse inflammatoire.

L'endothélium est constitué d'une monocouche de cellules endothéliales (CE), directement en contact avec la lumière des artères. C'est grâce à cette position stratégique que l'endothélium a un rôle de barrière. Etant au contact direct du sang circulant, il régule le passage de nombreuses molécules et notamment de l'immunité ou encore inflammatoire, en modifiant la perméabilité endothéliale.

Cette monocouche de CE associée à la limitante élastique interne forment l'intima qui va être en contact avec la média, elle-même composée des cellules musculaires lisses (CML)

et de la limitante élastique externe. L'épaisseur des CML va directement dépendre du calibre de l'artère. C'est la contraction et relaxation de ces cellules qui va permettre la vasoconstriction ou dilatation des vaisseaux. Enfin, la couche externe de l'artère ou adventice est composée de tissu conjonctif (figure 4).



**Figure 4.** Composition de la paroi artérielle.

Les CE sont capables de moduler leur structure et leurs fonctions suite à un stimulus physique ou chimique.

Outre son rôle dans l'hémostase primaire et la régulation de la coagulation, l'endothélium participe à la régulation du tonus vasomoteur. En effet, les CE sécrètent des substances vasodilatatrices comme le monoxyde d'azote (NO), la prostacycline, et aussi des substances vasoconstrictives comme l'endothéline et le « platelet activating factor » (PAF).

#### **Le monoxyde d'azote**

Le NO est une molécule très importante dans la vasodilatation. Il est produit à partir de la L-arginine par les synthases de NO (NOS) : la NOS endothéliale (eNOS), la NOS neuronale (nNOS) et la NOS inductible (iNOS). Cette dernière va intervenir au cours des réponses inflammatoires.

La eNOS peut être stimulée par différents mécanismes physiques (flux sanguin, force pulsatile...) ou chimiques (ADP, substance P...). Elle possède un site d'activation de l'eNOS au niveau de la sérine 1177, ainsi qu'un site d'inhibition au niveau de la thréonine 495. En fonction de leur phosphorylation en lien avec les différents mécanismes cités



précédemment, on observe une modulation de l'activité de la eNOS et donc de la libération de NO.

Le NO va diffuser et agir sur les CML. En effet, le NO active la guanylate cyclase de ces cellules aboutissant à la formation de GMP cyclique. On observe alors une déphosphorylation de la myosine et donc une inhibition de la contraction musculaire.

Le NO a ainsi un rôle majeur dans la réactivité vasculaire mais il a également des propriétés anti agrégantes, anti apoptotiques, ou encore anti inflammatoires.

### **La prostacycline**

La prostacycline est un dérivé de l'acide arachidonique. Elle peut être produite par différentes cellules vasculaires mais elle est essentiellement synthétisée par les CE suite à un stimulus physique (augmentation du flux sanguin) ou chimique (cytokine, médiateurs inflammatoires...).

Trois voies permettent de prendre en charge l'acide arachidonique : la voie des cyclo-oxygénases (COX), la voie des lipoxygénases (LOX) et la voie du cytochrome P450. Seule la voie des COX permet la libération de prostacycline. Elle va ensuite se fixer sur son récepteur situé sur les CML. Via une protéine G, l'AMPc est synthétisée, ce qui va entraîner une diminution du calcium intracellulaire et donc une vasodilatation.

Parallèlement à son rôle dans la réactivité vasculaire, la prostacycline intervient dans l'inhibition de l'apoptose et l'agrégation plaquettaire.

### **L'endothéline**

L'endothéline (ET) est une molécule importante dans le phénomène de vasoconstriction. Elle est synthétisée par les CE. Elle sera produite uniquement en réponse à un stimulus qui peut-être en outre l'hypoxie. Il existe 3 formes principales qui sont : ET-1, ET-2 et ET-3. L'ET-1 est la forme la plus connue et la mieux décrite. Il existe 2 récepteurs à l'ET-1 situés sur les CML : ETA et ETB. L'activation de ces récepteurs va aboutir à une augmentation du calcium intracellulaire dans les CML et ainsi induire leur contraction.

### **Le « platelet activating factor »**

Le PAF est un phospholipide qui provient, tout comme la prostacycline, du métabolisme de l'acide arachidonique. De la même façon que l'ET, il va permettre la vasoconstriction. Parallèlement, il stimule l'adhésion des leucocytes à l'endothélium et joue donc un rôle dans l'inflammation et la formation de plaque d'athérome.

## **b. Physiopathologie de la dysfonction endothéliale**

La DE est caractérisée par une anomalie de la relaxation endothélium dépendante. Elle est observée dans différentes pathologies vasculaires telles que l'HTA, le diabète, la dyslipidémie. Elle est décrite à une phase débutante de l'histoire vasculaire et pourrait donc jouer un rôle très important dans l'initiation et l'installation des pathologies CV.

Elle est liée à une atteinte de la production de différents messagers ce qui entraîne une situation pro inflammatoire, pro athérosclérotique, et vasoconstrictive. Bien qu'il s'agisse d'un mécanisme multi factoriel, elle est caractérisée par une diminution de la biodisponibilité du NO dont résulte une atteinte de la vasodilatation aux stimuli endothéliaux. Cette diminution du NO est liée à une diminution de la production (par phosphorylation du site inhibiteur de la eNOS ou au contraire absence de phosphorylation de la forme active) ou à une diminution de son biodisponibilité suite à la réaction entre le NO et l'anion superoxyde. De nombreuses situations peuvent engendrer une augmentation des radicaux libres et donc être responsables d'un déséquilibre dans la

balance du NO favorisant la DE. On retrouve par exemple le tabac, l'obésité, une exposition à certains polluants, l'hyperglycémie...(Steven et al., 2015).

Différents éléments peuvent induire l'apparition d'une DE (Daiber et al., 2017a) : des facteurs environnementaux (la pollution, le bruit, le stress), l'inflammation chronique (pathologies auto immunes...), la vieillesse, certaines thérapeutiques (radio ou chimiothérapie) (Wethal et al., 2014) ou certaines pathologies telles que le diabète, l'hypercholestérolémie, etc.

## **Pathologies en lien avec la dysfonction endothéliale**

L'ensemble des maladies CV est lié à une DE que ce soit les atteintes périphériques dont l'HTA qui résulte notamment d'un trouble de la réactivité vasculaire ou les maladies thromboemboliques telles que l'IDM ou l'AVC. En effet, l'ensemble des phénomènes nécessaires à la formation de l'athérome sont liés à la DE puisque nous retrouvons l'inflammation, la vasoconstriction, la sécrétion de molécules d'adhésion ou encore une atteinte de la perméabilité de la barrière endothéliale.

### **c. Evaluation de la fonction endothéliale in vivo**

Du fait de son rôle lors de l'initiation et la progression de toutes les pathologies CV, l'évaluation de la DE en milieu clinique suscite un grand intérêt bien que sa mesure ne puisse être réalisée en pratique clinique quotidienne mais reste réservée à l'heure actuelle, à la recherche clinique. Nous pouvons classer les différentes techniques en 2 groupes : les méthodes biologiques, non spécifiques (dosage du NO, et de ses métabolites, de la protéine C réactive, des interleukines...) et les méthodes physico-chimiques ("La fonction endothéliale : rôle, méthodes d'évaluation et limites - EM|consulte," n.d.).

#### ***i. Réponse à l'hyperhémie***

##### **1) Pléthysmographie**

La pléthysmographie permet d'évaluer la fonction endothéliale via une mesure de volume. Sur un même bras seront positionnés 2 brassards : l'un au niveau du poignet bloquant la circulation veineuse et artérielle à destination de la main, et l'autre au niveau du bras qui sera alternativement gonflé et dégonflé pour évaluer les changements de volume (figure 5). Ces changements corréleront avec la vasodilatation. Cette méthode non invasive peut le devenir si elle est couplée à l'injection de molécules vasoactives comme notamment l'acétylcholine (Ach) (Joannides et al., 2006). Elle ne permet pas de prime abord de différencier la vasodilatation dépendante de l'endothélium de celle indépendante de l'endothélium. C'est pourquoi, des molécules qui ne mettent pas en jeu l'implication de l'endothélium sont utilisées.

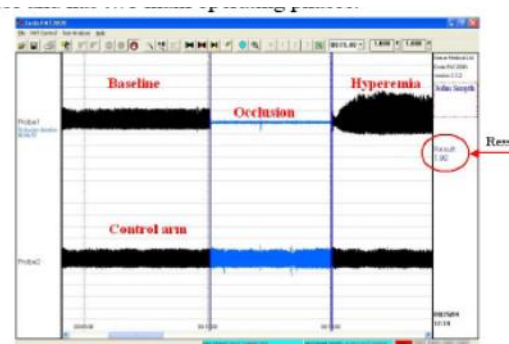
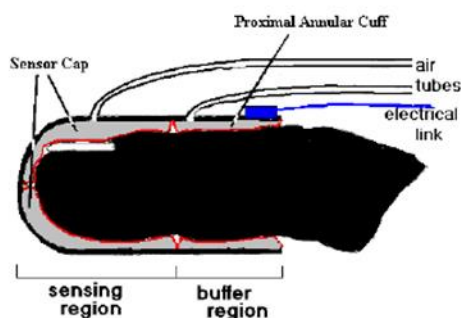


**Figure 5.** Technique de pléthysmographie.

## 2) Pléthysmographie digitale ou RH-PAT

Cette technique permet de quantifier la réponse périphérique vasodilatatrice en réponse à l'hyperhémie. Le RH-PAT est modulé en partie par le NO.

Deux doigtiers électroniques appelés Endopath (Itamar medical Ltd, Caesarea, Israel) vont être positionnés à chaque index. Ils vont ainsi mesurer la tonométrie ou tension artérielle périphérique (figure 6). Cette technique non invasive évalue les vaisseaux de résistance. Le 1<sup>er</sup> bras nous permettra d'avoir un tracé de référence. Au niveau du second bras, nous créons un arrêt du flux grâce à un brassard positionné au niveau de l'artère brachiale et gonflé 50mmHg au-dessus de la pression artérielle systolique. Après ces 5min, nous levons la compression. On enregistre alors l'amplitude de l'enregistrement correspondant à la vasodilatation réflexe. Il est alors aisé de calculé l'Endoscore ou l'index de réactivité hyperhémique (RHI) qui est calculé automatiquement par le logiciel avec une norme fournie par le fournisseur > 1.68. Ce score va être diminué chez les patients présentant une DE (Celermajer, 2008).

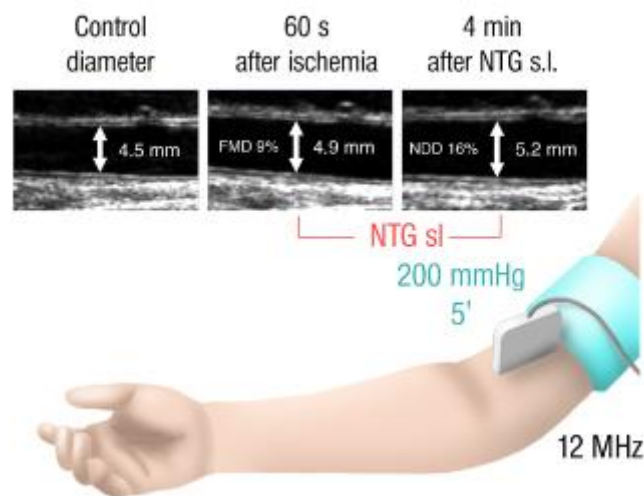


**Figure 6.** RH-PAT : sonde de pléthysmographie (à gauche), tracé et calcul de l'index RH-PAT (à droite).

### 3) Dilatation liée au flux (FMD)

Cette technique est tout comme la précédente une technique non invasive qui permet d'évaluer les capacités vasomotrices en réponse à l'hyperhémie et donc via la production de NO (Joannides et al., 1995). Elle évalue les vaisseaux de conductance.

Pour cela, une occlusion de l'artère brachiale est réalisée, pendant généralement 5min, grâce à un brassard gonflé. L'image de la vasodilatation qui en résulte lors de la levée de l'obstacle, va être observée grâce à une échographie de haute résolution (figure 7). La FMD sera alors exprimée en pourcentage de changement de diamètre. L'injection intravasculaire de molécules vasoactives peut être couplée à cette technique.

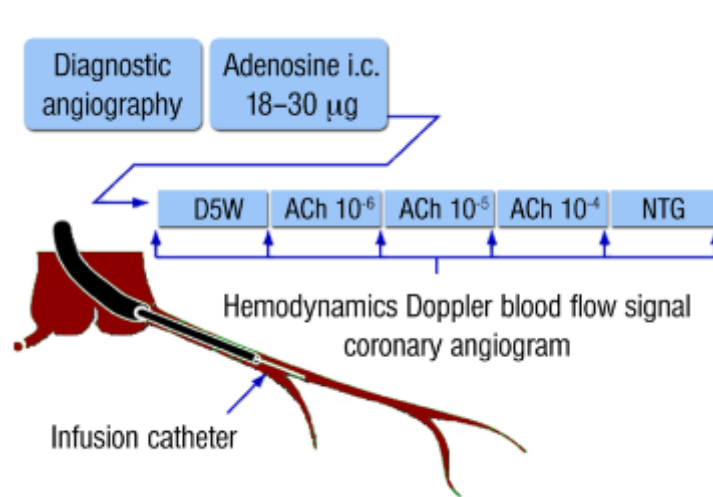


**Figure 7.** Technique de FMD (Daiber et al., 2019).

## ii. Réponse aux molécules vasodilatatrices

### 1) Injections intra coronaires

Il s'agit de la technique la plus anciennement décrite ainsi que de la technique de référence. Au cours de la coronarographie, technique fréquemment utilisée dans la pratique clinique à but diagnostique et thérapeutique lors d'un IDM par exemple, il est possible d'introduire des drogues vasoactives et ainsi évaluer la fonction endothéliale (Zeiber et al., 1991) (figure 8). C'est ainsi que l'injection d'Ach va entraîner une vasodilatation en présence d'un endothélium intègre. En cas d'altération de ce dernier, nous observerons au contraire une vasoconstriction par stimulation directe des CML (Flammer et al., 2012a).



**Figure 8.** Vasoréactivité dépendante de l'ACh lors d'une coronarographie (Daiber et al., 2017b).

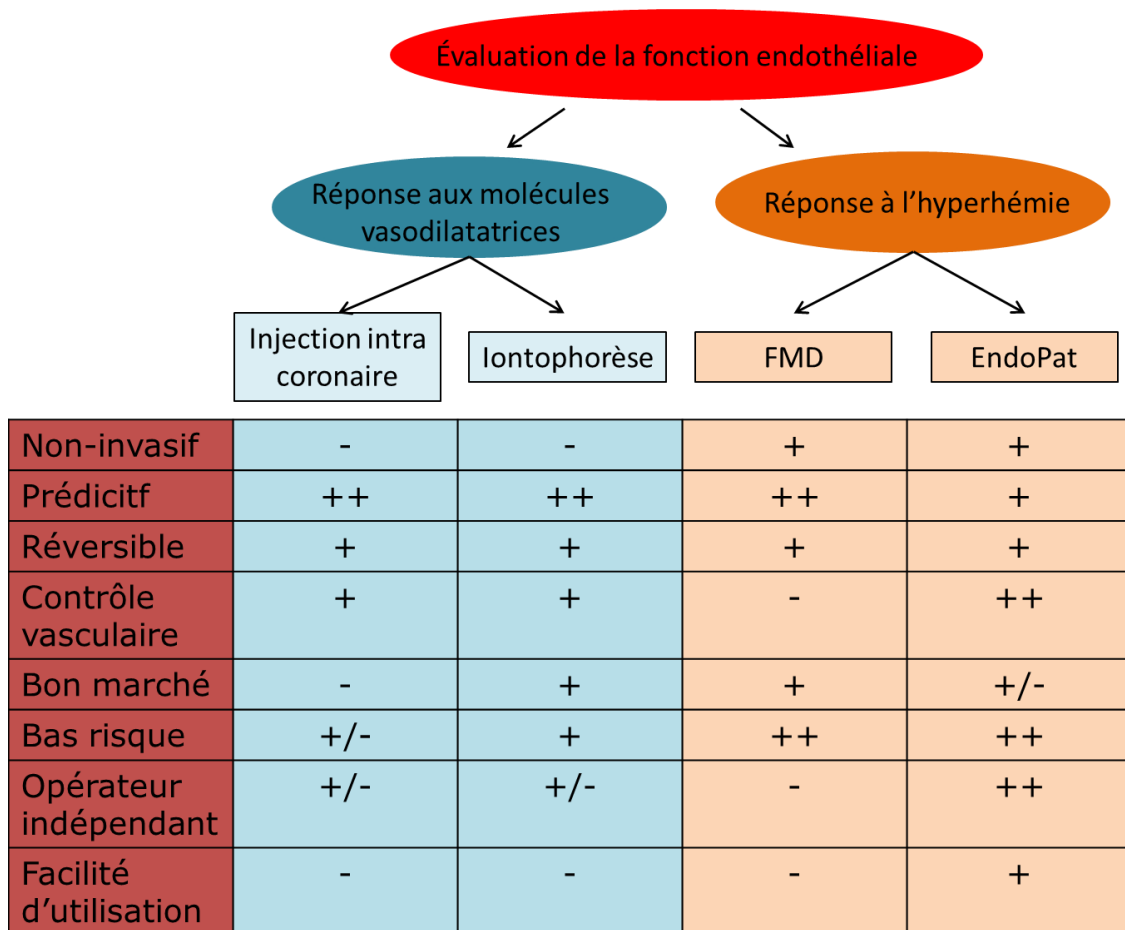
## 2) Iontophorèse

La iontophorèse est un des tests de provocation utilisé avec les lasers pour l'évaluation de la fonction endothéliale. Il s'agit d'une méthode non invasive et indolore puisque les molécules vasoactives ne sont pas injectées en intravasculaires, mais vont migrer au niveau de la microcirculation cutanée grâce à un courant électrique de faible intensité.

Le principal biais de cette technique est que la réponse de la microcirculation peut être en lien avec la molécule testée mais également uniquement du fait du passage du courant (Durand et al., 2002). Différentes molécules peuvent être utilisées pour tester l'endothélium (l'ACh, la métacholine) mais également les CML (le nitroprussiate de sodium) (Mahé et al., 2012).

D'autres tests de provocation peuvent être utilisés avec la méthode des lasers : la microdialyse, l'hyperhémie post ischémique.

Pour conclure sur les méthodes d'évaluation de la fonction endothéliale, les méthodes évaluant la réponse à l'hyperhémie sont non invasives contrairement aux autres. La FMD et l'Endopath sont donc les 2 techniques à privilégier. Cependant, 2 éléments différencient ces 2 façons de faire. L'endopath est facile d'utilisation contrairement à la FMD qui peut être fastidieuse. De plus, l'Endopath est non opérateur dépendant puisque le logiciel détermine seul, automatiquement le RHI (tableau 1).



**Tableau 1.** Les principales techniques utilisées pour l'évaluation de la fonction endothéliale *in vivo* ( d'après (Flammer et al., 2012a).

#### **d. Dysfonction endothéliale : facteur prédictif de maladies cardiovasculaires**

La DE est aujourd'hui un facteur prédictif reconnu de maladies CV. Ce phénomène est retrouvé dans le cadre de l'ensemble des facteurs de risque CV : l'HTA, le DT2, l'hypercholestérolémie, l'obésité ou encore le tabagisme (Daiber et al., 2019). Il existe par ailleurs une corrélation entre la sévérité de la DE et certains marqueurs comme la protéine C réactive, les BNP (Brain natriurétique peptide).

Différentes études ont montré l'intérêt et la place de l'évaluation de la DE. Ainsi, il existe une corrélation entre le pro atrial natriurétique peptide (ANP) ainsi qu'avec le diagnostic d'athérosclérose et l'évaluation non invasive de la vasoréactivité (Garcia et al., 2012; Schnabel et al., 2012). Cependant, il semblerait que ces techniques ne soient pas un facteur prédictif d'évènements CV de qualité chez les sujets sains et à faible risque CV (Roos and Kaina, 2013; Suessenbacher et al., 2013).

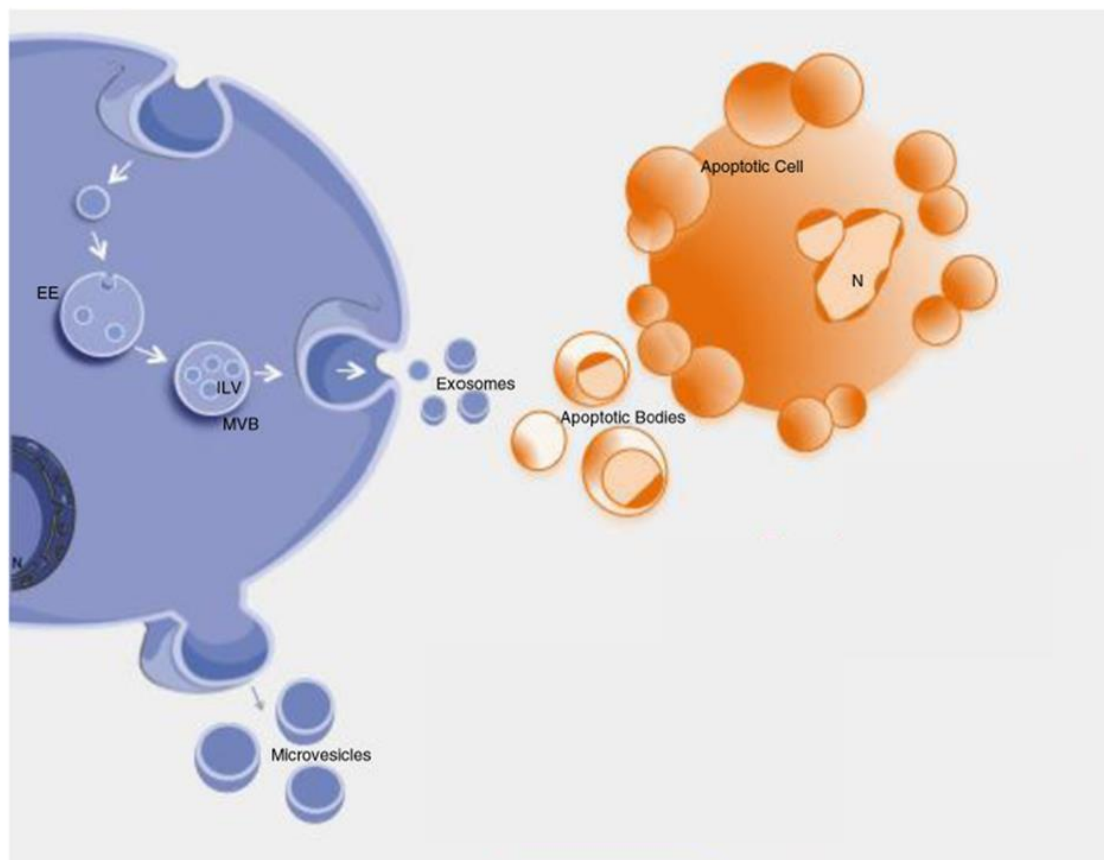
Une autre étude a révélé que l'évaluation non invasive de la fonction vasculaire ne permet pas de déterminer une valeur pronostic.

### 3. Vésicules extracellulaires

#### a. Généralités

Les vésicules extracellulaires (VE) sont de petites vésicules, nanométriques, libérées par différentes cellules. Elles sont libérées dans les fluides biologiques (plasma, urines...) dans des situations pathologiques mais également physiologiques. Nous retrouvons 3 types de VE (figure 9): les exosomes ou « small VE », les microvésicules (MV) ou « large VE » et les corps apoptotiques. Ils se différencient notamment par leur taille et leur biogenèse (Zaborowski et al., 2015). Ces VE transportent différents éléments (protéines, ADN, miRNA....) et vont ainsi jouer un rôle dans la communication intercellulaire. En effet, les VE transfèrent des informations biologiques via des protéines, enzymes, lipides... jusqu'à la cellule cible (Doyle and Wang, 2019; Yáñez-Mó et al., 2015).

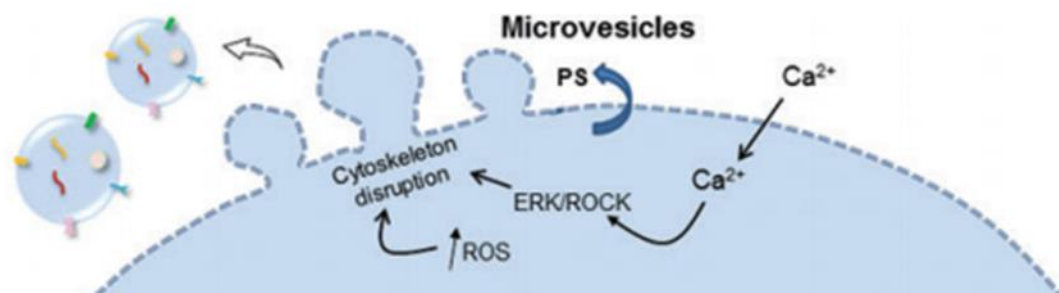
Le taux de VE ainsi que leur phénotype vont être modifiés dans certaines situations et notamment au cours des pathologies CV. C'est pour cela qu'elles pourraient servir de marqueurs diagnostiques et pronostiques d'un certains nombres de pathologies. Elles pourraient également, du fait de leur rôle de transporteur, avoir intérêt majeur dans la thérapeutique (Raposo and Stoorvogel, 2013).



**Figure 9.** Biogenèse et libération des différentes vésicules extra cellulaires (d'après Yáñez-Mó et al., 2015).

## Les microvésicules

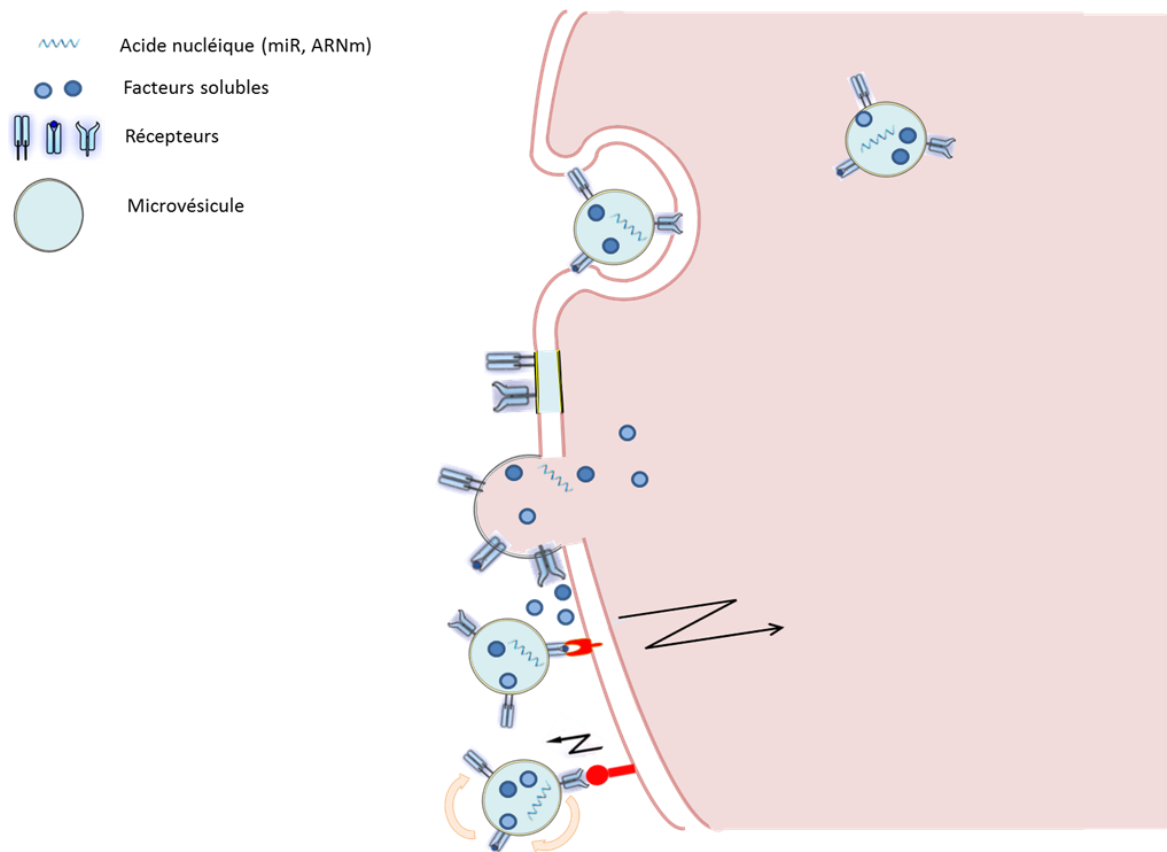
Les MV sont des VE qui sont issues directement de la membrane plasmique de cellules par un phénomène de bourgeonnement. Leur taille varie de 0.1 à 1  $\mu\text{m}$  de diamètre. La quantité de MV libérées par une cellule va dépendre de différents éléments tels que le type cellulaire, l'environnement, l'état physiologique ou physiopathologique... Les mécanismes impliqués dans la formation d'une MV ne sont pas complètement élucidés. Une atteinte du cytosquelette de la cellule mère semble être nécessaire. Une des explications est que suite à un signal apoptotique ou un stimulus physique ou chimique, on observe une augmentation du calcium intracellulaire. Ceci va entraîner, via différentes voies de signalisations, une fragilisation de la membrane cellulaire par la déstabilisation du cytosquelette. Cette fragilisation sera renforcée par l'externalisation de la phosphatidylsérine qui est chargée négativement (Andriantsitohaina et al., 2012) (figure 10).



**Figure 10.** Mécanismes aboutissant à la formation d'une MV ( d'après Mallocci et al., 2019).

Leur composition va dépendre de la cellule d'origine et de leur biogenèse (Doyle and Wang, 2019). Etant secondaire à un bourgeonnement externe de la membrane plasmique de la cellule mère, les MV peuvent contenir les éléments de cette membrane, les protéines (protéines du cytosquelette, intégrine, protéines impliquées dans la phosphorylation...). Elles peuvent également contenir des micro organelles de la cellule : mitochondrie, corps de Golgi, réticulum endoplasmique... La communication inter cellulaire est possible grâce via plusieurs mécanismes : internalisation de la MV, fusion membranaire, interaction direct ligand / récepteur, transfert de molécule sans besoin de fusion de la membrane (Mause and Weber, 2010) (figure 11).





**Figure 11.** Mécanismes d'interaction lors de la communication inter cellulaire entre la MV et la cellule cible (d'après (Mause and Weber, 2010).

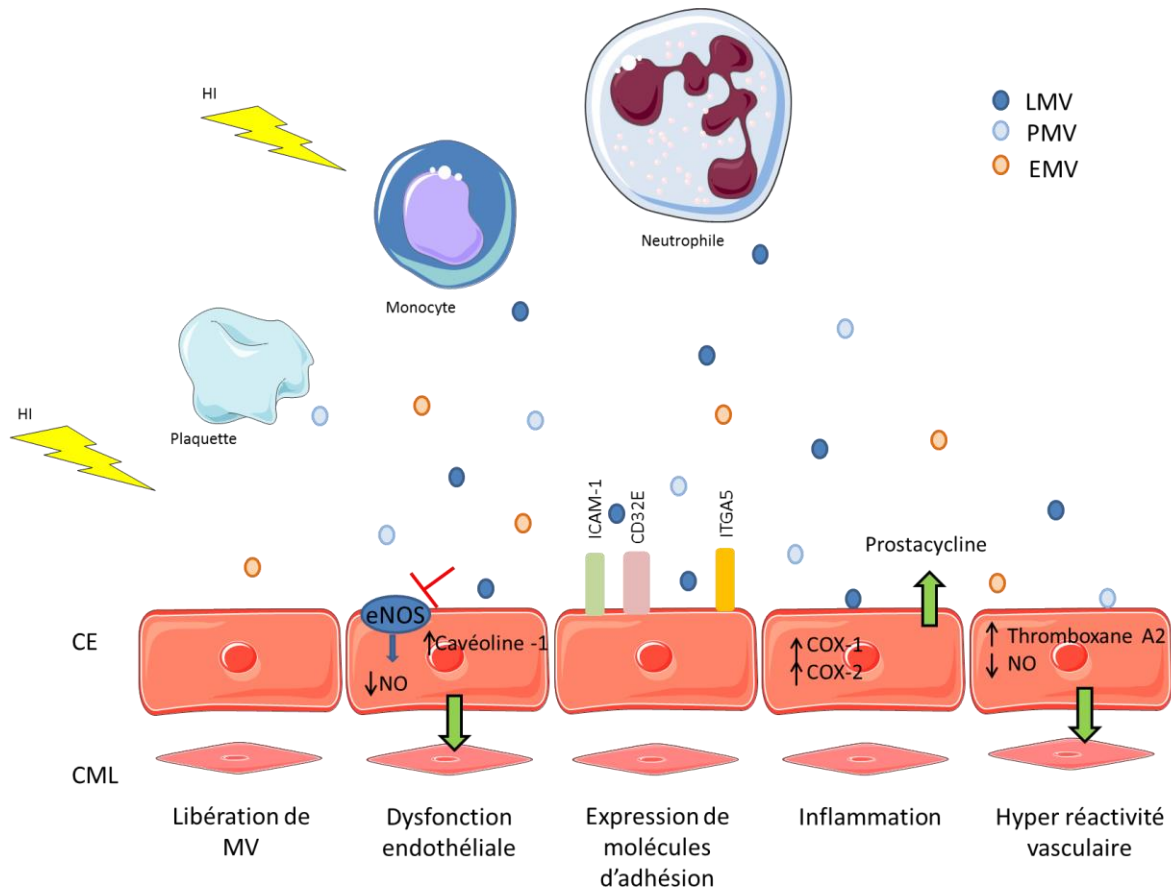
## b. Microvésicules et SAHOS

Au cours du SAHOS, le taux global de MV est similaire à celui des sujets sains. Cependant, il existe une augmentation des MV issues des leucocytes activées (MV CD62L), exprimant la L-sélectine, ainsi que des MV issues des granulocytes exprimant CD66b (Priou et al., 2010). Cette augmentation est corrélée à la sévérité des désaturations nocturnes. De plus, il a été rapporté une augmentation anormale des MV le matin au réveil, augmentation qui se normalise au cours de la journée pour atteindre le soir un taux similaire aux sujets sains. Chez ces derniers, les MV augmentent du matin au soir avec un taux minimal au réveil (Trzepizur et al., 2011).

Une variation du taux de MV a été observée et notamment de celles issues des plaquettes exprimant CD41 et de celles externalisant la phosphatidylsérine au cours de la journée. Cette variation corrèle avec la sévérité du SAHOS et disparaît sous traitement par PPC (Bikov et al., 2017).

Après traitement par PPC, il a également été montré que la quantité totale de MV diminue. Ceci est d'autant plus vrai que le SAHOS est sévère. Parallèlement à cette baisse du taux de MV, s'y associe une amélioration de la fonction endothéliale in vivo, évaluée par FMD (Muñoz-Hernandez et al., 2015).

Les MV vont avoir différentes actions sur les CE, notamment dans le cadre du SAHOS. Elles vont pouvoir engendrer une DE. Elles vont également modifier et augmenter l'expression de molécules d'adhésion, favoriser l'inflammation et entraîner une hyperréactivité vasculaire (Trzepizur et al., 2014) (figure 12).



**Figure 12.** Principales voies impliquant les MV dans la dysfonction endothéliale au cours du SAHOS (d'après (Trzepizur et al., 2014).

LMV : MV issues des leucocytes, PMV : MV issues des plaquettes, EMV : MV issues des CE, HI : hypoxie intermittente

Les MV au cours de cette pathologie sont responsables d'une diminution de la biodisponibilité du NO. La diminution du NO est liée à une régulation négative de l'activité de la eNOS par les MV par phosphorylation du site inhibiteur (Priou et al., 2010). Les MV vont également entraîner une augmentation de l'expression des molécules d'adhésion dans les CE telles que l'E-sélectine, ICAM et intégrine  $\alpha 5$ .

Dans le cadre du SAHOS, les MV sont responsables d'une hyper réactivité vasculaire avec un rôle central et obligatoire de l'endothélium. Cette hyper réactivité peut être due à une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (Tual-Chalot et al., 2012). Or, l'augmentation du stress oxydatif contribue à la DE. Cet effet délétère de

l'hypoxie est potentialisé par la fragmentation du sommeil et la privation de sommeil en augmentant l'inflammation vasculaire et la pro-coagulabilité (Atkeson and Jelic, 2008). Les MV de patients apnéiques favorisent le processus d'angiogenèse secondaire à la libération d'ET en stimulant le récepteur ETB. Les MV peuvent donc être impliquées dans le processus de formation de nouveaux capillaires dans le cadre du SAHOS (Tual-Chalot et al., 2014).

### **c. Microvésicules et pathologies cardiovasculaires**

Différentes équipes se sont intéressées au rôle des MV dans l'apparition de maladies CV notamment via la DE qui favorise notamment l'athérosclérose.

Parallèlement, les MV peuvent être un facteur pro coagulant notamment du fait de la phosphatidylsérine chargée négativement présente sur leur membrane externe (Sinauridze et al., 2007). La présence d'autres molécules (PSGL-1, facteur VIII et Va...) favorise ce caractère procoagulant.

Les MV ont également été décrites comme ayant un rôle dans la régulation du stress oxydant et du remodelage vasculaire (Badimon et al., 2017).

Des études récentes suggèrent que la régulation de l'expression des protéines dont les protéines pro inflammatoires dépend du contenu en miRNA des MV. Par exemple, miR222 est décrit comme régulant l'expression de ICAM-1 (Jansen et al., 2015). De plus, miRNA10 présent dans les MV d'origine endothéliale régule l'activation et l'adhésion des monocytes et leucocytes dans le processus d'athérome (Njock et al., 2015).

Les MV peuvent être des marqueurs biologiques très intéressants de la dysfonction vasculaire notamment dans le cadre de troubles métaboliques (Agouni et al., 2014), lipidiques, du « shear stress », d'un IDM. Il a même été démontré une corrélation entre le taux de MV et l'importance de la DE au cours de différentes pathologies : insuffisance rénale chronique, IDM, DT2, HTA...(Badimon et al., 2017).

En effet, il a été démontré que les MV sont de véritables régulateurs des mécanismes impliqués dans la DE, l'inflammation de la paroi vasculaire, le stress oxydant et l'apoptose et ainsi contribuent activement à la progression athéromateuse et à leur complications. Les MV issues des CE altèrent la fonction endothéliale en réponse à l'Ach. Différentes études ont également montré que les MV peuvent diminuer la production du NO et ainsi avoir un rôle dans le contrôle de l'homéostasie vasculaire.

Parallèlement, les MV notamment celles issues des plaquettes facilitent l'adhérence cellulaire à la paroi vasculaire. En effet, elles jouent un rôle dans l'expression de molécules d'adhésion telle que ICAM-1. De plus, elles peuvent être impliquées dans des cascades pro-inflammatoires et ainsi favoriser la formation de la plaque d'athérome.

Les MV ont également une capacité procoagulante du fait notamment de leur membrane chargée négativement entre autres du fait de l'externalisation de la phosphatidylsérine. De plus, les MV circulantes exercent un effet sur les phénomènes d'athéromatose en favorisant le dépôt de plaquettes et de fibrine sur la paroi des artères athérosclérotiques.

## **4. miRNA**

### **a. Généralités**

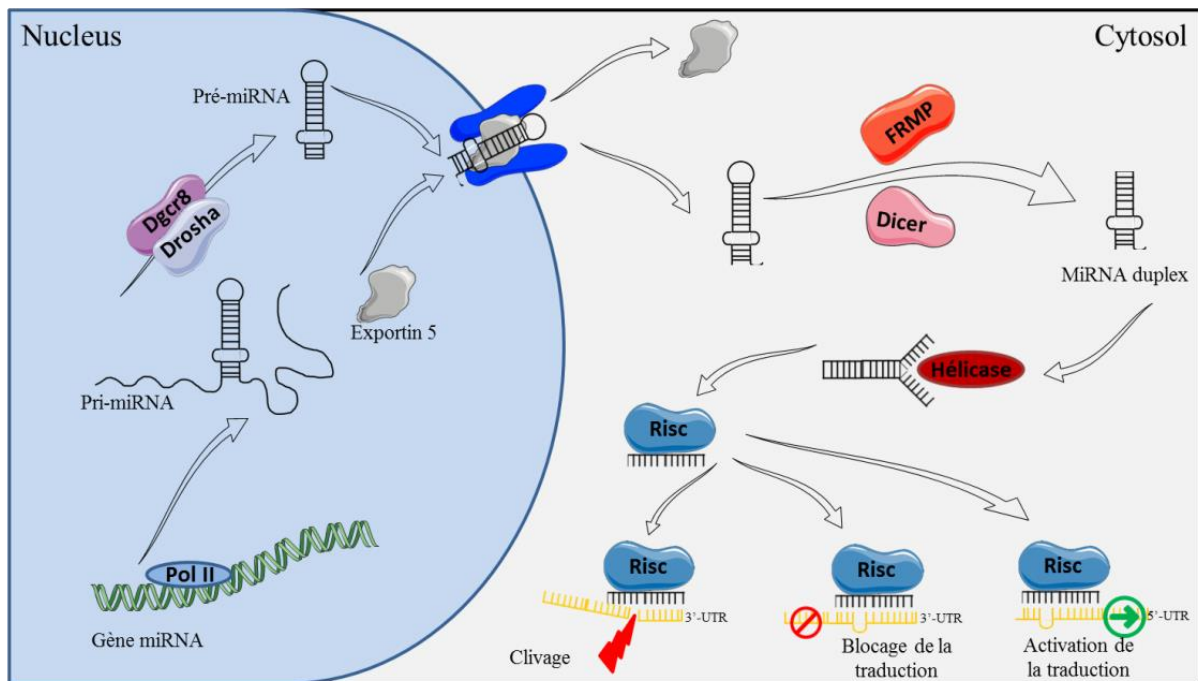
Les miRNA sont de petites séquences d'ARN simple brin, non codant, d'environ 22 nucléotides. Ils ont un rôle de régulation de l'expression des gènes dans de nombreux processus physiologiques ou pathologiques. Un miRNA va pouvoir réguler en moyenne une centaine d'ARNm cibles et un ARNm cible peut être régulé par de multiples miRNA.

Dans le nucléole, le complexe RNA et polymérase II permet la formation d'un pri-miR qui sera clivé grâce à Drosha qui est une RNase III et son co-facteur DGCR8 en un précurseur : le pré-miR. Ce pré-miR est transplanté dans le cytoplasme grâce à l'exportin-5. Une autre enzyme va alors rentrer en action : Dicer. Elle clive la boucle terminale pour former un hétéroduplex de 22 nucléotides qui sera clivé à son tour par l'hélicase en 2 bras. Un de ces bras sera dégradé. L'autre formera un complexe avec RISC (RNA induced silencing complex), permettant au miR de se fixer à l'ARNm cible (Li and Yang, 2013). Le miR a alors avoir 3 actions possibles : cliver l'ARNm, réprimer ou activer la traduction (figure 13) (Rooij and Olson, 2007).

Les miRNA peuvent être retrouvés à l'intérieur de cellules, ou bien au niveau extracellulaire comme dans le plasma, on parle alors de miRNA circulant, ou dans des « transporteurs » telles que les VE, aussi bien les MV que les exosomes. Contrairement aux miRNA plasmatiques qui sont rapidement dégradés, les miRNA situés dans les MV bénéficient d'une protection grâce à la double membrane des MV. Ceci va empêcher leur dégradation et donc favoriser leur action auprès des ARNm cibles.

Les miRNA sont impliqués dans la physiopathologie de très nombreuses maladies et notamment les maladies cancéreuses ou athéromateuses.

Ils peuvent servir de biomarqueurs de différentes pathologies et notamment en oncologie (Kosaka et al., 2010). Ils pourraient également être la cible de nouvelles thérapeutiques dans le futur (Schwarzenbach et al., 2015).



**Figure 13.** Mécanismes de biogenèse des miRNA. Modifié d'après Li and Yang, 2013.

## b. miRNA et SAHOS

Depuis quelques années, différentes équipes se sont intéressées à l'étude et la caractérisation de miRNA chez les patients apnéiques et notamment pour expliquer la physiopathologie des complications CV ou encore néoplasiques de cette maladie.

Il semblerait que le facteur induisant une modification du phénotype des miRNA au cours du SAHOS soit l'HI. En effet, l'équipe de Lacedonia a pu mettre en évidence que certains miRNA (miR21, miR23b, miR145 and miR210) ont un taux plus élevé chez une population présentant une HI (Lacedonia et al., 2018). HIF-1 est un facteur qui est largement impliqué dans l'adaptation cellulaire à l'HI. Or, des chercheurs ont montré que HIF-1 est régulé par de nombreux miRNA (figure 14) (Loscalzo, 2010; Meng et al., 2012; Rane et al., 2009; Yamakuchi et al., 2010).

Certains de ces miRNA sont impliqués dans la survenue de pathologies CV. Il a été démontré que la quantité de ces miRNA est modifiée chez les patients apnéiques (Li et al., 2017). Ce qui pourrait, du moins en partie, expliquer les complications CV décrites dans le SAHOS. Par exemple, une équipe chinoise a mis en évidence dans un modèle animal l'implication de miR145 dans le remodelage aortique lors de la simulation d'un SAHOS (C. Yu et al., 2017).

Une équipe américaine a montré que le miR630 transporté par les exosomes est diminué chez les enfants apnéiques présentant une DE (Khalyfa et al., 2016). Or, ce miRNA est connu pour réguler un grand nombre de gènes jouant un rôle sur la CE.

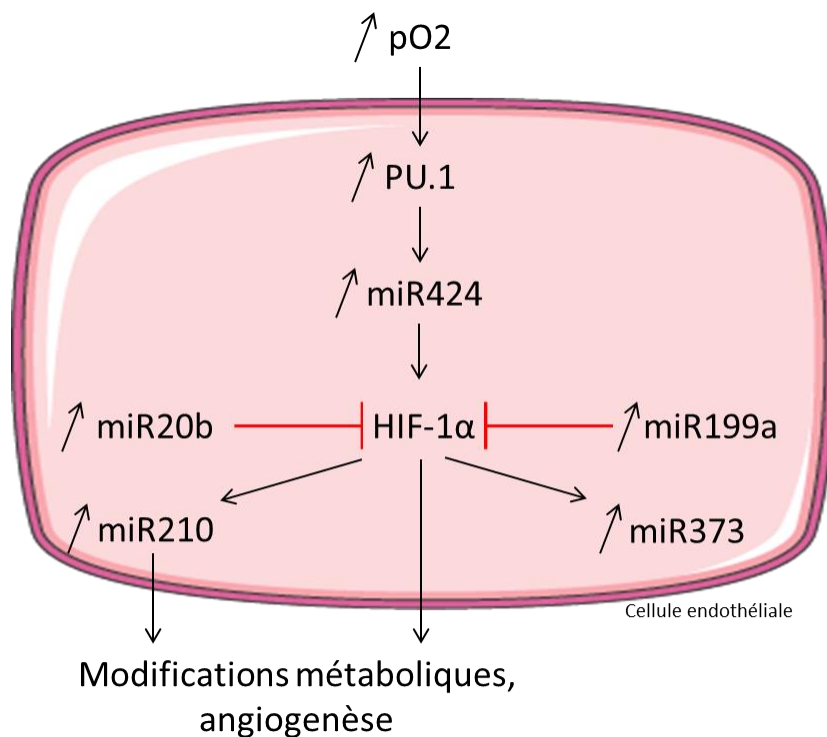
Les miRNA pourraient être un bio marqueur non invasif des complications des apnées au cours du sommeil.

En effet, les miRNA circulants ont tous les caractéristiques nécessaires pour être de bons bio marqueurs (de Gonzalo-Calvo et al., 2017) et notamment :

- Ils peuvent être recueillis grâce à des techniques peu invasives : prélèvement sanguin
  - Ils sont stables et ont une demi-vie longue
- Ils peuvent être quantifiés efficacement et relativement rapidement....

Par exemple, le miR664a-3p est décrit comme tel dans le cadre de l'athérosclérose chez les patients apnéiques (Li et al., 2018).

Une étude a montré que les miRNA pourraient de la même façon, être des bio marqueurs de la réponse adaptée à un traitement par PPC (Sánchez-de-la-Torre et al., 2015).



**Figure 14.** Exemple de réponse décrite de la cellule endothéliale à l'HI (d'après Loscalzo, 2010).

PU.1 : facteur de transcription

### **c. miRNA et pathologies cardiovasculaires**

L'expression des miRNA est anormale dans les différents tissus composant le système CV au cours de pathologies telles que l'insuffisance cardiaque, les cardiomyopathies ou encore l'athérosclérose. Les miRNA vont intervenir à différents niveaux de l'homéostasie cardiovasculaire : remodelage cardiaque, l'apoptose cellulaire, l'inflammation, l'angiogenèse...

Il a été décrit que les miRNA interviennent à différentes étapes responsables de l'athérosclérose (Laffont and Rayner, 2017) (figure 15). Tout d'abord, ils vont intervenir dans l'homéostasie du cholestérol (Wagschal et al., 2015). Par la suite, l'activation endothéliale va favoriser le recrutement des leucocytes. Différentes voies de signalisation participent à cela et notamment celle de ICAM-1, VCAM-1, et E sélectine. Différents miRNA, par exemple miR126-3p, miR31 et miR17-3p ont été décrits comme modifiant l'expression de ces molécules (Harris et al., 2008; Suárez et al., 2010). Ils peuvent également promouvoir la prolifération des CE (miR126, miR495) (Liu et al., 2015; Schober et al., 2014).

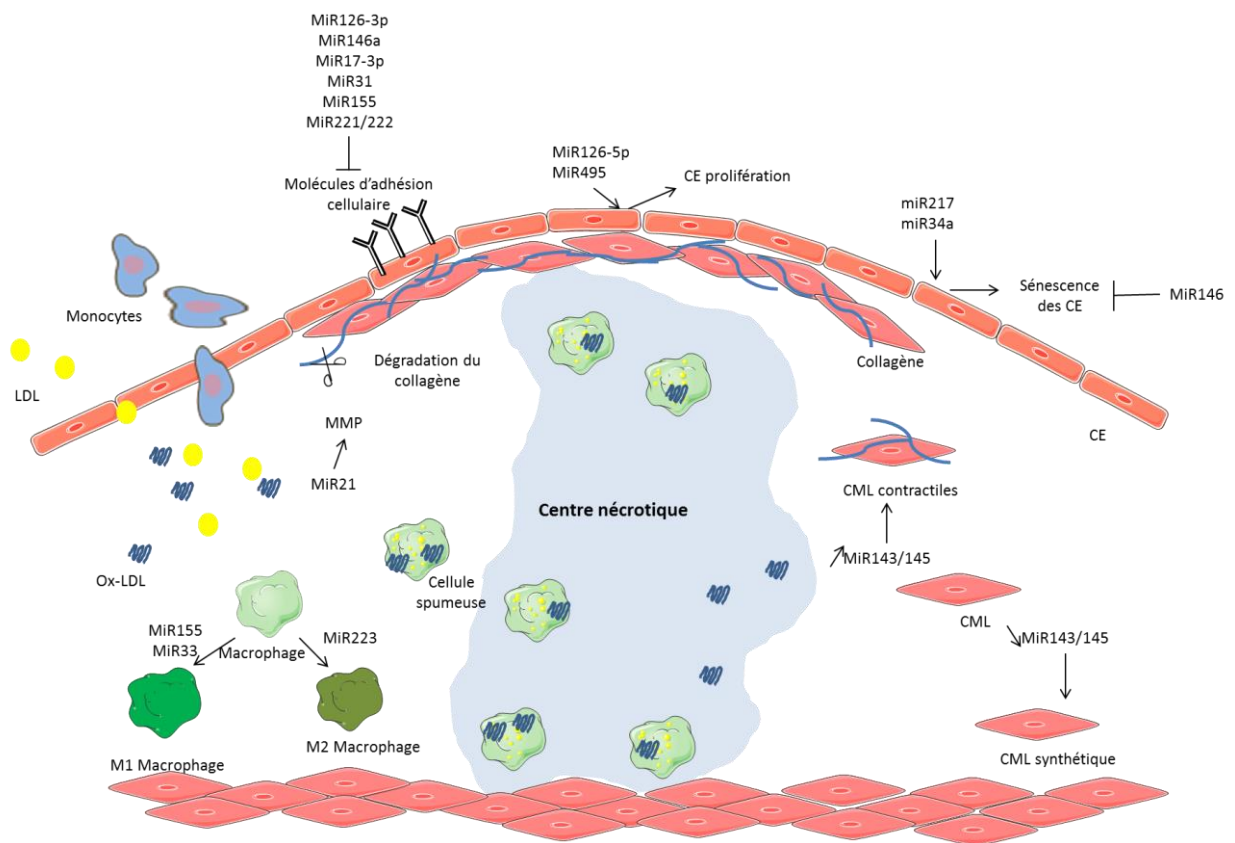
Les miRNA vont de la même façon réguler certaines voies pro inflammatoires (Wei and Schober, 2016), ou encore des mécanismes impliqués dans le phénomène de rupture de plaque.

Parallèlement, plusieurs études ont pu démontrer le rôle des miRNA dans la DE. A titre d'exemple, miR205 va agir sur la cascade enzymatique impliquant les métalloprotéinases MMP2 et MMP9 impliquées dans la dégradation de la matrice extra cellulaire et ainsi favoriser le développement de l'anévrisme de l'aorte abdominale. Ces MMP sont inhibées par TIMP3 et RECK. MiR205, en inhibant les inhibiteurs des MMP, favorise la dégradation de la matrice extra cellulaire vasculaire. Plus la concentration de miR205 est importante, plus nous observons une dégradation de la matrice (Kim et al., 2014).

D'autre part, miR146 agit sur différentes voies pro-inflammatoires dont les voies de MAP kinase et NFkB. Ces 2 voies vont notamment entraîner une activation endothéliale. Or miR146 va inhiber ces voies et ainsi lutter contre l'activation endothéliale. Une diminution de miR146 va donc favoriser cette activation endothéliale (Cheng et al., 2013).

Egalement, miR92 a pour cible KLF-2 ARNm. KLF-2 régule certains gènes comme celui de la eNOS. MiR92 va également réguler la biodisponibilité du NO (Wu et al., 2011).

Enfin, différents miRNA ont été décrits comme impliqués dans la régulation de la réponse inflammatoire de la CE (Andreou et al., 2015).



**Figure 15.** Principaux miRNA et leur impact sur les mécanismes cellulaires conduisant à l'athérosclérose (à partir de (Laffont and Rayner, 2017)).

CE : cellule endothéliale, CML : cellule musculaire lisse, LDL : low-density lipoprotein, MMP : métalloprotéinases de matrice.



# **Partie 1 : SAHOS et dysfonction endothéliale**

## ***1. Objectif***

Le dysfonctionnement endothélial occupe une place importante dans la pathophysiologie des complications cardiovasculaires de l'AOS. Ceci a été confirmé par diverses méta-analyses.

Cependant, les revues et méta-analyses antérieurs dans ce domaine ont inclus des études hétérogènes avec une description limitée des comorbidités qui contribuent de façon importante au risque CV associé au SAHOS, comme l'hypertension et les troubles métaboliques. De plus, la plupart de ces études étaient de petites études à centre unique évaluant la fonction endothéliale par la FMD et pouvant être sujettes à la variabilité intra- et inter-opérateurs.

Du fait de ces limites méthodologiques, il est intéressant de pouvoir confirmer ces données et notamment en présence d'un autre facteur de risque de DE qu'est le DT2.

De manière générale, ce travail a eu pour but d'évaluer l'implication du SAHOS dans la DE décrite chez les patients apnéiques, en s'intéressant à deux populations bien distinctes que sont les patients exempts de toute pathologie CV et les patients présentant un diabète de type 2 associé.

Dans la première partie de ce travail, nous avons voulu préciser l'impact réel du SAHOS sur la dysfonction endothéliale déterminée chez des patients sans aucun antécédent CV. Nous avons ainsi étudié le rôle des apnées, et de leurs conséquences sur le sommeil ainsi que celui des autres cofacteurs de risque CV que peuvent présenter ces patients.

Dans la deuxième partie, nous nous sommes intéressés aux patients diabétiques qui présentent, du fait de leur maladie métabolique, de facto une dysfonction endothéliale. Nous avons donc évalué le rôle que peuvent avoir des apnées obstructives chez ces patients sur l'atteinte vasculaire déjà existante. Nous avons également défini le phénotypage des MV circulantes afin d'évaluer leur rôle dans la DE des patients diabétiques présentant un SAHOS.

## **2. Projet 1 : Recherche d'une association indépendante entre la sévérité du SAHOS et la DE**

Le SAHOS s'accompagne de pathologies CV telles que les AVC, les IDM, l'HTA... La physiopathologie de ces complications peut être commune autour de la DE. Cette DE peut être évaluée par RH-Pat grâce à l'Endopat. Il s'agit d'une mesure non invasive, permettant d'évaluer la réponse à l'hyperhémie. Un index supérieur à 1.67 signe une fonction endothéliale normale.

Or, différentes études ont montré une DE dans le cadre des apnées du sommeil. Ce qui pourrait expliquer une prévalence augmentée chez ces patients de pathologies CV. Cependant, le SAHOS est associé à de nombreux cofacteurs de risque CV tels que le sexe, l'âge, l'obésité....

Dans le cadre de cette méta-analyse portant sur 12 études s'étant intéressées à la fonction endothéliale au cours du SAHOS, l'objectif est donc de déterminer l'implication réelle du SAHOS dans la DE ainsi que le rôle des autres cofacteurs de risque CV.

## **a. Résultats expérimentaux : projet 1**

**Obstructive sleep apnoea and endothelial dysfunction: an individual patient data meta-analysis.**

Vanessa Bironneau<sup>1</sup>, Renaud Tamisier<sup>2,3</sup>, Wojciech Trzepizur<sup>1,4</sup>, Ramaroson Andriantsitohaina<sup>1</sup>, Mathieu Berger<sup>5,6</sup>, François Goupil<sup>7</sup>, Marie Joyeux-Faure<sup>2,3</sup>, Ingrid Jullian-Desayes<sup>2,3</sup>, Sandrine Launois<sup>8</sup>, Marc Le Vaillant<sup>9</sup>, Marie-Carmen Martinez<sup>1</sup>, Frédéric Roche<sup>5,6</sup>, Jean-Louis Pépin<sup>2,3</sup>, Frédéric Gagnadoux<sup>1,4</sup>.

<sup>1</sup>INSERM U1063, SOPAM, Angers University, F-49045, Angers, France

<sup>2</sup>HP2 laboratory, INSERM U1042, Grenoble Alps University, Grenoble, France

<sup>3</sup>EFCR Laboratory, Pole Thorax et Vaisseaux, Grenoble Alpes University Hospital, Grenoble, France

<sup>4</sup>Department of Respiratory Diseases, Angers University hospital, Angers, France

<sup>5</sup>SNA-EPIS Laboratory, EA 4607, University of Lyon, Saint-Etienne, France

<sup>6</sup>Department of Clinical and Exercise Physiology, University Hospital of Saint-Etienne, Saint-Etienne, France

<sup>7</sup>Department of Respiratory Diseases, General Hospital, Le Mans, France

<sup>8</sup>Sleep Unit, Saint-Antoine Hospital, Paris, France

<sup>9</sup>Institut de Recherche en Santé Respiratoire des Pays de le Loire, Beaucouzé, France

**Corresponding author:** Frédéric Gagnadoux, Département de Pneumologie, CHU, 4 rue

Larrey, 49100, Angers, France ; Phone: 33 241353695 ; Fax: 33 241354974

Email: frgagnadoux@chu-angers.fr

## **Abstract**

Obstructive sleep apnoea (OSA) is associated with an increased cardiovascular (CV) risk. The reactive hyperaemia index (RHI) measured by peripheral arterial tonometry is a validated measurement of endothelial function and a strong predictor of late CV events in at risk subjects.

We performed an individual patient data meta-analysis (IPDMA) to investigate the association between OSA severity and endothelial dysfunction taking into account associated CV risk factors. Patients from 12 studies underwent overnight polysomnography or respiratory polygraphy for suspected OSA. Endothelial dysfunction was defined by a log-transformed  $RHI < 0.51$ . Subgroup analyses were performed to investigate specific populations.

Among 730 patients without overt CV disease, 387 (53.0%) had severe OSA and 164 (22.5%) exhibited endothelial dysfunction. Endothelial dysfunction was associated with severe OSA (odds ratio, OR [95% confidence interval]: 2.31 [1.12-4.79];  $p=0.02$ ), and nocturnal hypoxaemia (OR: 1.83 [1.20-2.79] for  $>20$  minutes with oxygen saturation  $<90\%$ ;  $p=0.005$ ) after adjustment for age, gender, diastolic blood pressure, obesity and diabetes. The association between severe OSA and endothelial dysfunction seemed more pronounced in mildly sleepy, older male patients, without metabolic comorbidities.

Among adults without overt CV disease, severe OSA is independently associated with an increased risk of endothelial dysfunction that may predispose to late CV events.

**Key words:** obstructive sleep apnoea, endothelial function, reactive hyperaemia index,

## **Introduction**

The endothelium plays important roles in modulating vascular tone by synthesizing and releasing endothelium-derived relaxing factors. Endothelial dysfunction caused by reduced production or action of endothelium-derived relaxing factors is considered as an initial step toward cardiovascular (CV) disease in at risk patients(Godo and Shimokawa, 2017; Vanhoutte et al., 2017). In clinical setting, the non-invasive evaluation of peripheral endothelial function constitutes an excellent surrogate marker of incident CV events(Godo and Shimokawa, 2017). Many studies have correlated endothelial dysfunction with CV risk in patients with risk factors such as systemic hypertension, diabetes mellitus, dyslipidemia and obesity/insulin resistance(Flammer et al., 2012b). A recent systematic review and meta-analysis showed that brachial artery flow-mediated dilation (FMD), and the reactive hyperaemia index (RHI) obtained by peripheral arterial tonometry (PAT) significantly predict CV events, with similar prognostic magnitude(Matsuzawa et al., 2015). From a technical viewpoint, peripheral arterial tonometry offers the advantages of being completely non-invasive, simple to perform, and less prone to operator error and thus more reproducible than FMD(Flammer et al., 2012c; Lian and Keaney, 2010).

Evidence from population- and clinic-based cohort studies supports a causal association between OSA and the incidence of CV diseases including hypertension, coronary heart disease, arrhythmia, heart failure, and stroke(Drager et al., 2017; Javaheri et al., 2017b). Endothelial dysfunction is considered as a key mechanism linking OSA and its hypoxia-related consequences with CV morbidity(Hoyos et al., 2015). Given the marked heterogeneity of OSA in terms of clinical phenotypes, co-morbidities and health outcomes, endothelial function could be used in OSA patients as a predictive tool to better identify which subjects have preclinical vascular disease at high risk of subsequent CV events. However, the relationship between OSA and endothelial dysfunction remains to be clarified, taking into

account both indices of sleep-disordered breathing severity and potential covariates. Indeed, previous reviews and meta-analysis in the field have included heterogeneous studies with a limited description of comorbid conditions making an important contribution to OSA-associated CV risk such as hypertension and metabolic disorders(Hoyos et al., 2015; Joyeux-Faure et al., 2018b; Kendzerska et al., 2014b; Wang et al., 2015). Furthermore, most of these studies were small single-centre studies evaluating endothelial function by FMD that may be prone to intra- and inter-operator variability(Flammer et al., 2012c; Lian and Keaney, 2010). Approaches using individual participant data meta-analysis (IPDMA) do not aggregate summary data but address study questions by including actual participant data from different data sources(Riley et al., 2010). Using individual data for OSA indices of severity overcomes limitations related to the selective cut-offs used in previous publications and allows specific subgroup analyses. Information at the participant's level regarding confounder's permits proper adjustment.

The aim of this IPDMA was to investigate the relationship between OSA severity indices and RHI, a validated measurement of endothelial function with low observer variability, after appropriate adjustment for confounders.

## **Methods**

We pooled individual data from patients with clinical suspicion of OSA and no overt CV disease involved in 12 separate studies (7 randomized controlled trials and 5 observational studies) initiated between 2007 and 2013 by the Departments of Respiratory and Sleep Medicine of Angers and Grenoble University Hospitals. Only data obtained at the baseline evaluation of interventional and observational studies were included in the present individual data meta-analysis. Patients with technical failure of PAT and/or history of CV disease including coronary heart disease, heart failure, arrhythmias, and stroke were excluded from

the studies. All studies were approved by an independent Ethics Committee, and were conducted in accordance with applicable good clinical practice requirements in Europe, French law, ICH E6 recommendations and the ethical principles of the Helsinki Declaration (1996 and 2000). All randomized controlled trials were registered on the ClinicalTrials.gov site (online supplementary table S1).

### ***Clinical evaluation***

All clinical examinations and evaluations were conducted during the morning hours following sleep studies. Clinical evaluation included anthropometric data, smoking habits, medical history, medication use and questionnaires. Obesity was defined by a body mass index (BMI)  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>. Excessive daytime sleepiness was assessed by the Epworth Sleepiness Score (Johns, 1991). Clinic blood pressure was measured using a periodically calibrated mercury sphygmomanometer and an appropriate cuff size. Recorded blood pressure was the average of 3 consecutive readings during a 5-min period following at least 5 min of rest in the sitting position. Only patients who were previously diagnosed as hypertensive and were taking antihypertensive medication were considered as having hypertension. Diabetes was defined based on current use of antidiabetic medications and dyslipidaemia on current lipid-lowering medications.

### ***Sleep studies***

All patients were investigated for suspected OSA using overnight in-laboratory respiratory polygraphy (RP), or polysomnography (PSG) while spontaneous breathing to characterise abnormal respiratory events during sleep. Recorded data included nasal-oral airflow (thermistor and nasal pressure cannula), chest and abdominal wall motion (respiratory inductance plethysmograph belts), arterial oxygen saturation (finger oximetry), body position and electrophysiological signals for sleep evaluation (PSG). Respiratory events were scored



manually using recommended criteria(Berry et al., 2012). The apnoea–hypopnoea index (AHI) was calculated as the number of apnoea and hypopnoea events per hour of sleep (PSG) or recording (RP).

### ***Assessment of endothelial function***

As previously described(Gagnadoux et al., 2017a), endothelial function was assessed in the morning following sleep study by digital pulse amplitude, using PAT (EndoPAT<sup>®</sup>, Itamar Medical Ltd., Caesarea, Israel). All participating centres followed the same procedure. The RHI was calculated by a computer in an operator-independent manner, as the ratio of the average amplitude of the PAT signal post- to pre-occlusion of the tested arm, normalized to the concurrent signal from the contralateral finger. The log-transformed ratio, expressed as Ln-RHI was calculated from the same ratio between the digital pulse volume during reactive hyperaemia and at baseline. Based on previous reports(Akiyama et al., 2012; Bonetti et al., 2004; Erre et al., 2018), a Ln-RHI cut-off value<0.51 was used to define the presence of a significant endothelial dysfunction. (See online supplementary materials for further details).

### ***Statistical analysis***

Results were expressed as percentages, mean (standard deviation, SD) and odds ratio (OR), 95% confidence interval (CI). A two-tailed p value <0.05 was considered significant. Statistical comparisons were performed using the Chi2 test for categorical variables and the unpaired t-test for continuous variables. The primary dependent variable of interest was the presence of endothelial dysfunction (Ln-RHI<0.51). Factors significantly associated with endothelial dysfunction were introduced in a multivariate logistic mixed model with a random effect by study. The primary independent variables included the AHI and 2 different indices of nocturnal hypoxemia, the mean oxyhemoglobin saturation (SaO<sub>2</sub>) during sleep and the duration of sleep with SaO<sub>2</sub> <90% (T90). The following commonly used cut-offs for AHI

were used to define categories of OSA severity: <5 (no OSA), 5 to <30 (mild to moderate OSA),  $\geq 30$  (severe OSA). The study sample was grouped into tertiles for the 2 indices of nocturnal hypoxemia. To avoid potential bias in choosing a RHI cut-off value for endothelial dysfunction, multivariate linear mixed models with a random effect by study were performed to characterize the associations between Ln-RHI as a continuous variable and indices of OSA severity. In order to estimate the effect size of increasing OSA severity on endothelial function, adjusted means of Ln-RHI were calculated according to categories of OSA severity. Subgroup analyses were performed to determine if there were some differences across categories of patients with OSA. All statistical analyses were performed with SAS software (SAS/STAT Package 2002–2003; SAS Institute Inc., Cary, NC). A 2-tailed p value < 0.05 was considered significant. (See online supplementary materials for further details regarding the assessment of heterogeneity between studies).

## **Results**

The details of the 12 studies included in the IPDMA are presented in the online supplement (Table S1). Among 802 patients, 72 were excluded due to history of CV disease (n=42) or PAT technical failure (n=30). Our final sample size comprised 730 patients with clinical suspicion of OSA and no overt CV disease. Patient's characteristics according to their original study are presented in the online supplement (Table S2). As showed in Table 1, the prevalence of endothelial dysfunction increased from 14.9% in the no OSA group, to 26.9% in patients with severe OSA ( $p=0.0086$ ). As expected, patients with severe OSA were older, with a marked male predominance, higher prevalence of obesity and hypertension. Patients with endothelial dysfunction were characterized by higher prevalence of obesity, diabetes and severe OSA, and higher diastolic blood pressure when compared to subjects with normal endothelial function (Table 2).

On multivariate analysis, severe OSA was significantly associated with an increased risk of endothelial dysfunction (OR [95%CI], 2.31 [1.12-4.79]), after adjustment for age, gender, diastolic blood pressure, obesity and diabetes (Figure 2). We further investigated the association between endothelial dysfunction and 2 indices of nocturnal hypoxaemia. As showed in Table 3, increasing nocturnal hypoxaemia as assessed by the mean SaO<sub>2</sub> and T90 was associated with a significant increase in the risk of endothelial dysfunction after adjustment for confounders. Subgroup analyses were performed to evaluate the independent association between severe OSA and endothelial dysfunction in different patient categories. As showed in figure 3 the relationship between severe OSA and endothelial dysfunction seemed more pronounced in older male patients without obesity and diabetes and in non-sleepy patients with an Epworth sleepiness score below 10.

Multivariate regression analyses were also performed to characterize the association between categories of OSA severity and Ln-RHI as a continuous variable. Figure 4 presents adjusted mean values of Ln-RHI according to tertiles of mean SaO<sub>2</sub> and T90. The adjusted mean value of Ln-RHI decreased from 0.75 in the lowest tertile of T90 to 0.69 in the highest tertile (p=0.0001). A similar decrease in the adjusted mean value of Ln-RHI was observed between the lowest and the highest tertile of mean SaO<sub>2</sub> (p=0.0008).

## **Discussion**

To the best of our knowledge, this is the first meta-analysis of individual participant data evaluating the association between OSA severity and endothelial dysfunction with proper adjustment for confounding factors. Our study included a relatively large sample of typical OSA patients, predominantly male, with a wide range of disease severity, frequently presenting hypertension and metabolic comorbidities. All data were obtained using standard operating procedures and a validated measurement of endothelial function with a low observer variability. We found that both severe OSA and nocturnal hypoxemia were

significantly associated with an increased risk of endothelial dysfunction after adjustment for age, gender, diastolic blood pressure and metabolic comorbidities. The association between severe OSA and endothelial dysfunction seemed more pronounced in mildly sleepy, older male patients, without metabolic comorbidities.

Recent reviews and meta-analyses concluded that moderate-to-severe OSA might impair endothelial function(Johns, 1991; Wang et al., 2015). By pooling the summary data from 11 case-control studies including a total of 445 subjects, Wang et al. found that endothelial function assessed by FMD was lower in patients with OSA than in controls(Wang et al., 2015). The authors performed meta-regression to examine the impact of potential modifiers on OSA-related changes in FMD. In the whole OSA population, the association between OSA and FMD was significantly modified by the BMI and the level of triglycerides. Conversely, none of the covariates significantly modified the association in the subgroup of patients with moderate-to-severe OSA. However, this meta-analysis has potential limitations related the use of FMD technic that may be prone to intra- and inter-operator variability(Flammer et al., 2012c; Lian and Keaney, 2010), the inclusion of small single-centre studies, and the exclusion of patients with traditionally known CV risk factor such as hypertension, diabetes, dyslipidaemia. By pooling pulse-wave velocity (PWV) data from 5 case-control studies including 253 patients, Wang et al. also concluded that OSA increased arterial stiffness(Wang et al., 2015). This finding was not confirmed by a recent IPDMA(Joyeux-Faure et al., 2018b). This meta-analysis used individual patient data from 9 studies performed by the same centre with 893 well-characterised patients and PWV measured using the same technique for all studies. The authors concluded that the elevation of arterial stiffness in patients with OSA was driven more by conventional CV risk factors (age, hypertension and the presence of diabetes) than by indices of sleep-disordered breathing severity(Joyeux-Faure et al., 2018b). Conversely, our IPDMA provides evidence in support of an independent association between

OSA severity and endothelial dysfunction after adjustment for traditional CV risk factors. Several factors may have contributed to these discrepant findings. Joyeux-Faure et al. included patients with a very high prevalence of hypertension (78%) and diabetes (45%)(Joyeux-Faure et al., 2018b). In line with previous reports from large clinic-based cohort studies(Gagnadoux et al., 2016; Kendzerska et al., 2014c), the prevalence of hypertension and diabetes was markedly lower in our population (39 and 15% respectively). Another issue is whether a correlation exists between endothelial function and arterial stiffness indices in patients with OSA. The major determinants of reflection wave magnitude are the vascular characteristics of the arterial branching regions and impedance mismatch between the proximal and distal arteries, rather than the degree of peripheral vascular reactivity(W.-I. Yang et al., 2011). Recent studies found no significant correlation between endothelial function assessed by PAT and arterial stiffness measured by augmentation index and PWV in patients with hypertension or acute ischemic stroke(Tuttolomondo et al., 2017; W.-I. Yang et al., 2011).

The use of individual patient data allowed us to carry out specific subgroup analysis. Our results suggest that the impact of OSA on endothelial function might be less significant in the presence of major CV risk factors such as diabetes or obesity. These findings should be interpreted with caution due to differences in sample sizes. However, they are in accordance with a recent randomized controlled trial showing no impact of continuous positive airway pressure therapy for 3 months on endothelial function assessed by PAT in patients with multiple CV risk factors(Gottlieb et al., 2014). Previous studies have reported an interaction between gender and OSA on endothelial function assessed by FMD or PAT suggesting a higher vulnerability of the vascular endothelium to the adverse effects of mild-to-moderate OSA in women(Faulx et al., 2004; Randby et al., 2013). However, these studies were population-based studies with a low prevalence of severe OSA. Conversely, our study

population included a majority of patients with severe OSA and the association with endothelial dysfunction appeared to be limited to men. We also found an interaction with daytime sleepiness, the association between severe OSA and endothelial dysfunction being limited to patients with an Epworth score <10. A strong correlation has been demonstrated between the RHI measured by PAT and muscle sympathetic nerve activity(Sverrisdóttir et al., 2010). On the other hand, Taranto-Montemurro et al. demonstrated an inverse relationship between subjective daytime sleepiness and sympathetic activity in patients with heart failure and OSA(Taranto Montemurro et al., 2012). Endothelial dysfunction in patients with severe OSA may be associated with mild subjective daytime sleepiness due to sympathetic over-activity.

The main limitation of our IPDMA is the observational design of the eligible studies which does not allow establishing temporal or causal relationship between severe OSA and endothelial dysfunction. Further studies are required to investigate whether PAT assessment of endothelial function predicts CV outcomes in patients with OSA. As up to 50% of OSA are minimally symptomatic(Roure et al., 2008), targeting CV outcomes has emerged as a therapeutic objective in patients with OSA. Endothelial function assessment has also a potential value in identifying responders and non-responders to therapy(Flammer et al., 2012c; Modena et al., 2002). Future interventional studies should evaluate whether improvement of endothelial function after OSA therapy predicts a better CV prognosis in patients who exhibit endothelial dysfunction at diagnosis.

In conclusion, among adults without overt CV disease, severe OSA is independently associated with an increased risk of endothelial dysfunction that may predispose to a higher risk of late CV events.

## References

- Agouni, A., Andriantsitohaina, R., Martinez, M.C., 2014. Microparticles as biomarkers of vascular dysfunction in metabolic syndrome and its individual components. *Curr. Vasc. Pharmacol.* 12, 483–492.
- Ahmad, M., Makati, D., Akbar, S., 2017. Review of and Updates on Hypertension in Obstructive Sleep Apnea. *Int. J. Hypertens.* 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/1848375>
- Akiyama, E., Sugiyama, S., Matsuzawa, Y., Konishi, M., Suzuki, H., Nozaki, T., Ohba, K., Matsubara, J., Maeda, H., Horibata, Y., Sakamoto, K., Sugamura, K., Yamamuro, M., Sumida, H., Kaikita, K., Iwashita, S., Matsui, K., Kimura, K., Umemura, S., Ogawa, H., 2012. Incremental prognostic significance of peripheral endothelial dysfunction in patients with heart failure with normal left ventricular ejection fraction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 60, 1778–1786. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2012.07.036>
- Alexiev, F., Brill, A.-K., Ott, S.R., Duss, S., Schmidt, M., Bassetti, C.L., 2018. Sleep-disordered breathing and stroke: chicken or egg? *J. Thorac. Dis.* 10, S4244–S4252. <https://doi.org/10.21037/jtd.2018.12.66>
- Alonso-Fernández, A., Suquia, A.G., de la Peña, M., Casitas, R., Pierola, J., Barceló, A., Soriano, J.B., Fernández-Capitán, C., Martínez-Ceron, E., Carrera, M., García-Río, F., 2016. OSA Is a Risk Factor for Recurrent VTE. *Chest* 150, 1291–1301. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2016.07.011>
- Andreou, I., Sun, X., Stone, P.H., Edelman, E.R., Feinberg, M.W., 2015. miRNAs in atherosclerotic plaque initiation, progression, and rupture. *Trends Mol. Med.* 21, 307–318. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2015.02.003>
- Andriantsitohaina, R., Gaceb, A., Vergori, L., Martínez, M.C., 2012. Microparticles as regulators of cardiovascular inflammation. *Trends Cardiovasc. Med.* 22, 88–92. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2012.07.001>
- Anothaisintawee, T., Reutrakul, S., Van Cauter, E., Thakkinstian, A., 2016. Sleep disturbances compared to traditional risk factors for diabetes development: Systematic review and meta-analysis. *Sleep Med. Rev.* 30, 11–24. <https://doi.org/10.1016/j.smrv.2015.10.002>
- Atkeson, A., Jelic, S., 2008. Mechanisms of endothelial dysfunction in obstructive sleep apnea. *Vasc. Health Risk Manag.* 4, 1327–1335. <https://doi.org/10.2147/vhrm.s4078>
- Aurora, R.N., Punjabi, N.M., 2013. Obstructive sleep apnoea and type 2 diabetes mellitus: a bidirectional association. *Lancet Respir. Med.* 1, 329–338. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(13\)70039-0](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(13)70039-0)
- Badimon, L., Suades, R., Arderiu, G., Peña, E., Chiva-Blanch, G., Padró, T., 2017. Microvesicles in Atherosclerosis and Angiogenesis: From Bench to Bedside and Reverse. *Front. Cardiovasc. Med.* 4, 77. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2017.00077>
- Badran, M., Abuyassin, B., Golbidi, S., Ayas, N., Laher, I., 2019. Alpha Lipoic Acid Improves Endothelial Function and Oxidative Stress in Mice Exposed to Chronic Intermittent Hypoxia. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2019, 4093018. <https://doi.org/10.1155/2019/4093018>
- Barbé, F., Durán-Cantolla, J., Sánchez-de-la-Torre, M., Martínez-Alonso, M., Carmona, C., Barceló, A., Chiner, E., Masa, J.F., Gonzalez, M., Marín, J.M., Garcia-Rio, F., Diaz de Atauri, J., Terán, J., Mayos, M., de la Peña, M., Monasterio, C., del Campo, F., Montserrat, J.M., Spanish Sleep And Breathing Network, 2012. Effect of continuous positive airway pressure on the incidence of hypertension and cardiovascular events in nonsleepy patients with obstructive sleep apnea: a randomized controlled trial. *JAMA* 307, 2161–2168. <https://doi.org/10.1001/jama.2012.4366>

- Berghaus, T.M., Faul, C., von Scheidt, W., Schwaiblmair, M., 2016. The prevalence of sleep-disordered breathing among survivors of acute pulmonary embolism. *Sleep Breath. Schlaf Atm.* 20, 213–218. <https://doi.org/10.1007/s11325-015-1209-8>
- Berry, R.B., Budhiraja, R., Gottlieb, D.J., Gozal, D., Iber, C., Kapur, V.K., Marcus, C.L., Mehra, R., Parthasarathy, S., Quan, S.F., Redline, S., Strohl, K.P., Davidson Ward, S.L., Tangredi, M.M., American Academy of Sleep Medicine, 2012. Rules for scoring respiratory events in sleep: update of the 2007 AASM Manual for the Scoring of Sleep and Associated Events. Deliberations of the Sleep Apnea Definitions Task Force of the American Academy of Sleep Medicine. *J. Clin. Sleep Med. JCSM Off. Publ. Am. Acad. Sleep Med.* 8, 597–619. <https://doi.org/10.5664/jcsm.2172>
- Bikov, A., Kunos, L., Pállinger, É., Lázár, Z., Kis, A., Horváth, G., Losonczy, G., Komlósi, Z.I., 2017. Diurnal variation of circulating microvesicles is associated with the severity of obstructive sleep apnoea. *Sleep Breath. Schlaf Atm.* 21, 595–600. <https://doi.org/10.1007/s11325-017-1464-y>
- Bonetti, P.O., Pumper, G.M., Higano, S.T., Holmes, D.R., Kuvin, J.T., Lerman, A., 2004. Noninvasive identification of patients with early coronary atherosclerosis by assessment of digital reactive hyperemia. *J. Am. Coll. Cardiol.* 44, 2137–2141. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2004.08.062>
- Carberry, J.C., Amatoury, J., Eckert, D.J., 2018. Personalized Management Approach for OSA. *Chest* 153, 744–755. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2017.06.011>
- Casitas, R., Martínez-Cerón, E., Galera, R., Cubillos-Zapata, C., González-Villalba, M.J., Fernández-Navarro, I., Sánchez, B., García-Sánchez, A., Zamarrón, E., García-Río, F., 2017. The effect of treatment for sleep apnoea on determinants of blood pressure control. *Eur. Respir. J.* 50. <https://doi.org/10.1183/13993003.01261-2017>
- Celermajer, D.S., 2008. Reliable endothelial function testing: at our fingertips? *Circulation* 117, 2428–2430. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.775155>
- Cheng, H.S., Sivachandran, N., Lau, A., Boudreau, E., Zhao, J.L., Baltimore, D., Delgado-Olguin, P., Cybulsky, M.I., Fish, J.E., 2013. MicroRNA-146 represses endothelial activation by inhibiting pro-inflammatory pathways. *EMBO Mol. Med.* 5, 1017–1034. <https://doi.org/10.1002/emmm.201202318>
- Cicolin, A., Mangiardi, L., Mutani, R., Bucca, C., 2006. Angiotensin-converting enzyme inhibitors and obstructive sleep apnea. *Mayo Clin. Proc.* 81, 53–55. <https://doi.org/10.4065/81.1.53>
- Cross, M.D., Mills, N.L., Al-Abri, M., Riha, R., Vennelle, M., Mackay, T.W., Newby, D.E., Douglas, N.J., 2008. Continuous positive airway pressure improves vascular function in obstructive sleep apnoea/hypopnoea syndrome: a randomised controlled trial. *Thorax* 63, 578–583. <https://doi.org/10.1136/thx.2007.081877>
- da Silva Paulitsch, F., Zhang, L., 2019. Continuous positive airway pressure for adults with obstructive sleep apnea and cardiovascular disease: a meta-analysis of randomized trials. *Sleep Med.* 54, 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.sleep.2018.09.030>
- Daiber, A., Steven, S., Weber, A., Shuvaev, V.V., Muzykantov, V.R., Laher, I., Li, H., Lamas, S., Münzel, T., 2017a. Targeting vascular (endothelial) dysfunction. *Br. J. Pharmacol.* 174, 1591–1619. <https://doi.org/10.1111/bph.13517>
- Daiber, A., Steven, S., Weber, A., Shuvaev, V.V., Muzykantov, V.R., Laher, I., Li, H., Lamas, S., Münzel, T., 2017b. Targeting vascular (endothelial) dysfunction. *Br. J. Pharmacol.* 174, 1591–1619. <https://doi.org/10.1111/bph.13517>
- Daiber, A., Xia, N., Steven, S., Oelze, M., Hanf, A., Kröller-Schön, S., Münzel, T., Li, H., 2019. New Therapeutic Implications of Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) Function/Dysfunction in Cardiovascular Disease. *Int. J. Mol. Sci.* 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20010187>
- de Gonzalo-Calvo, D., Iglesias-Gutiérrez, E., Llorente-Cortés, V., 2017. Epigenetic Biomarkers and Cardiovascular Disease: Circulating MicroRNAs. *Rev. Espanola Cardiol. Engl. Ed* 70, 763–769. <https://doi.org/10.1016/j.rec.2017.05.013>



- de Vries, G.E., Wijkstra, P.J., Houwerzijl, E.J., Kerstjens, H.A.M., Hoekema, A., 2018. Cardiovascular effects of oral appliance therapy in obstructive sleep apnea: A systematic review and meta-analysis. *Sleep Med. Rev.* 40, 55–68. <https://doi.org/10.1016/j.smrv.2017.10.004>
- Dernaika, T.A., Kinasevitz, G.T., Tawk, M.M., 2009. Effects of nocturnal continuous positive airway pressure therapy in patients with resistant hypertension and obstructive sleep apnea. *J. Clin. Sleep Med. JCSM Off. Publ. Am. Acad. Sleep Med.* 5, 103–107.
- Domingues, C.C., Dore, F.J., Cho, A., Ahmadi, N., Kropotova, Y., Kundu, N., Younes, N., Jain, V., Sen, S., 2019. Reassessing the effects of continuous positive airway pressure (CPAP) on arterial stiffness and peripheral blood derived CD34+ progenitor cells in subjects with sleep apnea. *Stem Cell Res. Ther.* 10, 147. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1251-8>
- Doyle, L.M., Wang, M.Z., 2019. Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells* 8. <https://doi.org/10.3390/cells8070727>
- Drager, L.F., McEvoy, R.D., Barbe, F., Lorenzi-Filho, G., Redline, S., INCOSACT Initiative (International Collaboration of Sleep Apnea Cardiovascular Trialists), 2017. Sleep Apnea and Cardiovascular Disease: Lessons From Recent Trials and Need for Team Science. *Circulation* 136, 1840–1850. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.029400>
- Erre, G.L., Piga, M., Fedele, A.L., Mura, S., Piras, A., Cadoni, M.L., Cangemi, I., Dessi, M., Di Sante, G., Tolu, B., Gremese, E., Cauli, A., Mangoni, A.A., Saba, P.S., Carru, C., Ferraccioli, G., Mathieu, A., Passiu, G., 2018. Prevalence and Determinants of Peripheral Microvascular Endothelial Dysfunction in Rheumatoid Arthritis Patients: A Multicenter Cross-Sectional Study. *Mediators Inflamm.* 2018, 6548715. <https://doi.org/10.1155/2018/6548715>
- Faulx, M.D., Larkin, E.K., Hoit, B.D., Aylor, J.E., Wright, A.T., Redline, S., 2004. Sex influences endothelial function in sleep-disordered breathing. *Sleep* 27, 1113–1120.
- Flammer, A.J., Anderson, T., Celermajer, D.S., Creager, M.A., Deanfield, J., Ganz, P., Hamburg, N.M., Lüscher, T.F., Shechter, M., Taddei, S., Vita, J.A., Lerman, A., 2012a. The assessment of endothelial function: from research into clinical practice. *Circulation* 126, 753–767. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.112.093245>
- Flammer, A.J., Anderson, T., Celermajer, D.S., Creager, M.A., Deanfield, J., Ganz, P., Hamburg, N.M., Lüscher, T.F., Shechter, M., Taddei, S., Vita, J.A., Lerman, A., 2012b. The assessment of endothelial function: from research into clinical practice. *Circulation* 126, 753–767. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.112.093245>
- Flammer, A.J., Anderson, T., Celermajer, D.S., Creager, M.A., Deanfield, J., Ganz, P., Hamburg, N.M., Lüscher, T.F., Shechter, M., Taddei, S., Vita, J.A., Lerman, A., 2012c. The assessment of endothelial function: from research into clinical practice. *Circulation* 126, 753–767. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.112.093245>
- Gagnadoux, F., Le Vaillant, M., Paris, A., Pigeanne, T., Leclair-Visonneau, L., Bizieux-Thaminy, A., Alizon, C., Humeau, M.-P., Nguyen, X.-L., Rouault, B., Trzepizur, W., Meslier, N., Institut de Recherche en Santé Respiratoire des Pays de la Loire Sleep Cohort Group, 2016. Relationship Between OSA Clinical Phenotypes and CPAP Treatment Outcomes. *Chest* 149, 288–290. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2015.09.032>
- Gagnadoux, F., Pépin, J.-L., Vielle, B., Bironneau, V., Chouet-Girard, F., Launois, S., Meslier, N., Meurice, J.-C., Nguyen, X.-L., Paris, A., Priou, P., Tamié, R., Trzepizur, W., Goupil, F., Fleury, B., 2017a. Impact of Mandibular Advancement Therapy on Endothelial Function in Severe Obstructive Sleep Apnea. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 195, 1244–1252. <https://doi.org/10.1164/rccm.201609-1817OC>
- Gagnadoux, F., Pépin, J.-L., Vielle, B., Bironneau, V., Chouet-Girard, F., Launois, S., Meslier, N., Meurice, J.-C., Nguyen, X.-L., Paris, A., Priou, P., Tamié, R., Trzepizur, W., Goupil, F., Fleury, B., 2017b. Impact of Mandibular Advancement Therapy on Endothelial Function in Severe

- Obstructive Sleep Apnea. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 195, 1244–1252.  
<https://doi.org/10.1164/rccm.201609-1817OC>
- Garcia, M.M.O., Lima, P.R.P., Correia, L.C.L., 2012. Prognostic value of endothelial function in patients with atherosclerosis: systematic review. *Arq. Bras. Cardiol.* 99, 857–865.  
<https://doi.org/10.1590/s0066-782x2012005000078>
- Godo, S., Shimokawa, H., 2017. Endothelial Functions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 37, e108–e114. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.117.309813>
- Gottlieb, D.J., Punjabi, N.M., Mehra, R., Patel, S.R., Quan, S.F., Babineau, D.C., Tracy, R.P., Rueschman, M., Blumenthal, R.S., Lewis, E.F., Bhatt, D.L., Redline, S., 2014. CPAP versus oxygen in obstructive sleep apnea. *N. Engl. J. Med.* 370, 2276–2285.  
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1306766>
- Grebe, M., Eisele, H.J., Weissmann, N., Schaefer, C., Tillmanns, H., Seeger, W., Schulz, R., 2006. Antioxidant vitamin C improves endothelial function in obstructive sleep apnea. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 173, 897–901. <https://doi.org/10.1164/rccm.200508-1223OC>
- Haas, D.C., Foster, G.L., Nieto, F.J., Redline, S., Resnick, H.E., Robbins, J.A., Young, T., Pickering, T.G., 2005. Age-dependent associations between sleep-disordered breathing and hypertension: importance of discriminating between systolic/diastolic hypertension and isolated systolic hypertension in the Sleep Heart Health Study. *Circulation* 111, 614–621.  
<https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000154540.62381.CF>
- Harris, T.A., Yamakuchi, M., Ferlito, M., Mendell, J.T., Lowenstein, C.J., 2008. MicroRNA-126 regulates endothelial expression of vascular cell adhesion molecule 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 1516–1521. <https://doi.org/10.1073/pnas.0707493105>
- Haute Autorité de Santé - Évaluation clinique et économique des dispositifs médicaux et prestations associées pour prise en charge du syndrome d'apnées hypopnées obstructives du sommeil (SAHOS) [WWW Document], n.d. URL [https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c\\_1761818/fr/evaluation-clinique-et-economique-des-dispositifs-medicaux-et-prestations-associees-pour-prise-en-charge-du-syndrome-d-apnees-hypopnees-obstructives-du-sommeil-sahos](https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_1761818/fr/evaluation-clinique-et-economique-des-dispositifs-medicaux-et-prestations-associees-pour-prise-en-charge-du-syndrome-d-apnees-hypopnees-obstructives-du-sommeil-sahos) (accessed 4.11.19).
- Hedner, J., Bengtsson-Boström, K., Peker, Y., Grote, L., Råstam, L., Lindblad, U., 2006. Hypertension prevalence in obstructive sleep apnoea and sex: a population-based case-control study. *Eur. Respir. J.* 27, 564–570. <https://doi.org/10.1183/09031936.06.00042105>
- Heinzer, R., Vat, S., Marques-Vidal, P., Marti-Soler, H., Andries, D., Tobback, N., Mooser, V., Preisig, M., Malhotra, A., Waeber, G., Vollenweider, P., Tafti, M., Haba-Rubio, J., 2015. Prevalence of sleep-disordered breathing in the general population: the HypnoLaus study. *Lancet Respir. Med.* 3, 310–318. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(15\)00043-0](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(15)00043-0)
- Heitmann, J., Greulich, T., Reinke, C., Koehler, U., Vogelmeier, C., Becker, H.F., Schmidt, A.C., Canisius, S., 2010. Comparison of the effects of nebivolol and valsartan on BP reduction and sleep apnoea activity in patients with essential hypertension and OSA. *Curr. Med. Res. Opin.* 26, 1925–1932. <https://doi.org/10.1185/03007995.2010.497326>
- Hoyos, C.M., Melehan, K.L., Liu, P.Y., Grunstein, R.R., Phillips, C.L., 2015. Does obstructive sleep apnea cause endothelial dysfunction? A critical review of the literature. *Sleep Med. Rev.* 20, 15–26. <https://doi.org/10.1016/j.smr.2014.06.003>
- Hung, M.-W., Kravtsov, G.M., Lau, C.-F., Poon, A.M.-S., Tipoe, G.L., Fung, M.-L., 2013. Melatonin ameliorates endothelial dysfunction, vascular inflammation, and systemic hypertension in rats with chronic intermittent hypoxia. *J. Pineal Res.* 55, 247–256.  
<https://doi.org/10.1111/jpi.12067>
- Itzhaki, S., Dorchin, H., Clark, G., Lavie, L., Lavie, P., Pillar, G., 2007. The effects of 1-year treatment with a Herbst mandibular advancement splint on obstructive sleep apnea, oxidative stress, and endothelial function. *Chest* 131, 740–749. <https://doi.org/10.1378/chest.06-0965>

- Jansen, F., Yang, X., Baumann, K., Przybilla, D., Schmitz, T., Flender, A., Paul, K., Alhousseiny, A., Nickenig, G., Werner, N., 2015. Endothelial microparticles reduce ICAM-1 expression in a microRNA-222-dependent mechanism. *J. Cell. Mol. Med.* 19, 2202–2214. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12607>
- Javaheri, Shahrokh, Barbe, F., Campos-Rodriguez, F., Dempsey, J.A., Khayat, R., Javaheri, Sogol, Malhotra, A., Martinez-Garcia, M.A., Mehra, R., Pack, A.I., Polotsky, V.Y., Redline, S., Somers, V.K., 2017a. Sleep Apnea: Types, Mechanisms, and Clinical Cardiovascular Consequences. *J. Am. Coll. Cardiol.* 69, 841–858. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2016.11.069>
- Javaheri, Shahrokh, Barbe, F., Campos-Rodriguez, F., Dempsey, J.A., Khayat, R., Javaheri, Sogol, Malhotra, A., Martinez-Garcia, M.A., Mehra, R., Pack, A.I., Polotsky, V.Y., Redline, S., Somers, V.K., 2017b. Sleep Apnea: Types, Mechanisms, and Clinical Cardiovascular Consequences. *J. Am. Coll. Cardiol.* 69, 841–858. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2016.11.069>
- Joannides, R., Bellien, J., Thuillez, C., 2006. Clinical methods for the evaluation of endothelial function-- a focus on resistance arteries. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 20, 311–320. <https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.2006.00406.x>
- Joannides, R., Haefeli, W.E., Linder, L., Richard, V., Bakkali, E.H., Thuillez, C., Lüscher, T.F., 1995. Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation* 91, 1314–1319. <https://doi.org/10.1161/01.cir.91.5.1314>
- Johns, M.W., 1991. A new method for measuring daytime sleepiness: the Epworth sleepiness scale. *Sleep* 14, 540–545.
- Jones, A., Vennelle, M., Connell, M., McKillop, G., Newby, D.E., Douglas, N.J., Riha, R.L., 2013. The effect of continuous positive airway pressure therapy on arterial stiffness and endothelial function in obstructive sleep apnea: a randomized controlled trial in patients without cardiovascular disease. *Sleep Med.* 14, 1260–1265. <https://doi.org/10.1016/j.sleep.2013.08.786>
- Joyeux-Faure, M., Baguet, J.-P., Barone-Rochette, G., Faure, P., Sosner, P., Mounier-Vehier, C., Lévy, P., Tamisier, R., Pépin, J.-L., 2018a. Continuous Positive Airway Pressure Reduces Night-Time Blood Pressure and Heart Rate in Patients With Obstructive Sleep Apnea and Resistant Hypertension: The RHOOSAS Randomized Controlled Trial. *Front. Neurol.* 9, 318. <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00318>
- Joyeux-Faure, M., Tamisier, R., Baguet, J.-P., Dias-Domingos, S., Perrig, S., Leftheriotis, G., Janssens, J.-P., Trzepizur, W., Launois, S.H., Stanke-Labesque, F., Lévy, P.A., Gagnadoux, F., Pepin, J.-L., 2014. Response to statin therapy in obstructive sleep apnea syndrome: a multicenter randomized controlled trial. *Mediators Inflamm.* 2014, 423120. <https://doi.org/10.1155/2014/423120>
- Joyeux-Faure, M., Tamisier, R., Borel, J.-C., Millasseau, S., Galerneau, L.-M., Destors, M., Bailly, S., Pepin, J.L., 2018b. Contribution of obstructive sleep apnoea to arterial stiffness: a meta-analysis using individual patient data. *Thorax* 73, 1146–1151. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2018-211513>
- Kapur, V.K., 2010. Obstructive sleep apnea: diagnosis, epidemiology, and economics. *Respir. Care* 55, 1155–1167.
- Kendzerska, T., Gershon, A.S., Hawker, G., Leung, R.S., Tomlinson, G., 2014a. Obstructive sleep apnea and risk of cardiovascular events and all-cause mortality: a decade-long historical cohort study. *PLoS Med.* 11, e1001599. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001599>
- Kendzerska, T., Gershon, A.S., Hawker, G., Leung, R.S., Tomlinson, G., 2014b. Obstructive sleep apnea and risk of cardiovascular events and all-cause mortality: a decade-long historical cohort study. *PLoS Med.* 11, e1001599. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001599>
- Kendzerska, T., Leung, R.S., Hawker, G., Tomlinson, G., Gershon, A.S., 2014c. Obstructive sleep apnea and the prevalence and incidence of cancer. *CMAJ Can. Med. Assoc. J. J. Assoc. Medicale Can.* 186, 985–992. <https://doi.org/10.1503/cmaj.140238>

- Khalyfa, A., Gozal, D., 2018. Connexins and Atrial Fibrillation in Obstructive Sleep Apnea. *Curr. Sleep Med. Rep.* 4, 300–311. <https://doi.org/10.1007/s40675-018-0130-7>
- Khalyfa, A., Kheirandish-Gozal, L., Khalyfa, A.A., Philby, M.F., Alonso-Álvarez, M.L., Mohammadi, M., Bhattacharjee, R., Terán-Santos, J., Huang, L., Andrade, J., Gozal, D., 2016. Circulating Plasma Extracellular Microvesicle MicroRNA Cargo and Endothelial Dysfunction in Children with Obstructive Sleep Apnea. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 194, 1116–1126. <https://doi.org/10.1164/rccm.201602-0323OC>
- Khan, S.U., Duran, C.A., Rahman, H., Lekkala, M., Saleem, M.A., Kaluski, E., 2018. A meta-analysis of continuous positive airway pressure therapy in prevention of cardiovascular events in patients with obstructive sleep apnoea. *Eur. Heart J.* 39, 2291–2297. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehx597>
- Khayat, R.N., Varadharaj, S., Porter, K., Sow, A., Jarjoura, D., Gavrilin, M.A., Zweier, J.L., 2018. Angiotensin Receptor Expression and Vascular Endothelial Dysfunction in Obstructive Sleep Apnea. *Am. J. Hypertens.* 31, 355–361. <https://doi.org/10.1093/ajh/hpx174>
- Kim, C.W., Kumar, S., Son, D.J., Jang, I.-H., Griendling, K.K., Jo, H., 2014. Prevention of abdominal aortic aneurysm by anti-microRNA-712 or anti-microRNA-205 in angiotensin II-infused mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 34, 1412–1421. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.113.303134>
- Kosaka, N., Iguchi, H., Ochiya, T., 2010. Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Sci.* 101, 2087–2092. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2010.01650.x>
- Kraiczi, H., Hedner, J., Peker, Y., Grote, L., 2000. Comparison of atenolol, amlodipine, enalapril, hydrochlorothiazide, and losartan for antihypertensive treatment in patients with obstructive sleep apnea. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 161, 1423–1428. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.161.5.9909024>
- Krause, B.J., Casanello, P., Dias, A.C., Arias, P., Velarde, V., Arenas, G.A., Preite, M.D., Iturriaga, R., 2018. Chronic Intermittent Hypoxia-Induced Vascular Dysfunction in Rats is Reverted by N-Acetylcysteine Supplementation and Arginase Inhibition. *Front. Physiol.* 9, 901. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00901>
- Kyotani, Y., Takasawa, S., Yoshizumi, M., 2019. Proliferative Pathways of Vascular Smooth Muscle Cells in Response to Intermittent Hypoxia. *Int. J. Mol. Sci.* 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20112706>
- La fonction endothéliale : rôle, méthodes d'évaluation et limites - EM|consulte [WWW Document], n.d. URL <https://www.em-consulte.com/en/article/869527> (accessed 7.29.19).
- Lacedonia, D., Scioscia, G., Pia Palladino, G., Gallo, C., Carpagnano, G.E., Sabato, R., Foschino Barbaro, M.P., 2018. MicroRNA expression profile during different conditions of hypoxia. *Oncotarget* 9, 35114–35122. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.26210>
- Laffont, B., Rayner, K.J., 2017. MicroRNAs in the pathobiology of atherosclerosis. *Can. J. Cardiol.* 33, 313–324. <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2017.01.001>
- Lam, J.C.M., Lai, A.Y.K., Tam, T.C.C., Yuen, M.M.A., Lam, K.S.L., Ip, M.S.M., 2017. CPAP therapy for patients with sleep apnea and type 2 diabetes mellitus improves control of blood pressure. *Sleep Breath. Schlaf Atm.* 21, 377–386. <https://doi.org/10.1007/s11325-016-1428-7>
- Lei, Q., Lv, Y., Li, K., Ma, L., Du, G., Xiang, Y., Li, X., 2017. Effects of continuous positive airway pressure on blood pressure in patients with resistant hypertension and obstructive sleep apnea: a systematic review and meta-analysis of six randomized controlled trials. *J. Bras. Pneumol. Publicacao Of. Soc. Bras. Pneumol. E Tisiologia* 43, 373–379. <https://doi.org/10.1590/S1806-37562016000000190>
- Li, H., Yang, B.B., 2013. Friend or foe: the role of microRNA in chemotherapy resistance. *Acta Pharmacol. Sin.* 34, 870–879. <https://doi.org/10.1038/aps.2013.35>

- Li, K., Chen, Z., Qin, Y., Wei, Y., 2018. MiR-664a-3p expression in patients with obstructive sleep apnea: A potential marker of atherosclerosis. *Medicine (Baltimore)* 97, e9813. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000009813>
- Li, K., Wei, P., Qin, Y., Wei, Y., 2017. MicroRNA expression profiling and bioinformatics analysis of dysregulated microRNAs in obstructive sleep apnea patients. *Medicine (Baltimore)* 96, e7917. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000007917>
- Lian, B.Q., Keane, J.F., 2010. Predicting ischemic heart disease in women: the value of endothelial function. *J. Am. Coll. Cardiol.* 55, 1697–1699. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2009.10.074>
- Lin, Y.-S., Liu, P.-H., Chu, P.-H., 2017. Obstructive Sleep Apnea Independently Increases the Incidence of Heart Failure and Major Adverse Cardiac Events: A Retrospective Population-Based Follow-Up Study. *Acta Cardiol. Sin.* 33, 656–663. <https://doi.org/10.6515/ACS20170825A>
- Linz, D., Arzt, M., 2015. [Sleep-disordered breathing and cardiac disease]. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 140, 1272–1277. <https://doi.org/10.1055/s-0041-102916>
- Liu, D., Zhang, X.-L., Yan, C.-H., Li, Y., Tian, X.-X., Zhu, N., Rong, J.-J., Peng, C.-F., Han, Y.-L., 2015. MicroRNA-495 regulates the proliferation and apoptosis of human umbilical vein endothelial cells by targeting chemokine CCL2. *Thromb. Res.* 135, 146–154. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2014.10.027>
- Logan, A.G., Perlikowski, S.M., Mente, A., Tisler, A., Tkacova, R., Niroumand, M., Leung, R.S., Bradley, T.D., 2001. High prevalence of unrecognized sleep apnoea in drug-resistant hypertension. *J. Hypertens.* 19, 2271–2277.
- Loscalzo, J., 2010. The cellular response to hypoxia: tuning the system with microRNAs. *J. Clin. Invest.* 120, 3815–3817. <https://doi.org/10.1172/JCI45105>
- Lüdemann, P., Dziewas, R., Sörös, P., Happe, S., Frese, A., 2001. Axonal polyneuropathy in obstructive sleep apnoea. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 70, 685–687. <https://doi.org/10.1136/jnnp.70.5.685>
- Mahé, G., Humeau-Heurtier, A., Durand, S., Leftheriotis, G., Abraham, P., 2012. Assessment of skin microvascular function and dysfunction with laser speckle contrast imaging. *Circ. Cardiovasc. Imaging* 5, 155–163. <https://doi.org/10.1161/CIRCIMAGING.111.970418>
- Mallocci, M., Perdomo, L., Veerasamy, M., Andriantsitohaina, R., Simard, G., Martínez, M.C., 2019. Extracellular Vesicles: Mechanisms in Human Health and Disease. *Antioxid. Redox Signal.* 30, 813–856. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7265>
- Martínez-García, M.-A., Capote, F., Campos-Rodríguez, F., Lloberes, P., Díaz de Atauri, M.J., Somoza, M., Masa, J.F., González, M., Sacristán, L., Barbé, F., Durán-Cantolla, J., Aizpuru, F., Mañas, E., Barreiro, B., Mosteiro, M., Cebrián, J.J., de la Peña, M., García-Río, F., Maimó, A., Zapater, J., Hernández, C., Grau SanMartí, N., Montserrat, J.M., Spanish Sleep Network, 2013. Effect of CPAP on blood pressure in patients with obstructive sleep apnea and resistant hypertension: the HIPARCO randomized clinical trial. *JAMA* 310, 2407–2415. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.281250>
- Matsuzawa, Y., Kwon, T.-G., Lennon, R.J., Lerman, L.O., Lerman, A., 2015. Prognostic Value of Flow-Mediated Vasodilation in Brachial Artery and Fingertip Artery for Cardiovascular Events: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Am. Heart Assoc.* 4. <https://doi.org/10.1161/JAHA.115.002270>
- Mause, S.F., Weber, C., 2010. Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange. *Circ. Res.* 107, 1047–1057. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.226456>
- McEvoy, R.D., Antic, N.A., Heeley, E., Luo, Y., Ou, Q., Zhang, X., Mediano, O., Chen, R., Drager, L.F., Liu, Z., Chen, G., Du, B., McArdle, N., Mukherjee, S., Tripathi, M., Billot, L., Li, Q., Lorenzi-Filho, G., Barbe, F., Redline, S., Wang, J., Arima, H., Neal, B., White, D.P., Grunstein, R.R., Zhong, N., Anderson, C.S., SAVE Investigators and Coordinators, 2016. CPAP for Prevention of

- Cardiovascular Events in Obstructive Sleep Apnea. *N. Engl. J. Med.* 375, 919–931. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1606599>
- McKee, Z., Auckley, D.H., 2019. A sleeping beast: Obstructive sleep apnea and stroke. *Cleve. Clin. J. Med.* 86, 407–415. <https://doi.org/10.3949/ccjm.86a.18033>
- Meng, S., Cao, J., Wang, L., Zhou, Q., Li, Y., Shen, C., Zhang, X., Wang, C., 2012. MicroRNA 107 partly inhibits endothelial progenitor cells differentiation via HIF-1 $\beta$ . *PLoS One* 7, e40323. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040323>
- Milleron, O., Pilière, R., Foucher, A., de Roquefeuil, F., Aegerter, P., Jondeau, G., Raffestin, B.G., Dubourg, O., 2004. Benefits of obstructive sleep apnoea treatment in coronary artery disease: a long-term follow-up study. *Eur. Heart J.* 25, 728–734. <https://doi.org/10.1016/j.ehj.2004.02.008>
- Modena, M.G., Bonetti, L., Coppi, F., Bursi, F., Rossi, R., 2002. Prognostic role of reversible endothelial dysfunction in hypertensive postmenopausal women. *J. Am. Coll. Cardiol.* 40, 505–510.
- Mohammad, Y., Almutlaq, A., Al-Ruwaita, A., Aldrees, A., Alsubaie, A., Al-Hussain, F., 2019. Stroke during sleep and obstructive sleep apnea: there is a link. *Neurol. Sci. Off. J. Ital. Neurol. Soc. Ital. Soc. Clin. Neurophysiol.* 40, 1001–1005. <https://doi.org/10.1007/s10072-019-03753-2>
- Muñoz-Hernandez, R., Vallejo-Vaz, A.J., Sanchez Armengol, A., Moreno-Luna, R., Caballero-Eraso, C., Macher, H.C., Villar, J., Merino, A.M., Castell, J., Capote, F., Stiefel, P., 2015. Obstructive sleep apnoea syndrome, endothelial function and markers of endothelialization. Changes after CPAP. *PLoS One* 10, e0122091. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122091>
- Njock, M.-S., Cheng, H.S., Dang, L.T., Nazari-Jahantigh, M., Lau, A.C., Boudreau, E., Roufaiel, M., Cybulsky, M.I., Schober, A., Fish, J.E., 2015. Endothelial cells suppress monocyte activation through secretion of extracellular vesicles containing antiinflammatory microRNAs. *Blood* 125, 3202–3212. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-11-611046>
- Pamidi, S., Aronsohn, R.S., Tasali, E., 2010. Obstructive sleep apnea: role in the risk and severity of diabetes. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 24, 703–715. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2010.08.009>
- Pamidi, S., Tasali, E., 2012. Obstructive sleep apnea and type 2 diabetes: is there a link? *Front. Neurol.* 3, 126. <https://doi.org/10.3389/fneur.2012.00126>
- Paneni, F., Beckman, J.A., Creager, M.A., Cosentino, F., 2013. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part I. *Eur. Heart J.* 34, 2436–2443. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/eh149>
- Peker, Y., Glantz, H., Eulenburg, C., Wegscheider, K., Herlitz, J., Thunström, E., 2016. 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.* 194, 613–620. <https://doi.org/10.1164/rccm.201601-0088OC>
- Peppard, P.E., Young, T., Palta, M., Skatrud, J., 2000. Prospective study of the association between sleep-disordered breathing and hypertension. *N. Engl. J. Med.* 342, 1378–1384. <https://doi.org/10.1056/NEJM200005113421901>
- Phillips, C.L., Grunstein, R.R., Darendeliler, M.A., Mihailidou, A.S., Srinivasan, V.K., Yee, B.J., Marks, G.B., Cistulli, P.A., 2013. Health outcomes of continuous positive airway pressure versus oral appliance treatment for obstructive sleep apnea: a randomized controlled trial. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 187, 879–887. <https://doi.org/10.1164/rccm.201212-2223OC>
- Porto, F., Sakamoto, Y.S., Salles, C., 2017. Association between Obstructive Sleep Apnea and Myocardial Infarction: A Systematic Review. *Arq. Bras. Cardiol.* 108, 361–369. <https://doi.org/10.5935/abc.20170031>
- Priou, P., Gagnadoux, F., Tesse, A., Mastronardi, M.L., Agouni, A., Meslier, N., Racineux, J.-L., Martinez, M.C., Trzepizur, W., Andriantsitohaina, R., 2010. Endothelial dysfunction and

- circulating microparticles from patients with obstructive sleep apnea. *Am. J. Pathol.* 177, 974–983. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.091252>
- Randby, A., Namtvedt, S.K., Hrubos-Strøm, H., Einvik, G., Somers, V.K., Omland, T., 2013. Sex-Dependent Impact of OSA on Digital Vascular Function. *Chest* 144, 915–922. <https://doi.org/10.1378/chest.12-2283>
- Rane, S., He, M., Sayed, D., Vashistha, H., Malhotra, A., Sadoshima, J., Vatner, D.E., Vatner, S.F., Abdellatif, M., 2009. Downregulation of miR-199a derepresses hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and Sirtuin 1 and recapitulates hypoxia preconditioning in cardiac myocytes. *Circ. Res.* 104, 879–886. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.193102>
- Raposo, G., Stoorvogel, W., 2013. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J. Cell Biol.* 200, 373–383. <https://doi.org/10.1083/jcb.201211138>
- Ravesloot, M.J.L., White, D., Heinzer, R., Oksenberg, A., Pépin, J.-L., 2017. Efficacy of the New Generation of Devices for Positional Therapy for Patients With Positional Obstructive Sleep Apnea: A Systematic Review of the Literature and Meta-Analysis. *J. Clin. Sleep Med. JCSM Off. Publ. Am. Acad. Sleep Med.* 13, 813–824. <https://doi.org/10.5664/jcsm.6622>
- Redline, S., Yenokyan, G., Gottlieb, D.J., Shahar, E., O'Connor, G.T., Resnick, H.E., Diener-West, M., Sanders, M.H., Wolf, P.A., Geraghty, E.M., Ali, T., Lebowitz, M., Punjabi, N.M., 2010. Obstructive sleep apnea-hypopnea and incident stroke: the sleep heart health study. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 182, 269–277. <https://doi.org/10.1164/rccm.200911-1746OC>
- Riley, R.D., Lambert, P.C., Abo-Zaid, G., 2010. Meta-analysis of individual participant data: rationale, conduct, and reporting. *BMJ* 340, c221. <https://doi.org/10.1136/bmj.c221>
- Rooij, E. van, Olson, E.N., 2007. MicroRNAs: powerful new regulators of heart disease and provocative therapeutic targets. *J. Clin. Invest.* 117, 2369–2376. <https://doi.org/10.1172/JCI33099>
- Roos, W.P., Kaina, B., 2013. DNA damage-induced cell death: from specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis. *Cancer Lett.* 332, 237–248. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.01.007>
- Roure, N., Gomez, S., Mediano, O., Duran, J., Peña, M. de la, Capote, F., Teran, J., Masa, J.F., Alonso, M.L., Corral, J., Sánchez-Armengod, A., Martínez, C., Barceló, A., Gozal, D., Marín, J.M., Barbé, F., 2008. Daytime sleepiness and polysomnography in obstructive sleep apnea patients. *Sleep Med.* 9, 727–731. <https://doi.org/10.1016/j.sleep.2008.02.006>
- Sánchez-de-la-Torre, M., Khalyfa, A., Sánchez-de-la-Torre, A., Martínez-Alonso, M., Martínez-García, M.Á., Barceló, A., Lloberes, P., Campos-Rodríguez, F., Capote, F., Diaz-de-Atauri, M.J., Somoza, M., González, M., Masa, J.-F., Gozal, D., Barbé, F., 2015. Precision Medicine in Patients With Resistant Hypertension and Obstructive Sleep Apnea: Blood Pressure Response to Continuous Positive Airway Pressure Treatment. *J. Am. Coll. Cardiol.* 66, 1023–1032. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2015.06.1315>
- Schnabel, R.B., Wild, P.S., Schulz, A., Zeller, T., Sinning, C.R., Wilde, S., Kunde, J., Lubos, E., Lackner, K.J., Warnholtz, A., Gori, T., Blankenberg, S., Munzel, T., Gutenberg Health Study Investigators, 2012. Multiple endothelial biomarkers and noninvasive vascular function in the general population: the Gutenberg Health Study. *Hypertens. Dallas Tex* 1979 60, 288–295. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.112.191874>
- Schober, A., Nazari-Jahantigh, M., Wei, Y., Bidzhekov, K., Gremse, F., Grommes, J., Megens, R.T.A., Heyll, K., Noels, H., Hristov, M., Wang, S., Kiessling, F., Olson, E.N., Weber, C., 2014. MicroRNA-126-5p promotes endothelial proliferation and limits atherosclerosis by suppressing Dlk1. *Nat. Med.* 20, 368–376. <https://doi.org/10.1038/nm.3487>
- Schwartz, A.R., Bennett, M.L., Smith, P.L., De Backer, W., Hedner, J., Boudewyns, A., Van de Heyning, P., Ejjnell, H., Hochban, W., Knaack, L., Podszus, T., Penzel, T., Peter, J.H., Goding, G.S., Erickson, D.J., Testerman, R., Ottenhoff, F., Eisele, D.W., 2001. Therapeutic electrical

- stimulation of the hypoglossal nerve in obstructive sleep apnea. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 127, 1216–1223.
- Schwarz, E.I., Puhon, M.A., Schlatzer, C., Stradling, J.R., Kohler, M., 2015. Effect of CPAP therapy on endothelial function in obstructive sleep apnoea: A systematic review and meta-analysis. *Respirol. Carlton Vic* 20, 889–895. <https://doi.org/10.1111/resp.12573>
- Schwarzenbach, H., Silva, A.M. da, Calin, G., Pantel, K., 2015. Data Normalization Strategies for MicroRNA Quantification. *Clin. Chem.* 61, 1333–1342. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2015.239459>
- Simpson, P.J.L., Hoyos, C.M., Celermajer, D., Liu, P.Y., Ng, M.K.C., 2013. Effects of continuous positive airway pressure on endothelial function and circulating progenitor cells in obstructive sleep apnoea: a randomised sham-controlled study. *Int. J. Cardiol.* 168, 2042–2048. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2013.01.166>
- Sinauridze, E.I., Kireev, D.A., Popenko, N.Y., Pichugin, A.V., Panteleev, M.A., Krymskaya, O.V., Ataulakhanov, F.I., 2007. Platelet microparticle membranes have 50- to 100-fold higher specific procoagulant activity than activated platelets. *Thromb. Haemost.* 97, 425–434.
- Steven, S., Münzel, T., Daiber, A., 2015. Exploiting the Pleiotropic Antioxidant Effects of Established Drugs in Cardiovascular Disease. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 18185–18223. <https://doi.org/10.3390/ijms160818185>
- Stiefel, P., Sánchez-Armengol, M.A., Villar, J., Vallejo-Vaz, A., Moreno-Luna, R., Capote, F., 2013. Obstructive sleep apnea syndrome, vascular pathology, endothelial function and endothelial cells and circulating microparticles. *Arch. Med. Res.* 44, 409–414. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2013.08.005>
- Suárez, Y., Wang, C., Manes, T.D., Pober, J.S., 2010. Cutting edge: TNF-induced microRNAs regulate TNF-induced expression of E-selectin and intercellular adhesion molecule-1 on human endothelial cells: feedback control of inflammation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 184, 21–25. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902369>
- Suessenbacher, A., Dörler, J., Wunder, J., Hohenwarter, F., Alber, H.F., Pachinger, O., Frick, M., 2013. Comparison of brachial artery wall thickness versus endothelial function to predict late cardiovascular events in patients undergoing elective coronary angiography. *Am. J. Cardiol.* 111, 671–675. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2012.11.020>
- Sun, H., Zhang, H., Li, K., Wu, H., Zhan, X., Fang, F., Qin, Y., Wei, Y., 2019. ESM-1 promotes adhesion between monocytes and endothelial cells under intermittent hypoxia. *J. Cell. Physiol.* 234, 1512–1521. <https://doi.org/10.1002/jcp.27016>
- Sverrisdóttir, Y.B., Jansson, L.M., Hägg, U., Gan, L.-M., 2010. Muscle sympathetic nerve activity is related to a surrogate marker of endothelial function in healthy individuals. *PLoS One* 5, e9257. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009257>
- Taranto Montemurro, L., Floras, J.S., Millar, P.J., Kasai, T., Gabriel, J.M., Spaak, J., Coelho, F.M.S., Bradley, T.D., 2012. Inverse relationship of subjective daytime sleepiness to sympathetic activity in patients with heart failure and obstructive sleep apnea. *Chest* 142, 1222–1228. <https://doi.org/10.1378/chest.11-2963>
- Tooke, J.E., Hannemann, M.M., 2000. Adverse endothelial function and the insulin resistance syndrome. *J. Intern. Med.* 247, 425–431.
- Toraldo, D.M., Benedetto, M.D., Conte, L., De Nuccio, F., 2017. Statins May Prevent Atherosclerotic Disease in OSA Patients without Co-Morbidities? *Curr. Vasc. Pharmacol.* 15, 5–9.
- Torres, G., Sánchez-de-la-Torre, M., Barbé, F., 2015. Relationship Between OSA and Hypertension. *Chest* 148, 824–832. <https://doi.org/10.1378/chest.15-0136>
- Totoson, P., Fhayli, W., Faury, G., Korichneva, I., Cachot, S., Baldazza, M., Ribuot, C., Pépin, J.-L., Lévy, P., Joyeux-Faure, M., 2013. Atorvastatin protects against deleterious cardiovascular consequences induced by chronic intermittent hypoxia. *Exp. Biol. Med.* Maywood NJ 238, 223–232. <https://doi.org/10.1177/1535370212473696>



- Trzepizur, W., Bironneau, V., Recoquillon, S., Priou, P., Meslier, N., Hamel, J.-F., Henni, S., Darsonval, A., Messaoudi, K., Martínez, M.C., Andriantsitohaina, R., Gagnadoux, F., 2018. Polyphenols Have No Impact on Endothelial Function in Patients with Obstructive Sleep Apnea: A Randomized Controlled Trial. *J. Nutr.* 148, 581–586. <https://doi.org/10.1093/jn/nxy005>
- Trzepizur, W., Gagnadoux, F., 2014. [Epidemiology of obstructive sleep apnoea syndrome]. *Rev. Mal. Respir.* 31, 568–577. <https://doi.org/10.1016/j.rmr.2014.01.013>
- Trzepizur, W., Martinez, M.C., Priou, P., Andriantsitohaina, R., Gagnadoux, F., 2014. Microparticles and vascular dysfunction in obstructive sleep apnoea. *Eur. Respir. J.* 44, 207–216. <https://doi.org/10.1183/09031936.00197413>
- Trzepizur, W., Priou, P., Paris, A., Nardi, J., Tual-Chalot, S., Meslier, N., Urban, T., Andriantsitohaina, R., Martinez, M.C., Gagnadoux, F., 2011. Nocturnal release of leukocyte-derived microparticles in males with obstructive sleep apnoea. *Eur. Respir. J.* 37, 1293–1295. <https://doi.org/10.1183/09031936.00150010>
- Tual-Chalot, S., Fatoumata, K., Priou, P., Trzepizur, W., Gaceb, A., Contreras, C., Prieto, D., Martinez, M.C., Gagnadoux, F., Andriantsitohaina, R., 2012. Circulating microparticles from patients with obstructive sleep apnea enhance vascular contraction: mandatory role of the endothelium. *Am. J. Pathol.* 181, 1473–1482. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.06.020>
- Tual-Chalot, S., Gagnadoux, F., Trzepizur, W., Priou, P., Andriantsitohaina, R., Martinez, M.C., 2014. Circulating microparticles from obstructive sleep apnea syndrome patients induce endothelin-mediated angiogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1842, 202–207. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.11.017>
- Tulmaç, M., Tireli, E., Ebinç, H., Şimşek, V., Doğru, M.T., Yıldırım, N., Kısa, Ü., Ekici, M.S., 2012. Effect of overnight nasal continuous positive airway pressure treatment on the endothelial function in patients with obstructive sleep apnea. *Anadolu Kardiyol. Derg. AKD Anatol. J. Cardiol.* 12, 560–565. <https://doi.org/10.5152/akd.2012.181>
- Turnbull, C.D., Rossi, V.A., Santer, P., Schwarz, E.I., Stradling, J.R., Petousi, N., Kohler, M., 2017. Effect of OSA on hypoxic and inflammatory markers during CPAP withdrawal: Further evidence from three randomized control trials. *Respirol. Carlton Vic* 22, 793–799. <https://doi.org/10.1111/resp.12946>
- Tuttolomondo, A., Casuccio, A., Della Corte, V., Maida, C., Pecoraro, R., Di Raimondo, D., Vassallo, V., Simonetta, I., Arnao, V., Pinto, A., 2017. Endothelial function and arterial stiffness indexes in subjects with acute ischemic stroke: Relationship with TOAST subtype. *Atherosclerosis* 256, 94–99. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.10.044>
- Umut Somuncu, M., Bulut, U., Karakurt, H., Utkusavas, A., Akbay, E., Kartal Kilinc, F., 2019. The Relationship Between Obstructive Sleep Apnea and Coronary Plaque: A Coronary Computed Tomographic Angiography Study. *Acta Cardiol. Sin.* 35, 325–334. [https://doi.org/10.6515/ACS.201905\\_35\(3\).20181029A](https://doi.org/10.6515/ACS.201905_35(3).20181029A)
- Vanhoutte, P.M., Shimokawa, H., Feletou, M., Tang, E.H.C., 2017. Endothelial dysfunction and vascular disease - a 30th anniversary update. *Acta Physiol. Oxf. Engl.* 219, 22–96. <https://doi.org/10.1111/apha.12646>
- Wagschal, A., Najafi-Shoushtari, S.H., Wang, L., Goedeke, L., Sinha, S., deLemos, A.S., Black, J.C., Ramírez, C.M., Li, Y., Tewhey, R., Hatoum, I., Shah, N., Lu, Y., Kristo, F., Psychogios, N., Vrbanc, V., Lu, Y.-C., Hla, T., de Cabo, R., Tsang, J.S., Schadt, E., Sabeti, P.C., Kathiresan, S., Cohen, D.E., Whetstone, J., Chung, R.T., Fernández-Hernando, C., Kaplan, L.M., Bernards, A., Gerszten, R.E., Näär, A.M., 2015. Genome-wide identification of microRNAs regulating cholesterol and triglyceride homeostasis. *Nat. Med.* 21, 1290–1297. <https://doi.org/10.1038/nm.3980>
- Wang, J., Chen, S., Ma, X., Cheng, C., Xiao, X., Chen, J., Liu, S., Zhao, B., Chen, Y., 2013. Effects of endothelial progenitor cell-derived microvesicles on hypoxia/reoxygenation-induced

- endothelial dysfunction and apoptosis. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2013, 572729.  
<https://doi.org/10.1155/2013/572729>
- Wang, J., Yu, W., Gao, M., Zhang, F., Gu, C., Yu, Y., Wei, Y., 2015. Impact of Obstructive Sleep Apnea Syndrome on Endothelial Function, Arterial Stiffening, and Serum Inflammatory Markers: An Updated Meta-analysis and Metaregression of 18 Studies. *J. Am. Heart Assoc.* 4.  
<https://doi.org/10.1161/JAHA.115.002454>
- Wei, Y., Schober, A., 2016. MicroRNA regulation of macrophages in human pathologies. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 73, 3473–3495. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2254-6>
- Wethal, T., Nedregaard, B., Andersen, R., Fosså, A., Lund, M.B., Günther, A., Kvaløy, S., Fosså, S.D., Kjekshus, J., 2014. Atherosclerotic lesions in lymphoma survivors treated with radiotherapy. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* 110, 448–454.  
<https://doi.org/10.1016/j.radonc.2013.10.029>
- Wightman, J.D., Heuberger, R.A., 2015. Effect of grape and other berries on cardiovascular health. *J. Sci. Food Agric.* 95, 1584–1597. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6890>
- Wu, W., Xiao, H., Laguna-Fernandez, A., Villarreal, G., Wang, K.-C., Geary, G.G., Zhang, Y., Wang, W.-C., Huang, H.-D., Zhou, J., Li, Y.-S., Chien, S., Garcia-Cardena, G., Shyy, J.Y.-J., 2011. Flow-Dependent Regulation of Kruppel-Like Factor 2 Is Mediated by MicroRNA-92a. *Circulation* 124, 633–641. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.005108>
- Xu, H., Wang, Y., Guan, J., Yi, H., Yin, S., 2015. Effect of CPAP on Endothelial Function in Subjects With Obstructive Sleep Apnea: A Meta-Analysis. *Respir. Care* 60, 749–755.  
<https://doi.org/10.4187/respcare.03739>
- Xu, P.H., Hui, C.K.M., Lui, M.M.S., Lam, D.C.L., Fong, D.Y.T., Ip, M.S.M., 2019. Incident Type 2 Diabetes in OSA and Effect of CPAP Treatment: A Retrospective Clinic Cohort Study. *Chest.*  
<https://doi.org/10.1016/j.chest.2019.04.130>
- Yamakuchi, M., Lotterman, C.D., Bao, C., Hruban, R.H., Karim, B., Mendell, J.T., Huso, D., Lowenstein, C.J., 2010. P53-induced microRNA-107 inhibits HIF-1 and tumor angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 6334–6339. <https://doi.org/10.1073/pnas.0911082107>
- Yáñez-Mó, M., Siljander, P.R.-M., Andreu, Z., Zavec, A.B., Borràs, F.E., Buzas, E.I., Buzas, K., Casal, E., Cappello, F., Carvalho, J., Colás, E., Cordeiro-da Silva, A., Fais, S., Falcon-Perez, J.M., Ghobrial, I.M., Giebel, B., Gimona, M., Graner, M., Gursel, I., Gursel, M., Heegaard, N.H.H., Hendrix, A., Kierulf, P., Kokubun, K., Kosanovic, M., Kralj-Iglic, V., Krämer-Albers, E.-M., Laitinen, S., Lässer, C., Lener, T., Ligeti, E., Linē, A., Lipps, G., Llorente, A., Lötvall, J., Manček-Keber, M., Marcilla, A., Mittelbrunn, M., Nazarenko, I., Nolte-'t Hoen, E.N.M., Nyman, T.A., O'Driscoll, L., Olivan, M., Oliveira, C., Pállinger, É., Del Portillo, H.A., Reventós, J., Rigau, M., Rohde, E., Sammar, M., Sánchez-Madrid, F., Santarém, N., Schallmoser, K., Ostenfeld, M.S., Stoorvogel, W., Stukelj, R., Van der Grein, S.G., Vasconcelos, M.H., Wauben, M.H.M., De Wever, O., 2015. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J. Extracell. Vesicles* 4, 27066. <https://doi.org/10.3402/jev.v4.27066>
- Yang, R., Sikka, G., Larson, J., Watts, V.L., Niu, X., Ellis, C.L., Miller, K.L., Camara, A., Reinke, C., Savransky, V., Polotsky, V.Y., O'Donnell, C.P., Berkowitz, D.E., Barouch, L.A., 2011. Restoring leptin signaling reduces hyperlipidemia and improves vascular stiffness induced by chronic intermittent hypoxia. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 300, H1467-1476.  
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00604.2009>
- Yang, W.-I., Park, S., Youn, J.-C., Son, N.H., Lee, S.-H., Kang, S.-M., Jang, Y., 2011. Augmentation index association with reactive hyperemia as assessed by peripheral arterial tonometry in hypertension. *Am. J. Hypertens.* 24, 1234–1238. <https://doi.org/10.1038/ajh.2011.132>
- Yoshida, T., Kuwabara, M., Hoshida, S., Kario, K., 2016. Recurrence of stroke caused by nocturnal hypoxia-induced blood pressure surge in a young adult male with severe obstructive sleep apnea syndrome. *J. Am. Soc. Hypertens. JASH* 10, 201–204.  
<https://doi.org/10.1016/j.jash.2016.01.013>

- Yu, C., Liu, Y., Sun, L., Wang, D., Wang, Y., Zhao, S., Dai, H., Zhao, J., Zhang, S., Li, M., Han, Y., Lu, S., Dong, X., Liu, G., Yu, S., Li, Y., 2017. Chronic obstructive sleep apnea promotes aortic remodeling in canines through miR-145/Smad3 signaling pathway. *Oncotarget* 8, 37705–37716. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17144>
- Yu, J., Zhou, Z., McEvoy, R.D., Anderson, C.S., Rodgers, A., Perkovic, V., Neal, B., 2017. Association of Positive Airway Pressure With Cardiovascular Events and Death in Adults With Sleep Apnea: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA* 318, 156–166. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.7967>
- Zaborowski, M.P., Balaj, L., Breakefield, X.O., Lai, C.P., 2015. Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study. *Bioscience* 65, 783–797. <https://doi.org/10.1093/biosci/biv084>
- Zeiger, A.M., Drexler, H., Wollschläger, H., Just, H., 1991. Modulation of coronary vasomotor tone in humans. Progressive endothelial dysfunction with different early stages of coronary atherosclerosis. *Circulation* 83, 391–401. <https://doi.org/10.1161/01.cir.83.2.391>
- Ziegler, M.G., Milic, M., Elayan, H., 2011. Cardiovascular Regulation in Obstructive Sleep Apnea. *Drug Discov. Today Dis. Models* 8, 155–160. <https://doi.org/10.1016/j.ddmod.2011.03.003>

**Figure legends:**

**Figure 1:** Flow diagram of subjects during the study.

Abbreviations: PAT, peripheral arterial; RP, respiratory polygraphy; PSG, polysomnography; OSA, obstructive sleep apnoea

**Figure 2:** Adjusted odds ratio (OR), for endothelial function according to categories of obstructive sleep apnoea (OSA) severity.

OR were adjusted for age, gender, diastolic blood pressure, presence of obesity and diabetes

Abbreviations: CI, confidence interval

**Figure 3:** Subgroup analysis of the association between severe OSA (versus no OSA) and endothelial function

Covariates included age, gender, diastolic blood pressure, presence of obesity and diabetes.

For each subgroup, the corresponding covariate was excluded from the model.

**Figure 4:** Adjusted mean values of Ln-RHI according to indices of nocturnal hypoxemia.

Abbreviations: T90, sleep time with oxygen saturation < 90%; SaO<sub>2</sub>, oxygen saturation

Mean values of Ln-RHI were adjusted for age, gender, diastolic blood pressure, presence of obesity and diabetes

**Table 1:** Characteristics of the study population according to categories of obstructive sleep apnoea severity

	All	No OSA	Mild-to-moderate OSA	Severe OSA	p value
n	730	67	276	387	-
Age, years	54.3 (11.6)	46.8 (12.3)	54.8 (11.8)	55.3 (11.0)	<0.0001
Females, %	20.1	32.8	23.9	15.3	0.0006
BMI, kg/m <sup>2</sup>	28.7 (5.9)	26.9 (6.4)	27.9 (5.7)	29.6 (5.8)	<0.0001
Obesity, %	30.4	25.4	21.7	37.5	<0.0001
SBP, mmHg	130.5 (16.0)	124.7 (15.0)	131.2 (15.4)	131.0 (16.4)	0.0072
DBP, mmHg	78.1 (11.6)	73.4 (13.8)	77.2 (10.6)	79.5 (11.7)	<0.0001
Hypertension, %	38.6	25.4	32.6	45.2	0.0003
Diabetes, %	15.5	18.2	17.5	13.6	0.3243
Dyslipidaemia	20.5	17.7	21.2	20.4	0.8280
Non-smokers, %	48.1	50.8	47.3	48.2	0.8750
Epworth score	9.3 (4.8)	8.2 (4.5)	9.0 (5.0)	9.8 (4.6)	0.0209
EDS, %	40.4	29.0	38.2	44.3	0.0556
T90, min	32.9 (65.4)	14.3 (54.6)	22.5 (56.9)	45.1 (71.4)	<0.0001
Mean SaO <sub>2</sub> , %	92.8 (2.5)	94.1 (1.9)	93.1 (2.6)	92.4 (2.5)	<0.0001
Ln-RHI	0.72 (0.27)	0.74 (0.25)	0.75 (0.27)	0.70 (0.27)	0.0490
Endothelial dysfunction*, %	22.5	14.9	18.1	26.9	0.0086

Data are expressed as mean (standard deviation) or percentages.

Abbreviations: OSA, obstructive sleep apnoea; BMI, body mass index; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; EDS, excessive daytime sleepiness (Epworth score > 10); T90, sleep time with oxygen saturation < 90%; SaO<sub>2</sub>, oxygen saturation; Ln-RHI, natural logarithmic transformation of the reactive hyperaemia index.

\* Endothelial dysfunction was defined by a Ln-RHI<0.51

**Table 2:** Comparison of patients with and without endothelial dysfunction

	No endothelial dysfunction (Ln-RHI $\geq$ 0.51)	Endothelial dysfunction (Ln-RHI<0.51)	p value
n	566	164	-
Age, years	54.1 (11.4)	55.2 (12.3)	0.2788
Females, %	19.8	21.3	0.6639
BMI, kg/m <sup>2</sup>	28.1 (5.8)	30.7 (6.0)	<0.0001
Obesity, %	26.1	45.1	<0.0001
SBP, mmHg	130.4 (15.9)	130.6 (16.2)	0.9018
DBP, mmHg	77.6 (11.4)	79.7 (12.2)	0.0494
Hypertension, %	37.8	41.5	0.3988
Diabetes, %	11.3	29.9	<0.0001
Dyslipidaemia, %	20.6	20.1	0.9059
Non-smokers, %	47.2	50.9	0.4074
Epworth score	9.3 (4.8)	9.3 (4.8)	0.9805
EDS, %	40.6	39.9	0.8833
No OSA, %	10.1	6.1	0.0079
Mild-to-moderate OSA, %	39.9	30.5	
Severe OSA	50.0	63.4	
AHI, n	31.7 (23.2)	36.3 (23.5)	0.0264
T90, min	29.1 (58.8)	46.1 (83.2)	0.0218
Mean SaO <sub>2</sub> , %	93.1 (2.2)	92.0 (3.1)	<0.0001

Data are expressed as mean (standard deviation) or percentages.

Abbreviations: OSA, obstructive sleep apnoea; BMI, body mass index; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; EDS, excessive daytime sleepiness (Epworth score > 10); AHI, apnoea-hypopnoea index; T90, sleep time with oxygen saturation < 90%; SaO<sub>2</sub>, oxygen saturation; Ln-RHI, natural logarithmic transformation of the reactive hyperaemia index.

**Table 3:** Adjusted odds ratios for endothelial dysfunction according to variables of nocturnal hypoxemia

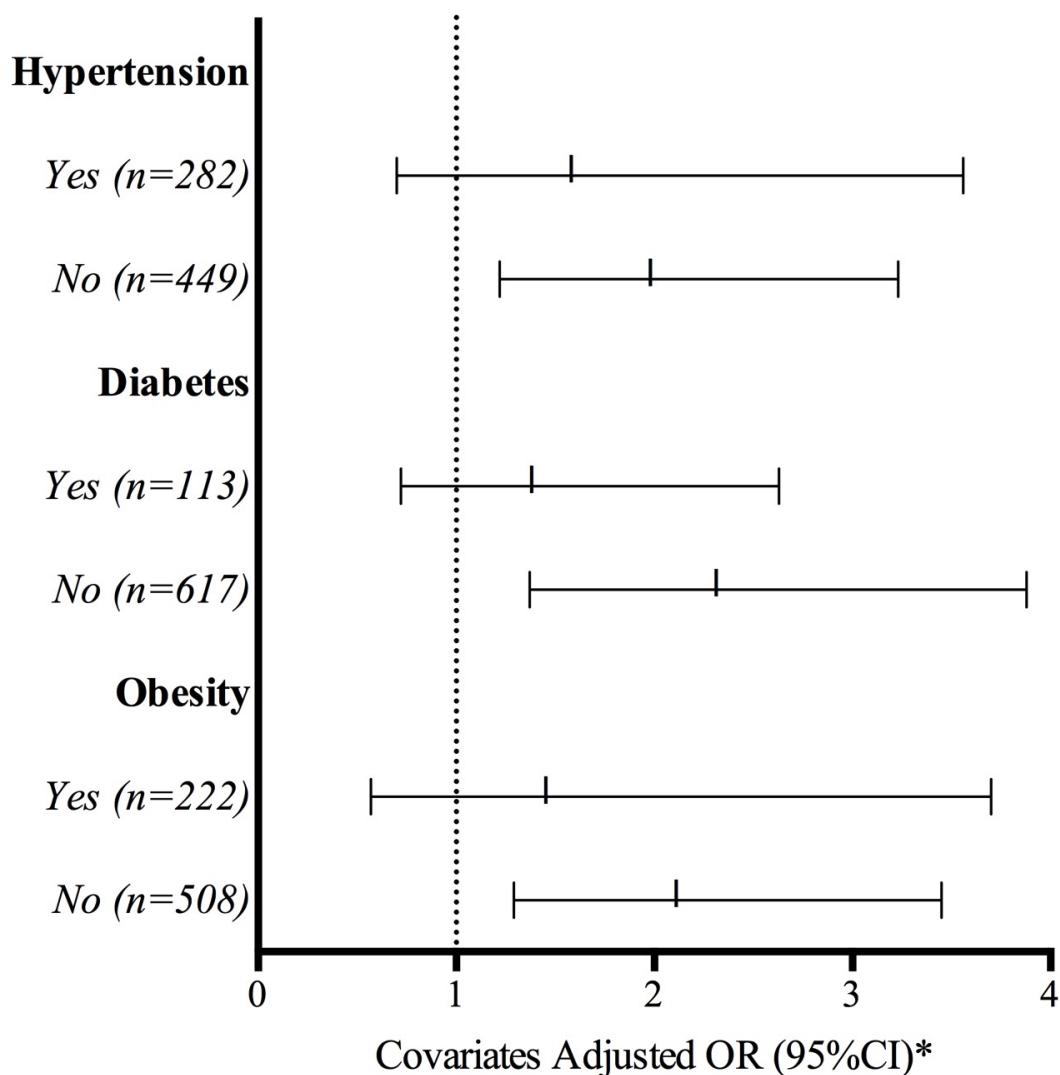
Predictor	Adjusted odds ratio	95% confidence interval	p value
Sleep time spent with oxygen saturation below 90%, min			
<1.7 min (ref)	1	-	-
1.7-20 min	1.51	1.21-1.90	0.0004
>20 min	1.83	1.20- 2.79	0.0047
Mean oxygen saturation during sleep, %			
>94.0% (ref)	1	-	-
92-94.0%	1.30	1.03-1.64	0.0291
<92%	1.47	1.14-1.90	0.0028

Odds ratios were adjusted for age, gender, diastolic blood pressure, presence of obesity and diabetes.

## b. Conclusion Projet 1

Après ajustement sur l'âge, le genre, la tension artérielle diastolique et les comorbidités métaboliques, il s'avère que la sévérité du SAHOS définie par l'IAH ainsi que la sévérité de l'hypoxie nocturne définie par la saturation moyenne et le temps passé avec une saturation inférieure à 90%, sont associées à une augmentation du risque de DE.

Cette association entre le SAHOS sévère et le DE existe uniquement chez les patients ne présentant pas d'HTA, de diabète ou d'obésité (Figure 16).



**Figure 16.** Analyse en sous-groupes de la relation entre SAHOS et DE.



### **3. Projet 2 : Rôle du SAHOS sur la dysfonction endothéliale des patients diabétiques de type 2 – DIVAS**

Le SAHOS est fréquemment associé à une autre maladie connue pour engendrer une DE : le diabète de type 2. Ce lien s'explique non seulement par un cofacteur de risque commun qui est l'obésité mais également par une relation de cause à effet réciproque. Différentes études à ce jour ont montré que ces 2 pathologies sont responsables d'une atteinte endothéliale. Il a également été décrit par notre équipe que les patients apnéiques ont des MV de phénotype différent. De la même façon, les patients diabétiques vont présenter des MV modifiées comparativement aux sujets sains à la fois en nombre et en phénotype.

Nous avons voulu déterminer le poids du SAHOS sur la DE observée chez les patients diabétiques. Nous avons cherché à définir des facteurs prédictifs cliniques et para cliniques de cette dysfonction, notamment via le phénotypage des MV.

## **a. Résultats expérimentaux : Projet 2**

ORIGINAL INVESTIGATION

Open Access



# Association between obstructive sleep apnea severity and endothelial dysfunction in patients with type 2 diabetes

Vanessa Bironneau<sup>1</sup>, François Goupil<sup>2</sup>, Pierre Henri Ducluzeau<sup>3</sup>, Marc Le Vaillant<sup>4</sup>, Pierre Abraham<sup>5</sup>, Samir Henni<sup>5</sup>, Séverine Dubois<sup>6</sup>, Audrey Paris<sup>2</sup>, Pascaline Priou<sup>1,7</sup>, Nicole Meslier<sup>1,7</sup>, Claire Sanguin<sup>8</sup>, Wojciech Trzépizur<sup>1,7</sup>, Ramarosan Andriantsitohaina<sup>1</sup>, Maria Carmen Martinez<sup>1</sup> and Frédéric Gagnadoux<sup>1,7\*</sup>

## Abstract

**Background:** Obstructive sleep apnea (OSA) and type 2 diabetes (T2D) are associated with endothelial dysfunction a main predictor of late cardiovascular (CV) events. Despite the high prevalence of OSA in patients with T2D, the impact of OSA severity on endothelial function has not been clearly elucidated. The aim of this cross-sectional study was to determine whether increasing OSA severity is associated with poorer endothelial function in patients with T2D.

**Methods:** 140 patients with T2D and no overt CV disease underwent polysomnography, peripheral arterial tonometry, clinic blood pressure (BP) measurement, biological assessment for CV risk factors, daytime sleepiness and health related quality of life (HRQL) questionnaires. The following commonly used cut-offs for apnea-hypopnea index (AHI) were used to define 3 categories of disease severity: AHI < 15 (no OSA or mild OSA), 15 ≤ AHI < 30 (moderate OSA), and AHI ≥ 30 (severe OSA). The primary outcome was the reactive hyperemia index (RHI), a validated assessment of endothelial function.

**Results:** 21.4% of patients had moderate OSA and 47.6% had severe OSA. Increasing OSA severity and nocturnal hypoxemia were not associated with a significant decrease in RHI. Endothelial dysfunction (RHI < 1.67) was found in 47.1, 44.4 and 39.2% of patients with no OSA or mild OSA, moderate OSA and severe OSA, respectively ( $p = 0.76$ ). After adjustment for confounders including body mass index, increasing OSA severity was associated with higher systolic BP ( $p = 0.03$ ), lower circulating levels of adiponectin ( $p = 0.0009$ ), higher levels of sP-selectin ( $p = 0.03$ ), lower scores in 3 domains of HRQL including energy/vitality ( $p = 0.02$ ), role functioning ( $p = 0.01$ ), and social functioning ( $p = 0.04$ ).

**Conclusions:** Moderate to severe OSA is very common but has no impact on digital micro-vascular endothelial function in patients with T2D.

**Keywords:** Obstructive sleep apnea, Type 2 diabetes, Endothelial function, Peripheral arterial tonometry, Reactive hyperemia index

## Background

Endothelial dysfunction is a pathophysiological determinant of atherogenesis that occurs at the early stages of coronary artery disease [1] and predicts the occurrence of

cardiovascular (CV) events in at-risk subjects [2]. Flow-mediated dilatation (FMD) of the brachial artery has been extensively used as a noninvasive measure of endothelial function. However, the FMD technique is time-consuming and requires a careful learning curve, which limits its routine application in large multicenter studies. Measuring endothelial function by peripheral arterial tonometry (PAT) has recently gained increased attention, as the reactive hyperemia index (RHI) measured by PAT is

\*Correspondence: [fgagnadoux@chu-angers.fr](mailto:fgagnadoux@chu-angers.fr)

<sup>7</sup> Département de Pneumologie, Université Bretagne Loire, CHU d'Angers, 4 Rue Larrey, 49100 Angers, France

Full list of author information is available at the end of the article



a validated marker of endothelial function [3]. Validation studies have demonstrated that RHI is correlated with coronary micro-vascular function in patients with early atherosclerosis [4] and predicts CV events [5–7]. Recent study underlined the relationship between immune-inflammatory markers, endothelial and arterial stiffness index in patients with acute ischemic stroke, also suggesting the use of a combination of PAT and arterial stiffness indexes to better categorize patients with ischemic stroke [8, 9]. Nitric oxide (NO) plays an important role in digital reactive hyperemia [10]. Kuvin et al. [11] found a significant correlation ( $r = 0.55$ ,  $p < 0.0001$ ) between RHI and FMD in 89 subjects, 38% of whom had a history of coronary artery disease. RHI was also significantly correlated with FMD ( $r = 0.47$ ;  $p < 0.001$ ) in non-obese and non-smoker subjects free of overt CV disease [12]. In the Framingham health study, RHI correlated with traditional CV risk factors but the association with FMD was not significant in multivariable-adjusted analyses [13].

The obesity pandemic is associated with an increasing prevalence of type 2 diabetes (T2D) and obstructive sleep apnea (OSA). T2D carries a substantially increased risk of macro and micro-vascular complications, including coronary artery disease, nephropathy, retinopathy and non-healing foot ulcers [14, 15]. Endothelial dysfunction is important in the pathogenesis of diabetic angiopathy due to increased vascular tone, vascular inflammation and oxidative stress [15–17]. Several studies demonstrated that micro-vascular endothelial function assessed by the RHI is impaired in patients with T2D and improved by dietary or pharmacological interventions [15, 18–22]. In a cross-sectional study including 183 patients undergoing coronary angiography, diabetic patients with and without coronary heart disease showed significantly impaired peripheral vascular function assessed by RHI compared to non-diabetic patients without coronary heart disease [18]. A recent study demonstrated that patients with T2D and diabetic foot syndrome have lower mean values of RHI than diabetic subjects without diabetic foot [23]. OSA is also associated with a decrease in endothelial NO synthase and an increase in endothelin-1 levels [24], with hypercoagulability [25], and inflammation [26]. Repeated hypoxemia-reoxygenation episodes induce ROS production [27]. The final result of this process is the development of endothelial dysfunction and micro-vascular impairment [28]. Several clinic-based and population-based studies have demonstrated that OSA is associated with severity-dependent deterioration of endothelial function assessed by RHI in both adults and children [29–34]. Microparticles (MPs) are small plasma membrane vesicles that can be released by a variety of vascular or blood cells and contain both membrane and cytosolic elements. Experimental data has demonstrated that

MPs can promote endothelial dysfunction. MPs released in vitro by apoptotic T-lymphocytes impair endothelial function by stimulating oxygen free radical generation, and decreasing Ser1179 phosphorylation of endothelial NO synthase [35]. Recent data suggest that circulating MPs released by activated endothelial cells can be considered as biomarkers of endothelial dysfunction in OSA [35] and in T2D [36].

In clinical practice, OSA is frequently associated with several risk factors for atherosclerosis, including hypertension [37], T2D [38, 39] and the metabolic syndrome [40]. Previous studies demonstrated additive effects on early markers of atherosclerosis in patients with OSA associated with hypertension [41] or the metabolic syndrome [40]. There is evidence to suggest that the presence and severity of untreated OSA is associated with poorer glucose control in patients with T2D [38]. However, although recent data suggested that OSA may be associated with diabetic retinopathy [42], nephropathy [43] and neuropathy [44], there is no conclusive evidence today regarding the impact of the OSA-T2D relation on micro- and macro-vascular diabetic complications [45]. As OSA and T2D often occur concomitantly, the presence of OSA may exert additive effects on subclinical markers of vascular dysfunction in patients with T2D. The main objective of the present study was to determine whether increasing OSA severity is associated with poorer endothelial function, which could contribute to increase the risk of micro- and macro-vascular complications in patients with T2D and no overt CV disease.

## Methods

### Study design

This study was cross-sectional study done in two French sleep centers (Angers University Hospital and Le Mans General Hospital, France). The study was approved by our local ethical committee (CPP OUEST II, no2011/12). Outcome assessors were unaware of study-group assignment.

### Participants

Patients aged 18–75 with T2D on stable medications for the preceding 3 months, without medical history of CV disease including coronary heart disease, heart failure, arrhythmias and stroke, were recruited from the out-patients diabetes clinics of Angers and Le Mans hospitals. All patients gave their written informed consent to participate in the study.

### Sleep studies

In all patients OSA was assessed by an overnight in-laboratory polysomnography (PSG) (CID 102™, Cidelec, Angers, France) with continuous recording of the

following channels: electroencephalogram, electrooculogram, chin electromyogram, arterial oxygen saturation, nasal–oral airflow, electrocardiogram, chest and abdominal wall motion, and body position. Respiratory events were scored manually. An apnea was defined as the complete cessation of airflow and hypopnea as a decrease in the nasal pressure signal of at least 30% in association with either  $\geq 3\%$  arterial oxygen desaturation or an arousal both lasting for at least 10 s [46].

#### Clinical evaluation

All clinical examinations and evaluations were conducted during the morning hours following overnight PSG. Clinical evaluation included anthropometric data, smoking habits, medical history, and medication use. Patients who were previously diagnosed as hypertensive and were taking antihypertensive medication were considered as having hypertension. Daytime sleepiness was evaluated by the Epworth sleepiness scale (ESS) [47]. Excessive daytime sleepiness was defined by an ESS  $\geq 11$ . Health related quality of life (HRQL) was evaluated with a validated French-language version of the medical outcomes study 36-item short-form (SF36) [48]. Clinic blood pressure (BP) was measured using a periodically calibrated mercury sphygmomanometer and an appropriate cuff size. Recorded blood pressure was the average of three consecutive readings during a 5-min period following at least 5 min of rest in the sitting position.

#### Assessment of micro-vascular endothelial function

Endothelial function was assessed by digital pulse amplitude, using PAT (EndoPAT<sup>®</sup>, Itamar Medical Ltd., Caesarea, Israel) [4]. PAT was performed in the morning following PSG. Patients laid down in a quiet room with probes mounted on both index fingers and a blood pressure cuff around the right arm above the elbow for the hyperemia testing. The left finger was used as the control. Finger arterial pulse wave amplitude was recorded throughout the protocol which included 3 consecutive stages each of 5 min duration: (1) baseline recording; (2) occlusion of the brachial artery by inflating the blood pressure cuff to 50 mm Hg above the baseline systolic pressure and (3) post-occlusion recording after deflation of the cuff to measure of the generated reactive hyperemia response. RHI was calculated as the ratio of the average amplitude of the PAT signal post-to-pre occlusion of the tested arm, normalized to the concurrent signal from the contralateral finger. A RHI value  $< 1.67$  indicated endothelial dysfunction [4]. The two participating centers followed the same procedure and PAT assessors were blinded to patient's study group.

#### Biological assessment

Fasting blood samples were taken from the antecubital vein in the morning hours following overnight PSG. Plasma glucose, total serum cholesterol, and high-density lipoprotein serum cholesterol (HDLc) were directly measured in accredited laboratories using standard techniques. Low-density lipoprotein serum cholesterol (LDLc) was calculated. Glycated hemoglobin (HbA1c) was measured in whole blood with ion-exchange high-performance liquid chromatography and used as a clinical indicator of glucose control.

Plasma and serum samples were obtained after centrifugation and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for assessment of circulating biomarkers of cardiovascular risk. For each ELISA kit, samples were assayed in duplicate. ELISA assays included serum levels of leptin (Human Leptin ELISA KIT, OKAA00022\_96 W, AVIVA SYSTEMS BIOLOGY, San Diego, USA; detection limit = 7 pg/ml), adiponectin (Human Adiponectin ELISA KIT, EA2500-1, ASSAY-PRO, St Charles, MO; detection limit = 0.3 ng/ml), high-sensitive C-reactive protein (hs-CRP ELISA, DE740011, Demeditec, Germany; detection limit = 0.02  $\mu\text{g/ml}$ ), soluble P-selectin (sP-selectin, Human P-Selectin/CD62P, BBE6, R&D Systems Europe, Ltd., UK; detection limit = 0.5 ng/ml), and 8-iso-prostaglandin level (OxiSelect<sup>™</sup> 8-iso-Prostaglandin F2 $\alpha$  ELISA Kit, STA-337, Cell Biolabs, INC., USA). Inter-assay and intra-assay variation for all the techniques used was  $< 10\%$ . The homeostasis model assessment resistance index (HOMA-IR) was calculated from fasting glucose and insulin concentrations, as follows: insulin (mIU/l)  $\times$  glucose (mmol/l)/22.5.

In 43 patients circulating microparticles (MPs) were isolated from blood samples within 2 h after completion of sampling, from a peripheral vein using a 21-gauge needle to minimize platelet activation. A first centrifugation of blood was carried out 260g for 20 min. Plasma was centrifuged at 1500g for 20 min in order to obtain platelet-free plasma. Two hundred microliters of platelet-free plasma were frozen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for subsequent analysis. Circulating MPs were quantified and their cellular origin identified using flow cytometry with specific antibodies (Beckman Coulter, Villepinte, France). Anti-CD62P and anti-CD62E antibodies were used to identify P-selectin<sup>+</sup> and E-selectin<sup>+</sup> MPs, corresponding to MPs from activated platelets and activated endothelial cells, respectively.

#### Statistical analysis

The primary outcome variable was endothelial function assessed by the RHI. Secondary outcomes included clinic BP, biological data and HRQL questionnaires.

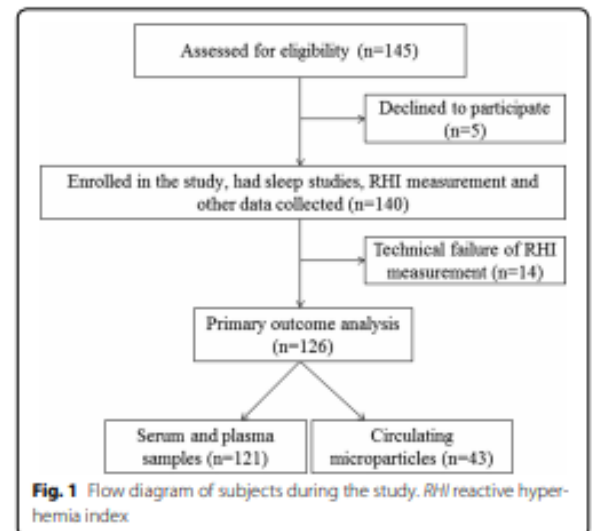
Characteristics of the study population were determined according to categories of apnea–hypopnea index (AHI). The following commonly used cut-offs for AHI were used to define 3 categories of disease severity:  $AHI < 15$  (no OSA or mild OSA),  $15 \leq AHI < 30$  (moderate OSA), and  $AHI \geq 30$  (severe OSA). Patients with no OSA ( $AHI < 5$ ) and patients with mild OSA ( $5 \leq AHI < 15$ ) were pooled in the same group. Indeed, recent epidemiological data demonstrated that although mild OSA ( $5 \leq AHI < 15$ ) is highly prevalent, most patients are asymptomatic and the association between mild OSA and adverse clinical outcomes remains unproven [49]. For other physiologic indices of OSA severity, the study sample was grouped into quartiles of the variable. Normality of distribution was assessed using the Kolmogorov–Smirnov test. Continuous variables with normal distribution were described as mean (SD) or mean (95% confidence interval [CI]). Univariate analysis was first used to determine which primary and secondary outcomes variables could be significantly associated with OSA severity. For continuous variables, p values across AHI categories were calculated by analysis of variance. The Chi square test and the Fischer exact test as appropriate were used for categorical variables. Multivariate regression analyses were then used to characterize the independent associations between OSA severity and outcome variables. The correlation between continuous variables was assessed by Pearson's correlation coefficient. All reported p-values were two-sided. A p value  $\leq 0.05$  was considered to indicate statistical significance. All analyses were performed using STATA® version 13.1 (STATA Corp., College Station, TX, USA).

## Results

A flow diagram is presented in Fig. 1. Between October 12, 2011 and October 27 2015, 145 patients with T2D on stable medications and no overt CV disease were assessed for eligibility, 140 of whom consented and were enrolled in the study. Technical failure of RHI measurement occurred in 14 patients. Table 1 presents the characteristics of 126 study participants included in the primary outcome analysis according to OSA severity. Among 126 patients with T2D, 27 (21.4%) had AHI between 15 and  $<30$  indicating moderate OSA and 60 (47.6%) had  $AHI \geq 30$  indicating severe OSA. Significant inter-group differences were observed only for injectable GLP-1 analog and insulin use.

### Peripheral endothelial function and clinic blood pressure

As shown in Table 2, increasing OSA severity in patients with T2D was associated neither with a decrease in RHI value nor with an increased risk of micro-vascular endothelial dysfunction as defined by a RHI value  $<1.67$ .



In a further analysis, patients were grouped into quartiles of 3% oxygen desaturation index (ODI), % sleep time spent with oxygen saturation ( $SaO_2$ )  $<90\%$  (T90), and time desaturation summation index (TDS) [(100%–mean oxygen saturation during sleep)  $\times$  total sleep time] [50] in order to estimate the impact of increasing nocturnal hypoxemia on RHI in T2D patients. No significant association was observed between RHI values and increasing nocturnal hypoxemia as assessed by quartiles of ODI ( $p = 0.32$ ), T90 ( $p = 0.33$ ) and TDS ( $p = 0.85$ ). Univariate analyses showed no significant association between RHI and additional factors including type of oral antidiabetic drug, antihypertensive medications, cholesterol-lowering medications, and antiaggregants (data not shown). No difference was observed across AHI categories regarding diastolic BP. In contrast, increasing OSA severity was associated with significantly higher systolic BP after adjustment for age, gender, body mass index (BMI), insulin and injectable GLP-1 analog use ( $p = 0.03$ ).

### Biomarkers of cardiovascular risk

As shown in Table 3, increasing OSA severity was significantly associated with lower circulating levels of adiponectin ( $p = 0.0009$ ) and higher levels of sP-selectin ( $p = 0.03$ ) after adjusting for age, gender, BMI, insulin and injectable GLP-1 analog use. There was also a trend for a decrease in 8-isoprostane levels with increasing OSA severity but the difference across AHI categories did not reach statistical significance after adjustment for confounders. No significant differences were observed across AHI categories for other biomarkers including circulating MPs excepted for a trend toward an increase in CD62P + MPs in moderate to severe OSA ( $p = 0.08$ ).

**Table 1 Characteristics of study participants according to obstructive sleep apnea severity**

	All	AHI < 15	15 ≤ AHI < 30	AHI > 30	p value
n	126	39	27	60	–
Age, years	59.3 (9.5)	59.6 (10.6)	61.4 (10.4)	58.1 (8.3)	0.33
Women, %	40.3	51.3	36.0	35.0	0.24
BMI, kg/m <sup>2</sup>	33.2 (6.3)	32.0 (6.4)	32.5 (6.2)	34.4 (6.1)	0.14
Waist circumference, cm	113.0 (17.0)	108.0 (18.9)	115.2 (16.6)	115.3 (15.9)	0.22
Waist-to-hip ratio	1.2 (0.4)	1.1 (0.3)	1.3 (0.4)	1.3 (0.5)	0.19
Current smokers, %	13.5	18.8	14.3	7.1	0.42
Hypertension, %	59.0	46.2	66.7	64.4	0.14
Duration of diabetes, years	9.0 (7.7)	10.1 (7.4)	10.4 (8.7)	7.7 (7.3)	0.20
Metformin, %	90.3	87.1	94.7	90.7	0.83
Sulfonylurea, %	26.7	24.0	27.8	27.9	0.93
DPP-4 inhibitors, %	19.8	25.0	16.7	17.5	0.70
Injectable GLP-1 analog, %	9.6	3.7	0.0	18.0	0.01
Insulin, %	13.1	10.3	29.2	8.5	0.03
Antihypertensive medications					
ACE inhibitors, %	32.9	28.6	25.0	39.0	0.50
CCBs, %	17.1	7.7	6.3	27.5	0.05
β-blockers, %	23.2	32.1	16.7	20.0	0.38
Cholesterol-lowering drugs, %	61.4	56.7	58.8	65.9	0.71
Antiaggregants, %	14.5	18.5	11.8	12.8	0.76
Sleep-disordered breathing indices					
AHI, n	33.7 (27.5)	7.1 (4.3)	21.9 (4.0)	56.2 (23.3)	<0.0001
ODI, n	34.2 (45.7)	10.7 (17.9)	21.7 (16.6)	54.8 (56.3)	<0.0001
T90, %	54.0 (75.8)	30.8 (58.1)	35.2 (32.0)	77.9 (92.2)	<0.0001
TDS, min.	55.2 (17.6)	52.0 (16.5)	53.4 (10.2)	58.1 (20.4)	0.22

Data are expressed as mean (standard deviation) or percentages

BMI body mass index, DPP-4 dipeptidyl peptidase-4, ACE angiotensin converting enzyme, CCBs calcium channel blockers, AHI apnea-hypopnea index, ODI 3% oxygen desaturation index, T90 % sleep time spent with oxygen saturation <90%, TDS time desaturation summation index [(100% – mean oxygen saturation during sleep) × total sleep time] [50]

**Table 2 Endothelial function and clinic blood pressure (BP) according to obstructive sleep apnea severity**

	AHI < 15	15 ≤ AHI < 30	AHI > 30	p value	p value*
RHI	1.84 (0.53)	1.81 (0.55)	1.84 (0.42)	0.97	–
RHI < 1.67, %	47.1	44.4	39.2	0.76	–
Systolic BP, mmHg	129.2 (12.5)	140.2 (17.9)	136.6 (18.0)	0.04	0.03
Diastolic BP, mmHg	76.6 (8.9)	78.4 (9.6)	80.9 (12.1)	0.15	–

Data are expressed as mean (standard deviation) or percentages

RHI reactive hyperemia index

\* p values were adjusted for age, gender, body mass index, insulin and injectable GLP-1 analog use

A significant negative correlation was found between the HOMA-IR and the RHI ( $r = -0.22$ ;  $p = 0.03$ ). No correlation was observed between the RHI and other biomarkers.

#### Daytime sleepiness and quality of life questionnaires

As shown in Table 4, increasing OSA severity was associated with higher ESS ( $p = 0.01$ ) although the

association was attenuated after adjustment for confounders ( $p = 0.08$ ). After adjustment for age, gender, BMI, insulin and injectable GLP-1 analog use, increasing OSA severity was associated lower scores in 3 domains of HRQL including energy/vitality ( $p = 0.02$ ), role functioning ( $p = 0.01$ ), and social functioning ( $p = 0.04$ ). There was no significant association between RHI and ESS score.

**Table 3 Biochemical variables according to obstructive sleep apnea severity**

	AHI < 15	15 ≤ AHI < 30	AHI > 30	p value	p value*
HbA <sub>1c</sub> , %	8.0 (1.7)	7.3 (1.4)	7.4 (1.2)	0.05	–
Glucose, mmol/l	8.4 (2.2)	7.8 (2.3)	7.9 (1.9)	0.34	–
Insulin, mU/l	15.3 (11.2)	22.2 (25.0)	15.0 (10.4)	0.11	–
HOMA-IR	5.6 (4.9)	8.1 (9.5)	5.3 (3.9)	0.13	–
TC, mmol/l	4.6 (1.0)	4.6 (1.3)	4.6 (0.8)	0.99	–
HDLc, mmol/l	1.1 (0.2)	1.0 (0.2)	1.0 (0.2)	0.18	–
LDLc, mmol/l	2.7 (1.0)	2.9 (1.3)	2.7 (0.5)	0.88	–
TG, mmol/l	1.7 (0.9)	1.6 (0.6)	2.3 (1.3)	0.18	–
Adiponectin, µg/ml	14.7 (7.1)	9.2 (6.3)	9.3 (6.4)	0.0004	0.0009
Leptin, ng/ml	30.9 (20.5)	38.8 (34.2)	33.5 (25.9)	0.54	–
Leptin/adiponectin	3.5 (3.8)	5.4 (5.1)	5.5 (6.5)	0.19	–
8-isoprostane, pg/ml	401.7 (142.8)	235.7 (157.4)	304.1 (195.1)	0.01	0.09
hs-CRP, µg/ml	45.1 (60.7)	30.7 (30.7)	40.3 (35.8)	0.45	–
sP-sel, ng/ml	38.4 (17.9)	54.9 (36.9)	50.8 (25.6)	0.03	0.03
Circulating MPs (n = 43)					
CD62E <sup>+</sup> MPs/ml	70.4 (45.4)	113.2 (116.5)	76.0 (66.6)	0.3882	–
CD62P <sup>+</sup> MPs/250 × 10 <sup>3</sup> platelets/ml	37.3 (22.7)	54.8 (41.2)	64.1 (37.4)	0.0838	–

Data are expressed as mean (standard deviation)

HbA<sub>1c</sub> glycated hemoglobin, HOMA-IR homeostasis model assessment of insulin resistance, TC total cholesterol, HDLc high-density lipoprotein cholesterol, LDLc low-density lipoprotein cholesterol, TG triglycerides, hs-CRP high-sensitivity C-reactive protein, sP-sel soluble P-selectin, MPs microparticles

\* p values were adjusted for age, gender, body mass index, insulin and injectable GLP-1 analog use

**Table 4 Daytime sleepiness and quality of life questionnaires according to obstructive sleep apnea severity**

	AHI < 15	15 ≤ AHI < 30	AHI > 30	p value	p value*
Daytime sleepiness					
ESS	7.5 (4.3)	8.5 (5.3)	10.6 (5.3)	0.01	0.08
ESS ≥ 11, %	22.8	37.5	46.0	0.06	–
Quality of life					
SF36 PCS	50.4 (2.3)	50.6 (2.5)	51.0 (2.2)	0.51	–
SF36 MCS	48.1 (5.9)	47.0 (6.5)	45.4 (6.4)	0.12	–
SF36 bodily pain	60.4 (24.7)	60.9 (29.2)	54.1 (26.0)	0.41	–
SF36 energy/vitality	57.1 (20.8)	52.1 (25.9)	43.0 (23.8)	0.02	0.02
SF36 general health	65.6 (21.8)	62.3 (18.2)	56.2 (22.0)	0.11	–
SF36 mental health	67.6 (20.3)	63.5 (23.1)	57.8 (22.0)	0.09	–
SF36 physical functioning	72.3 (25.8)	65.4 (27.3)	62.5 (28.3)	0.24	–
SF36 role emotional	82.1 (34.1)	76.0 (35.4)	65.1 (42.0)	0.10	–
SF36 role physical	83.3 (30.5)	66.0 (40.1)	58.0 (40.7)	0.007	0.01
SF36 social functioning	75.5 (28.7)	76.6 (25.7)	61.6 (31.1)	0.03	0.04

Data are expressed as mean (standard deviation) or percentages

ESS Epworth sleepiness scale, PSQ Pittsburgh sleep quality index, PCS physical component score, MCS mental component score

\* p values were adjusted for age, gender, body mass index, insulin and injectable GLP-1 analog use

## Discussion

The main finding of the present study is the lack of additive effect of OSA severity on endothelial dysfunction in patients with T2D. Increasing OSA severity and nocturnal hypoxemia were not associated with a significant

decrease in RHI. In contrast, increasing OSA severity was associated with higher systolic BP, lower circulating levels of adiponectin and higher levels of sP-selectin.

The present study confirms the very high prevalence of OSA in patients with T2D. Moderate to severe OSA



prevalence in our sample of subjects with T2D (69.0%) was even higher than in previous studies [38, 39]. Among 305 obese patients with T2D, Foster et al. [39] found 53.1% of patients with moderate to severe OSA. However, the authors used the 2007 American Academy of Sleep Medicine (AASM) respiratory event criteria that were recently demonstrated to underestimate the AHI when compared to 2012 AASM criteria [51]. In a more recent study including 234 patients with T2D, 151 patients had OSA on home-based cardiorespiratory sleep study of whom only 40% had moderate to severe OSA [38]. However, a recent report from the multi-center European Sleep Apnea Cohort (ESADA) demonstrated that cardiorespiratory sleep studies interpreted using standard guidelines result in under diagnosis and misclassification of OSA [52].

Despite the high prevalence of OSA in patients with T2D, the impact of OSA severity on micro-vascular endothelial function in diabetic subjects has not been clearly elucidated. In a cross-sectional study including healthy normal-weight controls ( $n = 14$ ), healthy obese controls ( $n = 33$ ), subjects with T2D ( $n = 68$ ), and obese subjects with OSA ( $n = 38$ ), Yim-Yeh et al. [53] concluded that OSA impaired endothelial function in the brachial artery as assessed by FMD to a similar degree as T2D did. However, OSA patients compared to patients with T2D displayed a better vascular reactivity in the skin microcirculation on laser Doppler flowmetry after acetylcholine iontophoresis. This study was not designed to evaluate an additive effect of OSA severity on endothelial dysfunction. Furthermore T2D patients had no sleep study and it is likely that many of these patients had undiagnosed OSA. More recently, Tahrani et al. [38] studied micro-vascular function by laser speckle contrast imaging in patients with T2D with OSA ( $n = 47$ ) and without OSA ( $n = 24$ ). After adjustment for confounders, OSA was associated with impairments in basal micro-vascular flux and endothelial-independent micro-vascular reactivity (sodium nitroprusside) but not with endothelial-dependent micro-vascular reactivity (acetylcholine). We acknowledge the lack of healthy control group in our study. In a recent study including 53 healthy subjects with a mean BMI of 25 (4.3) kg/m<sup>2</sup>, the mean RHI value was 2.4 (0.6) [23]. In a recent randomized controlled trial including 150 patients with severe OSA (median [interquartile range] AHI, 41.0 [35.0–53.0]; mean BMI, 27.0 (3.2) kg/m<sup>2</sup>), with no overt CV disease and only 5% of comorbid TD2, the mean RHI value was 2.15 (0.61) [54]. The mean RHI value in our population of diabetic subjects was markedly lower ( $\approx 1.8$  (0.5)) with no difference across AHI categories. Altogether, our findings and those of previous studies suggest that TD2 has major adverse effects on endothelial function and that endothelial

dysfunction could not be made any worse by OSA. The lack of difference in MPs from activated endothelial cells (CD62E + MPs) across AHI categories also reinforced the notion that OSA does not aggravate endothelial dysfunction in T2D patients. This result is consistent with findings of a recent study demonstrating the lack of association between OSA and endothelial function assessed by RHI in obese subjects [55]. Endothelial dysfunction is linearly associated with dysglycemia even in the absence of overt diabetes [56, 57]. Our results are also partially consistent with findings of recent randomized trials showing that CPAP therapy of OSA has no effect on glycemic control in patients with TD2 [58], and does not prevent CV events in patients with established CV disease [59].

Oxidative stress and concomitant systemic inflammation are two of the prominent underlying mechanisms suggested to contribute to the increased risk for CV disease both in OSA [60] and T2D [61]. In the present study, there was a trend for a decrease in 8-isoprostane levels with increasing OSA severity although the inter-group difference did not reach statistical significance after adjustment for confounders. Despite the general belief that OSA increases oxidative stress, a recent randomized controlled study has demonstrated a reduction in urinary F2-isoprostane after 2 weeks of intermittent hypoxia following continuous positive airway pressure (CPAP) withdrawal [62]. CPAP withdrawal was also associated with a rise in plasma superoxide dismutase, an antioxidant known to be increased by hypoxic preconditioning. Paradoxical data from epidemiological mortality endpoint studies also supported the existence of protective preconditioning effects in OSA [60]. Further studies are required to investigate potential protective effects of OSA against oxidative stress in T2D. Among various adipokines, adiponectin has attracted considerable attention due to its role in CV disorders. It has been suggested that reduced serum adiponectin levels could partly explain increased CV disease in OSA patients [63]. Interestingly, increasing OSA severity in our sample of patients with T2D was associated with a significant reduction in adiponectin levels after adjustment for confounding factors including BMI. P-selectin is an adhesion molecule that is expressed on activated platelets and endothelium and is shed into plasma in a soluble form, sP-selectin [64]. P-selectin is involved in leukocyte rolling and attachment, and thus can play an important role in the initiation of atherosclerosis [65]. Serum levels of sP-selectin were found to be increased in moderate to severe OSA patients and were associated with a higher prevalence of silent brain infarction on brain magnetic resonance images [66]. In the present study, moderate to severe OSA was associated with elevated levels of sP-selectin in patients with T2D. There

was also a trend toward an increase in MPs derived from activated platelets (CD62P<sup>+</sup>) in moderate to severe OSA. Although we failed to demonstrate a significant correlation between RHI, adiponectin and sP-selectin, both might contribute to increase the risk of CV events in T2D patients with moderate to severe OSA.

Our study has some strengths and limitations. The major strengths include the availability of PSG data, which is the gold standard for OSA diagnosis, and endothelial function assessment in a relatively large sample of patients. The major limitation of our study is its cross-sectional design and the lack of an interventional arm. Further studies are required to determine whether low RHI values predict poorer CV outcomes in patients with OSA and T2D. In the present study we investigated peripheral endothelial function at the level of the arterioles, which are most importantly related to peripheral vascular resistance [67, 68]. Although changes in pulse wave amplitude during reactive hyperemia were found to be correlated with brachial artery FMD [11, 12], the NO-mediated component totals  $\approx 60\%$  of digital artery dilation, whereas the remainder represents other vasodilator components [69]. It cannot be excluded that the findings would have been different if we used a different method for vascular function assessment. For example nocturnal non-dipping, a typical BP pattern in OSA [70], has been found to be associated with nitroglycerin-mediated vasodilation but not with FMD [71]. However, there is strong evidence that PAT is a reliable and reproducible technique to accurately characterize endothelial function in multicenter studies [3–7, 72]. A recent review [3] suggested that micro-vascular function might be more relevant in subjects without overt CV disease and may be an earlier indicator of CV risk than macrovascular function assessed by FMD. From a technical viewpoint, PAT offers the advantages of being less prone to operator error than FMD [69]. We acknowledge that we did not evaluate fluctuations in glucose levels by continuous glucose monitoring in the present study. Indeed, fluctuations in blood glucose levels were found to play a significant role in vascular endothelial dysfunction assessed by RHI in TD2 [73]. Nocturnal hyperglycemia has been reported in patients with TD2 and OSA particularly during REM sleep apneas with marked oxygen desaturations [74]. However, no significant association was observed between RHI values and increasing nocturnal hypoxemia in the present study.

### Conclusion

Moderate to severe OSA is very common but has no impact on digital micro-vascular endothelial function in patients with T2D.

### Abbreviations

AHI: apnea-hypopnea index; BMI: body mass index; BP: blood pressure; CV: cardiovascular; ESS: Epworth sleepiness scale; FMD: flow-mediated dilatation; HbA1c: glycated hemoglobin; HDLc: high-density lipoprotein serum cholesterol; HOMA-IR: homeostasis model assessment resistance index; HRQL: health related quality of life; LDLc: low-density lipoprotein serum cholesterol; NO: nitric oxide; ODI: 3% oxygen desaturation index; OSA: obstructive sleep apnea; PAT: peripheral arterial tonometry; PSQI: Pittsburgh sleep quality index; PSG: polysomnography; T2D: type 2 diabetes; T90: % sleep time spent with oxygen saturation (SaO<sub>2</sub>) <90%; RHI: reactive hyperemia index; SF36: medical outcomes study 36-item short-form.

### Authors' contributions

FG, MCM, MLV, PA, PHD, RA, VB Researched data, contributed to discussion, wrote the manuscript, reviewed/edited the manuscript. AP, CS, FG, PP, SH, SD, NM, WT researched data, contributed to discussion, reviewed/edited the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

### Author details

<sup>1</sup> Université Bretagne Loire, INSERM UMR 1063, Angers, France. <sup>2</sup> Service de Pneumologie, Centre Hospitalier, Le Mans, France. <sup>3</sup> Unité d'Endocrinologie-Diabétologie-Nutrition, Pôle de Médecine, CHRU de Tours, Tours, France. <sup>4</sup> Centre de Recherche Médecine, Sciences, Santé, Santé mentale, Société, CNRS UMR 8211, INSERM UMR U988-EHESS, Villejuif, France. <sup>5</sup> Département de Médecine du Sport et Explorations Fonctionnelles Vasculaires, Université Bretagne Loire, CHU d'Angers, Angers, France. <sup>6</sup> Département d'Endocrinologie, Diabétologie, Nutrition, Université Bretagne Loire, CHU d'Angers, Angers, France. <sup>7</sup> Département de Pneumologie, Université Bretagne Loire, CHU d'Angers, 4 Rue Larrey, 49100 Angers, France. <sup>8</sup> Service d'Endocrinologie, Diabétologie, Centre Hospitalier, Le Mans, France.

### Acknowledgements

The authors thank Jean-Marie Chrétien, Caroline Erignoux and Analg Le Cam, for their help with study monitoring, and coordination, as well as data management.

### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

### Availability of data and materials

The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

### Ethics and consent to participate

The investigations were carried out in accordance with the Declaration of Helsinki, including written informed consent from all participants. The study was approved by our local ethical committee (CPP OUEST II, no2011/12).

### Funding

This work was funded by the Institut de Recherche en Santé Respiratoire (IRS) des Pays de la Loire (9 rue du Landreau-BP 77132-49071 Beaucaouzé cedex, France).

Received: 4 February 2017 Accepted: 15 March 2017

Published online: 21 March 2017

### References

- Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med*. 2003;348(7):593–600.
- Perticone F, Ceravolo R, Pujia A, Ventura G, Iacopino S, Scozzafava A, Ferraro A, Chello M, Mastroroberto P, Verdecchia P, et al. Prognostic significance of endothelial dysfunction in hypertensive patients. *Circulation*. 2001;104(2):191–6.
- Flammer AJ, Anderson T, Celermajer DS, Creager MA, Deanfield J, Ganz P, Hamburg NM, Luscher TF, Shechter M, Taddei S, et al. The assessment

- of endothelial function: from research into clinical practice. *Circulation*. 2012;126(6):753–67.
- Bonetti PO, Pumper GM, Higano ST, Holmes DR Jr, Kuvin JT, Lerman A. Noninvasive identification of patients with early coronary atherosclerosis by assessment of digital reactive hyperemia. *J Am Coll Cardiol*. 2004;44(11):2137–41.
  - Akiyama E, Sugiyama S, Matsuzawa Y, Konishi M, Suzuki H, Nozaki T, Ohba K, Matsubara J, Maeda H, Horibata Y, et al. Incremental prognostic significance of peripheral endothelial dysfunction in patients with heart failure with normal left ventricular ejection fraction. *J Am Coll Cardiol*. 2012;60(18):1778–86.
  - Rubinshtein R, Kuvin JT, Soffler M, Lennon RJ, Lavi S, Nelson RE, Pumper GM, Lerman LO, Lerman A. Assessment of endothelial function by non-invasive peripheral arterial tonometry predicts late cardiovascular adverse events. *Eur Heart J*. 2010;31(9):1142–8.
  - Matsuzawa Y, Sugiyama S, Sugamura K, Nozaki T, Ohba K, Konishi M, Matsubara J, Sumida H, Kalkita K, Kojima S, et al. Digital assessment of endothelial function and ischemic heart disease in women. *J Am Coll Cardiol*. 2010;55(16):1688–96.
  - Tuttolomondo A, Casuccio A, Della Corte V, Maida C, Pecoraro R, Di Raimondo D, Vassallo V, Simonetta I, Arnao V, Pinto A. Endothelial function and arterial stiffness indexes in subjects with acute ischemic stroke: relationship with TOAST subtype. *Atherosclerosis*. 2017;256:94–9.
  - Tuttolomondo A, Pecoraro R, Di Raimondo D, Di Sciacca R, Canino B, Arnao V, Butta C, Della Corte V, Maida C, Licata G, et al. Immune-inflammatory markers and arterial stiffness indexes in subjects with acute ischemic stroke with and without metabolic syndrome. *Diabetol Metab Syndr*. 2014;6(1):28.
  - Nohria A, Gerhard-Herman M, Creager MA, Hurley S, Mitra D, Garz P. Role of nitric oxide in the regulation of digital pulse volume amplitude in humans. *J Appl Physiol*. 2006;101(2):545–8.
  - Kuvin JT, Patel AR, Silney KA, Pandian NG, Sheffy J, Schnall RP, Karas RH, Udelsion JE. Assessment of peripheral vascular endothelial function with finger arterial pulse wave amplitude. *Am Heart J*. 2003;146(1):168–74.
  - Dhindsa M, Sommerlad SM, DeVan AE, Barnes JN, Sugawara J, Ley O, Tanaka H. Interrelationships among noninvasive measures of postischemic macro- and microvascular reactivity. *J Appl Physiol*. 2008;105(2):427–32.
  - Hamburg NM, Palmisano J, Larson MG, Sullivan LM, Lehman BT, Vasani RS, Levy D, Mitchell GF, Vita JA, Benjamin EJ. Relation of brachial and digital measures of vascular function in the community: the Framingham heart study. *Hypertension*. 2011;57(3):390–6.
  - Gall MA, Rossing P, Skott P, Damsbo P, Vaag A, Bech K, Dejgaard A, Lauritzen M, Lauritzen E, Hougaard P, et al. Prevalence of micro- and macroalbuminuria, arterial hypertension, retinopathy and large vessel disease in European type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia*. 1991;34(9):655–61.
  - Rafnsson A, Bohm F, Settergren M, Gonon A, Brismar K, Pernow J. The endothelin receptor antagonist bosentan improves peripheral endothelial function in patients with type 2 diabetes mellitus and microalbuminuria: a randomized trial. *Diabetologia*. 2012;55(3):600–7.
  - Creager MA, Luscher TF, Cosentino F, Beckman JA. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part I. *Circulation*. 2003;108(12):1527–32.
  - Tooke JE, Hannemann MM. Adverse endothelial function and the insulin resistance syndrome. *J Intern Med*. 2000;247(4):425–31.
  - Gargiulo P, Marciano C, Savarese G, D'Amore C, Paolillo S, Esposito G, Santomauro M, Marsico F, Ruggiero D, Scala O, et al. Endothelial dysfunction in type 2 diabetic patients with normal coronary arteries: a digital reactive hyperemia study. *Int J Cardiol*. 2013;165(1):67–71.
  - Jenkins DJ, Kendall CW, Vuksan V, Faulkner D, Augustin LS, Mitchell S, Ireland C, Srichaikul K, Mirrahimi A, Chiavaroli L, et al. Effect of lowering the glycemic load with canola oil on glycemic control and cardiovascular risk factors: a randomized controlled trial. *Diabetes Care*. 2014;37(7):1806–14.
  - Kwak JH, Paik JK, Kim HI, Kim OY, Shin DY, Kim HI, Lee JH, Lee JH. Dietary treatment with rice containing resistant starch improves markers of endothelial function with reduction of postprandial blood glucose and oxidative stress in patients with prediabetes or newly diagnosed type 2 diabetes. *Atherosclerosis*. 2012;224(2):457–64.
  - Sagara M, Suzuki K, Aoki C, Tanaka S, Taguchi I, Inoue T, Aso Y. Impact of teneligliptin on oxidative stress and endothelial function in type 2 diabetes patients with chronic kidney disease: a case-control study. *Cardiovasc Diabetol*. 2016;15:76.
  - Matsubara J, Sugiyama S, Akiyama E, Iwashita S, Kurokawa H, Ohba K, Maeda H, Fujisue K, Yamamoto E, Kalkita K, et al. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, sitagliptin, improves endothelial dysfunction in association with its anti-inflammatory effects in patients with coronary artery disease and uncontrolled diabetes. *Circ J*. 2013;77(5):1337–44.
  - Tuttolomondo A, Casuccio A, Guercio G, Maida C, Del Cuore A, Di Raimondo D, Simonetta I, Di Bona D, Pecoraro R, Della Corte V, et al. Arterial stiffness, endothelial and cognitive function in subjects with type 2 diabetes in accordance with absence or presence of diabetic foot syndrome. *Cardiovasc Diabetol*. 2017;16(1):2.
  - Jelic S, Lederer DJ, Adams T, Padeletti M, Colombo PC, Factor PH, Le Jemtel TH. Vascular inflammation in obesity and sleep apnea. *Circulation*. 2010;121(8):1014–21.
  - Toraldo DM, De Benedetto M, Scoditti E, De Nuccio F. Obstructive sleep apnea syndrome: coagulation anomalies and treatment with continuous positive airway pressure. *Sleep Breath*. 2016;20(2):457–65.
  - Arias MA, Garcia-Rio F, Alonso-Fernandez A, Hernandez A, Hidalgo R, Martinez-Mateo V, Bartolome S, Rodriguez-Padial L. CPAP decreases plasma levels of soluble tumour necrosis factor-alpha receptor 1 in obstructive sleep apnoea. *Eur Respir J*. 2008;32(4):1009–15.
  - Alonso-Fernandez A, Garcia-Rio F, Arias MA, Hernandez A, de la Pena M, Pierola J, Barcelo A, Lopez-Collazo E, Agusti A. Effects of CPAP on oxidative stress and nitrate efficiency in sleep apnoea: a randomised trial. *Thorax*. 2009;64(7):581–6.
  - Sanchez-de-la-Torre M, Campos-Rodriguez F, Barbe F. Obstructive sleep apnoea and cardiovascular disease. *Lancet Respir Med*. 2013;1(1):61–72.
  - Azuma M, Chihara Y, Yoshimura C, Murase K, Hamada S, Tachikawa R, Matsumoto T, Inouchi M, Tanizawa K, Handa T, et al. Association between endothelial function (assessed on reactive hyperemia peripheral arterial tonometry) and obstructive sleep apnea, visceral fat accumulation, and serum adiponectin. *Circ J*. 2015;79(6):1381–9.
  - Itzhaki S, Lavie L, Pillar G, Tal G, Lavie P. Endothelial dysfunction in obstructive sleep apnea measured by peripheral arterial tone response in the finger to reactive hyperemia. *Sleep*. 2005;28(5):594–600.
  - Kheirandish-Gozal L, Etzioni T, Bhattacharjee R, Tan HL, Samiel A, Molero Ramirez H, Abu Eta B, Pillar G. Obstructive sleep apnea in children is associated with severity-dependent deterioration in overnight endothelial function. *Sleep Med*. 2013;14(6):526–31.
  - Randby A, Narnvedt SK, Hrubos-Strom H, Einvik G, Somers VK, Omland T. Sex-dependent impact of OSA on digital vascular function. *Chest*. 2013;144(3):915–22.
  - Seif F, Patel SR, Wala H, Rueschman M, Bhatt DL, Gottlieb DJ, Lewis EF, Patil SP, Punjabi NM, Babineau DC, et al. Association between obstructive sleep apnea severity and endothelial dysfunction in an increased background of cardiovascular burden. *J Sleep Res*. 2013;22(4):443–51.
  - Olafiranye O, Kip KE, Rhinehart Z, Mulukutla SR, Aiyer A, Strollo PJ, Reis SE. Impact of race and obesity on arterial endothelial dysfunction associated with sleep apnea: results from the Heart SCORE study. *Int J Cardiol*. 2015;201:476–8.
  - Trzepizur W, Martinez MC, Priou P, Andriantsitohaina R, Gagnadoux F. Microparticles and vascular dysfunction in obstructive sleep apnoea. *Eur Respir J*. 2014;44(1):207–16.
  - Agouni A, Andriantsitohaina R, Martinez MC. Microparticles as biomarkers of vascular dysfunction in metabolic syndrome and its individual components. *Curr Vasc Pharmacol*. 2014;12(3):483–92.
  - Torres G, Sanchez-de-la-Torre M, Barbe F. Relationship between OSA and hypertension. *Chest*. 2015;148(3):824–32.
  - Aronsohn RS, Whitmore H, Van Cauter E, Tasali E. Impact of untreated obstructive sleep apnea on glucose control in type 2 diabetes. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;181(5):507–13.
  - Foster GD, Sanders MH, Millman R, Zammit G, Borradaile KE, Newman AB, Wadden TA, Kelley D, Wing RR, Sunyer FX, et al. Obstructive sleep apnea among obese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2009;32(6):1017–9.
  - Drager LF, Bortolotto LA, Maki-Nunes C, Trombetta IC, Alves MJ, Fraga RE, Negrao CE, Krieger EM, Lorenzi-Filho G. The incremental role of obstructive sleep apnoea on markers of atherosclerosis in patients with metabolic syndrome. *Atherosclerosis*. 2010;208(2):490–5.

41. Drager LF, Bortolotto LA, Krieger EM, Lorenzi-Filho G. Additive effects of obstructive sleep apnea and hypertension on early markers of carotid atherosclerosis. *Hypertension*. 2009;53(1):64–9.
42. Banerjee D, Leong WB, Anora T, Nolen M, Punamiya V, Grunstein R, Taheri S. The potential association between obstructive sleep apnea and diabetic retinopathy in severe obesity—the role of hypoxemia. *PLoS ONE*. 2013;8(11):e79521.
43. Tahrani AA, Ali A, Raymond NT, Begum S, Dubb K, Altaf QA, Piya MK, Barnett AH, Stevens MJ. Obstructive sleep apnea and diabetic nephropathy: a cohort study. *Diabetes Care*. 2013;36(11):3718–25.
44. Tahrani AA, Ali A, Raymond NT, Begum S, Dubb K, Mughal S, Jose B, Piya MK, Barnett AH, Stevens MJ. Obstructive sleep apnea and diabetic neuropathy: a novel association in patients with type 2 diabetes. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;186(5):434–41.
45. Greco C, Spallone V. Obstructive sleep apnoea syndrome and diabetes: fortuitous Association or Interaction? *Curr Diabetes Rev*. 2015;12(2):129–55.
46. Berry RB, Budhiraja R, Gottlieb DJ, Gozal D, Iber C, Kapur VK, Marcus CL, Mehra R, Parthasarathy S, Quan SF, et al. Rules for scoring respiratory events in sleep: update of the 2007 AASM Manual for the Scoring of Sleep and Associated Events. Deliberations of the Sleep Apnea Definitions Task Force of the American Academy of Sleep Medicine. *J Clin Sleep Med*. 2012;8(5):597–619.
47. Johns MW. A new method for measuring daytime sleepiness: the Epworth sleepiness scale. *Sleep*. 1991;14(6):540–5.
48. Perneger TV, Leplege A, Etter JF, Rougemont A. Validation of a French-language version of the MOS 36-Item Short Form Health Survey (SF-36) in young healthy adults. *J Clin Epidemiol*. 1995;48(8):1051–60.
49. McNicholas WT, Bonsignore MR, Levy P, Ryan S. Mild obstructive sleep apnoea: clinical relevance and approaches to management. *Lancet Respir Med*. 2016;4(10):826–34.
50. Sawatari H, Chishaki A, Nishizaka M, Tokunou T, Adachi S, Yoshimura C, Ohkusa T, Ando S. Cumulative hypoxemia during sleep predicts vascular endothelial dysfunction in patients with sleep-disordered breathing. *Am J Hypertens*. 2016;29(4):458–63.
51. Duce B, Milosavljevic J, Hukins C. The 2012 AASM respiratory event criteria increase the incidence of hypopneas in an adult sleep center population. *J Clin Sleep Med*. 2015;11(12):1425–31.
52. Escourrou P, Grote L, Penzel T, McNicholas WT, Verbraecken J, Tkacova R, Riha RL, Hedner J, Group ES. The diagnostic method has a strong influence on classification of obstructive sleep apnea. *J Sleep Res*. 2015;24(6):730–8.
53. Yim-Yeh S, Rahangdale S, Nguyen AT, Stevenson KE, Novack V, Veves A, Malhotra A. Vascular dysfunction in obstructive sleep apnea and type 2 diabetes mellitus. *Obesity (Silver Spring)*. 2011;19(1):17–22.
54. Gagnadoux F, Pepin JL, Vielle B, Bironneau V, Chouet-Girard F, Lanois S, Meslier N, Meurice JC, Nguyen XL, Paris A, et al. Impact of mandibular advancement therapy on endothelial function in severe obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med*. 2017. doi:10.1164/rccm.201609-1817OC.
55. Araujo Lda S, Fernandes JF, Klein MR, Sanjuliani AF. Obstructive sleep apnea is independently associated with inflammation and insulin resistance, but not with blood pressure, plasma catecholamines, and endothelial function in obese subjects. *Nutrition*. 2015;31(11–12):1351–7.
56. Hanis CL, Redline S, Cade BE, Bell GI, Cox NJ, Below JE, Brown EL, Agular D. Beyond type 2 diabetes, obesity and hypertension: an axis including sleep apnea, left ventricular hypertrophy, endothelial dysfunction, and aortic stiffness among Mexican Americans in Starr County, Texas. *Cardiovasc Diabetol*. 2016;15:86.
57. Rodriguez CI, Miyake Y, Grahame-Clarke C, Di Tullio MR, Sciacca RR, Boden-Albala B, Sacco RL, Homma S. Relation of plasma glucose and endothelial function in a population-based multiethnic sample of subjects without diabetes mellitus. *Am J Cardiol*. 2005;96(9):1273–7.
58. Shaw JE, Punjabi NM, Naughton MT, Willes L, Bergenstal RM, Cistulli PA, Fulcher GR, Richards GN, Zimmet PZ. The effect of treatment of obstructive sleep apnea on glycemic control in type 2 diabetes. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016;194(4):486–92.
59. 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(10):919–31.
60. 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.
61. Kayama Y, Raaz U, Jagger A, Adam M, Schellinger IN, Sakamoto M, Suzuki H, Toyama K, Spin JM, Tsao PS. Diabetic cardiovascular disease induced by oxidative stress. *Int J Mol Sci*. 2015;16(10):25234–63.
62. Stradling JR, Schwarz EI, Schlatter C, Manuel AR, Lee R, Antoniadou C, Kohler M. Biomarkers of oxidative stress following continuous positive airway pressure withdrawal: data from two randomised trials. *Eur Respir J*. 2015;46(4):1065–71.
63. Chen LD, Liu JN, Lin L, Wu Z, Li H, Ye YM, Xu QZ, Lin QC. Effect of continuous positive airway pressure on adiponectin in patients with obstructive sleep apnea: a meta-analysis. *PLoS ONE*. 2015;10(9):e0136837.
64. Wagner DD. The Weibel-Palade body: the storage granule for von Willebrand factor and P-selectin. *Thromb Haemostasis*. 1993;70(1):105–10.
65. Dong ZM, Brown AA, Wagner DD. Prominent role of P-selectin in the development of advanced atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Circulation*. 2000;101(19):2290–5.
66. Minoguchi K, Yokoe T, Takaki T, Minoguchi H, Oda N, Tanaka A, Yamamoto M, Ohta S, O'Donnell CP, Adachi M. Silent brain infarction and platelet activation in obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;175(6):612–7.
67. Schiffrin EL. Remodeling of resistance arteries in essential hypertension and effects of antihypertensive treatment. *Am J Hypertens*. 2004;17(12 Pt 1):1192–200.
68. Simpson PJ, Hoyos CM, Celemajer D, Liu PY, Ng MK. Effects of continuous positive airway pressure on endothelial function and circulating progenitor cells in obstructive sleep apnoea: a randomised sham-controlled study. *Int J Cardiol*. 2013;168(3):2042–8.
69. Lian BQ, Keaney JF Jr. Predicting ischemic heart disease in women: the value of endothelial function. *J Am Coll Cardiol*. 2010;55(16):1697–9.
70. Parati G, Lombardi C, Hedner J, Bonsignore MR, Grote L, Tkacova R, Levy P, Riha R, Bassetti C, Narkiewicz K, et al. Recommendations for the management of patients with obstructive sleep apnoea and hypertension. *Eur Respir J*. 2013;41(3):523–38.
71. Fontes-Guerra PC, Cardoso CR, Muxfeldt ES, Salles GF. Nitroglycerin-mediated, but not flow-mediated vasodilation, is associated with blunted nocturnal blood pressure fall in patients with resistant hypertension. *J Hypertens*. 2015;33(8):1666–75.
72. Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA, Deanfield J, Drexler H, Gerhard-Herman M, Herrington D, et al. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol*. 2002;39(2):257–65.
73. Torimoto K, Okada Y, Mori H, Tanaka Y. Relationship between fluctuations in glucose levels measured by continuous glucose monitoring and vascular endothelial dysfunction in type 2 diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol*. 2013;12:1.
74. Fendri S, Rose D, Myambu S, Jeanne S, Lalau JD. Nocturnal hyperglycaemia in type 2 diabetes with sleep apnoea syndrome. *Diabetes Res Clin Pract*. 2011;91(1):e21–3.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at  
www.biomedcentral.com/submit



## **b. Conclusion Projet 2**

Bien que le SAHOS soit une pathologie fréquente chez les patients diabétiques, celle-ci n'a pas d'impact sur la fonction endothéliale évaluée par RH-PAT.

En effet, il n'a pas été retrouvé d'effet additionnel de la sévérité du SAHOS sur la fonction endothéliale déjà altérée de ces patients du fait de leur pathologie métabolique. De plus, l'absence de modification de la concentration des MV issues des cellules endothéliales activées (MV62E+) circulantes renforce l'idée que le SAHOS n'aggrave pas la DE chez les patients DT2.

Ces résultats sont tout à fait concordants avec ceux de la méta analyse du projet 1 qui, pour rappel, ne trouvait pas de risque majorée de DE chez les patients apnéiques qui présentent également une comorbidité associée telle que l'obésité, l'HTA et le diabète.

Cependant, nous avons pu remarquer que la sévérité des apnées est associée à une augmentation de marqueurs de risque CV clinique et biologique tels que la tension artérielle systolique, la diminution de la concentration circulante de l'adiponectine ainsi qu'une augmentation de la P-sélectine soluble.

L'augmentation des MV issues des plaquettes activées (MV62P+) associée à celle de la P-sélectine fait suspecter un effet pro-coagulant du SAHOS sévère dans cette population.

## **4. Conclusion partie 1**

La DE est un des mécanismes centraux des complications cardio-vasculaires au cours du SAHOS. Grâce à la méta analyse, nous avons pu confirmer que le SAHOS, d'autant plus s'il est sévère, augmente de façon significative le risque de DE chez des patients n'ayant par ailleurs aucune pathologie CV connue. Cependant, ceci est vrai uniquement chez les patients ne présentant pas les comorbidités suivantes : obésité, diabète et HTA.

Ces résultats corroborent les données de l'étude DIVAS qui a évalué l'impact du SAHOS sur la fonction endothéliale des patients diabétiques. En effet, nous n'avons pas retrouvé de corrélation entre la présence d'un SAHOS et un risque accru de DE. Ceci peut s'expliquer par le fait que le diabète, comme les autres comorbidités à savoir l'obésité et l'HTA, est lui-même responsable d'une DE telle, que l'impact du SAHOS n'est pas identifiable.

Deux essais thérapeutiques (cf Annexes) ont été réalisés afin d'évaluer l'efficacité de 2 traitements différents que sont l'orthèse d'avancé mandibulaire (OAM), pour l'étude VASOAM, et les polyphénols, pour l'étude PolySAS.

L'étude VASOAM portait sur des patients apnéiques sévères, sans pathologies CV connues. L'efficacité de l'OAM a été évaluée après 2 mois de traitement. La conclusion est que l'OAM, bien qu'améliorant le SAHOS avec une diminution significative de l'IAH, n'a aucun effet sur la DE ou sur la tension artérielle. Cette étude était en intention de traiter et n'excluait donc pas les patients non répondeurs lors de la titration de l'OAM. Par ailleurs, bien que les patients ne présentaient pas de complications CV, un grand nombre d'entre eux avait des comorbidités associées au SAHOS : 20% de patients hypertendus, 5% de diabétiques et le BMI moyen de notre population était de 27kg/m<sup>2</sup>. Or, nous avons pu mettre en évidence grâce aux résultats de la méta analyse, que le SAHOS ne favorise pas la DE chez les patients avec des co morbidités. Ceci peut expliquer le fait que l'OAM ne modifie pas la fonction endothéliale chez des patients apnéiques avec comorbidités.

L'étude PolySAS s'intéressait à l'effet d'un traitement d'un mois avec des polyphénols sur la fonction endothéliale de patients apnéiques sévères sans pathologie CV. Là encore, il n'a pas été montré d'efficacité de ce traitement sur la DE. Mais, tout comme l'étude VASOAM, une explication possible est la présence, chez ces patients, de comorbidités (BMI moyen : 30kg/m<sup>2</sup>, 10% de patients hypertendus et 5% de patients diabétiques).

Ces différentes études sont concordantes pour dire que le SAHOS favorise la DE uniquement chez les patients naïfs de toute autre comorbidité, ce qui peut expliquer une absence d'efficacité des thérapies sur la fonction endothéliale chez une population sans pathologie CV connue mais obèse, hypertendue et diabétique.

## **Partie 2 : SAHOS et miRNA**

### ***Projet 3 : Modifications phénotypiques des miRNAs transportés par les microvésicules chez les patients apnéiques***

#### **1. Objectif**

Dans le cadre du SAHOS, le taux global des MV circulantes est similaire chez les sujets sains ou porteurs d'un SAHOS. Cependant, leur phénotype diffère. En effet, comme nous l'avons déjà vu, notre groupe a pu montrer une augmentation du taux de MV circulantes issues des lymphocytes activés, exprimant CD62L. Les MV circulantes au cours de cette pathologie vont agir directement sur la CE. Elles vont être responsables d'une diminution de la biodisponibilité du NO ainsi que d'une augmentation de l'expression des molécules d'adhésion de l'endothélium. Les MV au cours du SAHOS sont également responsables d'une hyperréactivité vasculaire avec un rôle central et obligatoire de l'endothélium.

Parmi les molécules bioactives transportées par les MV, comme précédemment décrit, on retrouve les miRNA. Ces petits segments d'ARN simple brin, non codant possèdent un rôle dans le contrôle post transcriptionnel. Or, différentes études ont montré leur implication dans la DE et les maladies CV.

L'objectif de ce travail est donc dans un premier temps, de préciser le contenu en miRNA des MV, et de définir leur implication dans la DE médiée par les MV qui a déjà pu être démontrée : production du NO, expression de molécules d'adhésion, capacité proangiogénique...

A terme, l'objectif serait de déterminer d'éventuels miRNA qui puissent être des marqueurs biologiques afin d'identifier les patients apnéiques les plus à risque de complications CV et éventuellement d'en faire une cible thérapeutique.

## **2. Travail en cours : Méthodes, résultats et difficultés.**

Pour cela, 40 patients SAHOS et 40 sujets sains sont inclus parmi les patients explorés pour une suspicion clinique de SAHOS. Les critères d'inclusion sont les suivants : âge supérieur à 18 ans, sexe masculin, absence de traitement préalable du SAHOS, signature du consentement de participation à l'étude, affiliation au régime de sécurité social. Les critères d'exclusion sont quant à eux : antécédent de pathologie cardiaque ou vasculaire, HTA connue et/ou traitée, diabète connu et/ou traité, dyslipidémie connue et/ou traitée, IMC supérieur à 35 kg/m<sup>2</sup>, patient traité par antiagrégant plaquettaire ou anti inflammatoire non stéroïdien, pathologie inflammatoire chronique connue et/ou traitée, personne majeur faisant l'objet d'une protection renforcée, privée de liberté par décision judiciaire ou administrative, personne non affiliée à un régime de sécurité sociale, être dans une période d'exclusion relative à une autre étude biomédicale, non obtention du consentement., déficience mentale, personne mineure.

Ces sujets sont par la suite appariés sur l'âge, l'IMC, le statut tabagique, les pressions artérielles systolique et diastolique, et la présence d'un éventuel trouble métabolique non connu : DT2 (glycémie à jeun, HbA1c) et dyslipidémie (HDLc, LDLc).

### **a. Recueil des données cliniques et para cliniques**

Dans le cadre de l'exploration d'un trouble respiratoire au cours du sommeil, l'ensemble de ces sujets bénéficient d'une polysomnographie réalisée dans le laboratoire du Sommeil du CHU d'Angers.

Les patients sont considérés comme SAHOS lorsque l'IAH est supérieur à 15/heure. Dans le cas contraire, ils sont considérés comme contrôles. De la même façon, un patient est considéré désaturateur si l'index de désaturation (diminution de plus de 4% de la saturation en oxygène) est supérieur à 15/heure. Dans le cas contraire, il est considéré comme non désaturateur.

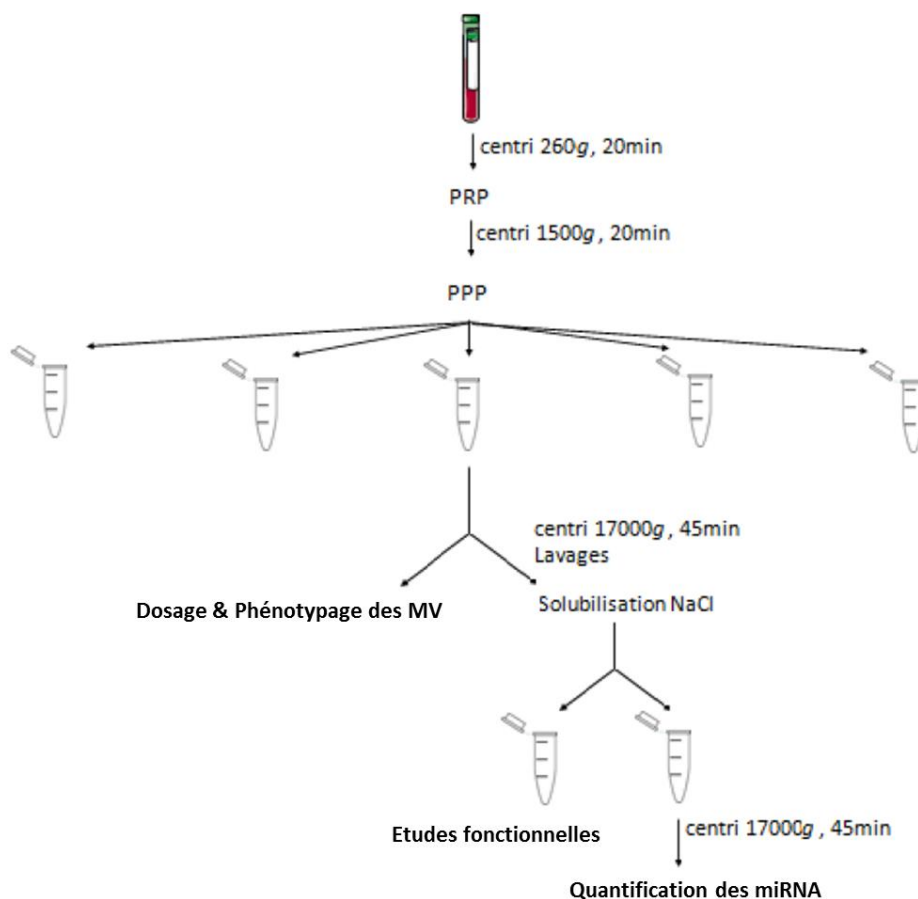
Au cours de cette hospitalisation, les patients remplissent un questionnaire standardisé sur les troubles du sommeil.

Un bilan sanguin est également réalisé, le matin à jeun, avant l'évaluation de la fonction endothéliale, de façon à ce que l'ischémie transitoire du membre supérieure ne modifie pas les résultats. Ce bilan comprend : une numération formule sanguine, un taux de plaquettes, un bilan lipidique complet, une glycémie, une hémoglobine glyquée, une CRP. Trois tubes EDTA de 5 à 6 ml sont destinés à l'étude des MV.



## b. Isolement des MV

Les MV sont isolées à partir des échantillons sanguins dans les 2 heures après la réalisation du prélèvement. Une première centrifugation du sang préalablement transféré dans des tubes de 15ml type Falcon est réalisée à 260g pendant 20minutes, avec décélération. Le plasma riche en plaquettes (PRP) est récupéré dans un tube Falcon puis est ensuite centrifugé à 1500g pendant 20minutes. Le plasma pauvre en plaquette (PPP) est collecté et aliquoté dans des tubes Eppendorfs. Une partie de ces tubes est congelée à -80°C pour dosage et phénotypage des MV. Pour les autres tubes Eppendorfs, les MV circulantes seront séparées du plasma par centrifugation (17000g pendant 45minutes) puis lavées avec du NaCl 0.9% stérile afin d'éliminer toute protéine ou autre composant soluble. Les MV concentrées ainsi obtenues sont solubilisées dans 300µl de NaCl 0.9% stérile dont 150µl sont conservés à 4°C pour les études fonctionnelles. Les 150µl restant sont centrifugés à 17000g pendant 45 min puis le culot sec congelé à -80°C pour quantification des miRNA. Les MV ont été isolées entre 2014 et 2016.

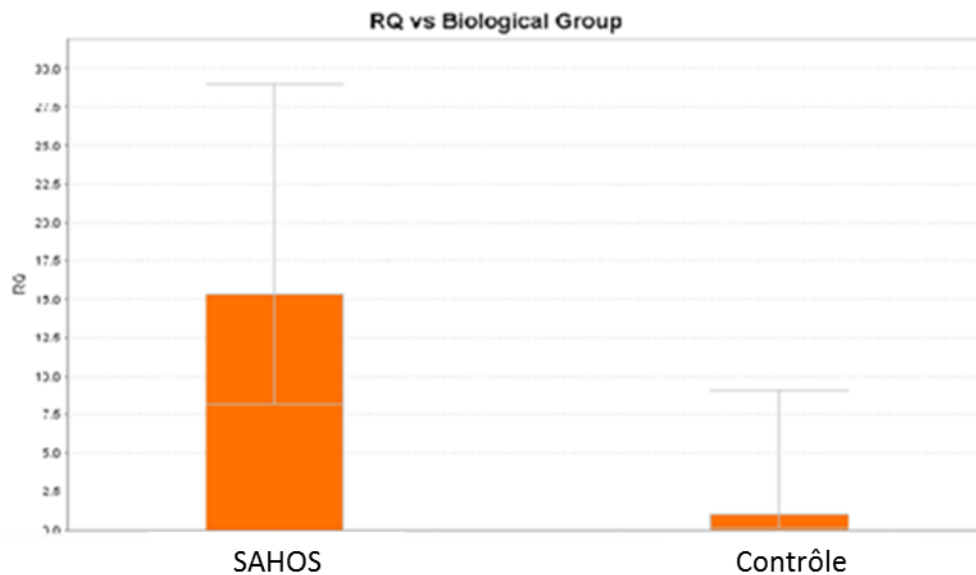


**Figure 17.** Isolement des MV issues d'un patient.

## c. Etude des miRNA

### i. Screening des miRNA

Un screening des miRNA contenus dans les MV est réalisé sur 15 paires de sujets appariés : 15 sujets contrôles et 15 patients apnéiques. Les culots secs de MV sont envoyés dans de la carboglace à l'Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires de Toulouse (INSERM UMR U1048). L'ARN total est isolé à partir des MV par le kit de haute sensibilité TaqMan Low Density Array (Applied biosystem), qui couvre tous les miARN humains connus, selon les recommandations du fournisseur. Les miARN sont quantifiés par qRT-PCR. Un lien de corrélation est recherché entre l'expression des miARN, les données clinico-biologiques et la fonction endothéliale. Parmi les 960 miARN analysés, sept présentent une expression différentielle entre les échantillons de patients non désaturateurs et les désaturateurs. On retrouve une surexpression de 3 miRNA : miR205, miR548b et miR548c, ainsi qu'une sous expression des 4 suivants : miR146a, miR609, miR636 et miR645. En fonction des données de la littérature, deux miARNs sont retenus comme ayant une fonction régulant le système CV : miR146a qui est sous-exprimé chez les patients issus du groupe SAHOS sévère par rapport au groupe contrôle, et miR205 qui est sur-exprimé dans le groupe SAHOS sévère par rapport au groupe contrôle.



**Figure 18.** Quantification relative du miR205 chez les patients apnéiques et les sujets contrôles.

## **ii. Confirmation des miRNA d'intérêt par qRT-PCR :**

### **1. Extraction des miRNA**

L'extraction des miRNA à partir des MV conservées à 4°C est réalisée grâce au miRNeasy Micro Kit (cat. No. 217084).

Du fait d'une quantité peu importante de matériel dans les échantillons de 150µl, nous utilisons l'ensemble de l'échantillon auquel nous rajoutons 700µl de QIAzol Lysis Reagent. Puis, le mélange est homogénéisé et incubé par la suite 5 minutes à température ambiante. Nous rajoutons ensuite 140µl de chloroforme. Le mélange est également homogénéisé puis incubé pendant 2-3 minutes à température ambiante. Le mélange est ensuite centrifugé pendant 15 minutes à 12000g à 4°C. La phase aqueuse supérieure est transférée dans un autre tube de collection et nous ajoutons de l'éthanol 100% à un volume correspondant à 1,5 du volume de la phase aqueuse récupérée. L'ensemble est mélangé en pipetant.

Sept cents µl de cet échantillon est pipeté dans une colonne RNeasy MinElute, dans un tube collecteur de 2ml. On réalise alors une centrifugation à 12000g pendant 15 secondes à température ambiante. Nous repassons sur la colonne le liquide qui a traversé la membrane et recommençons cette étape.

Nous réalisons ensuite une DNase digestion. Pour cela, nous déposons 350µl de BufferRWT dans la colonne et réalisons une centrifugation pendant 15 secondes à plus de 8000g. Puis, on ajoute 10µl de DNase I stock solution à 90µl de Buffer RDI dans un Eppendorf et nous mélangeons doucement le mélange. Nous déposons 95µl de cette solution (DNase I incubation Mix) directement sur la membrane de la colonne. Nous réalisons une incubation pendant 15min à température ambiante. Puis nous ajoutons 500µl de Buffer RWT dans la colonne qui est ensuite centrifugée 15 secondes à plus de 8000g.

Puis, il est déposé 500µl de Buffer RPE dans la colonne avant de réaliser une nouvelle centrifugation identique à la précédente.

Nous ajoutons 500µl d'éthanol 80% dans la colonne et réalisons une centrifugation de 2 minutes à 12000g.

Nous plaçons par la suite la colonne dans un nouveau tube de collection de 2ml. Après ouverture du couvercle de la colonne, une centrifugation à vitesse maximale est réalisée pendant 5 minutes afin d'assécher la membrane.

La colonne est ensuite placée dans un nouveau tube collecteur de 1.5ml. Nous ajoutons 20µl de RNase free water sur le centre de la membrane de la colonne. Nous réalisons ensuite une centrifugation d'une minute à vitesse maximale. Nous redéposons le liquide filtré sur la membrane avant de recommencer cette étape.

Les miR sont ensuite stockés à -80°C.

## **2. RT-PCR**

Afin de réaliser la RT-PCR, nous dosons la quantité d'ARN présents dans les échantillons sur le NanoDrop. La quantité moyenne sur les différents échantillons est de 10ng/ $\mu$ l. Nous préparons ensuite le RT master mix (miScript II RT Kit – cat. Nos. 218160) comme suit : pour un échantillon 2 $\mu$ l de miScript HiSper Buffer, 1 $\mu$ l de miScript Nucleics Mix, 1 %l de miScript Reverse Transcriptase Mix, 20ng de RNA de l'échantillon (en moyenne 2 $\mu$ l) et de la RNase-free water dont le volume sera ajouté pour obtenir un volume total de 10 $\mu$ l soit en moyenne 4 $\mu$ l. Puis nous réalisons une incubation d'une heure à 37°C puis 5 minutes à 95°C. Les échantillons sont ensuite conservés à 4°C.

## **3. qPCR**

La q-PCR est réalisée à l'aide du kit miScript SYBR Green PCR Kit. Nous préparons ensuite la solution selon ce protocole : 12.5 $\mu$ l de QuantiTect SYBR Green PCR master mix, 2.5 $\mu$ l de miScript Universal Primer, 2.5 $\mu$ l de miScript Primer essay (15a et 205), 5.5 $\mu$ l d'H<sub>2</sub>O et 2 $\mu$ l d'échantillon de cDNA.

Après avoir déposé les différents mix en fonction de miRNA dosés, sur une plaque 96 puits, nous réalisons la q-PCR avec le programme suivant :

- 15 minutes à 95°C
- 15 secondes à 94°C
- 30 secondes à 55°C
- 30 secondes à 70°C.

Et ce pendant 40 cycles.

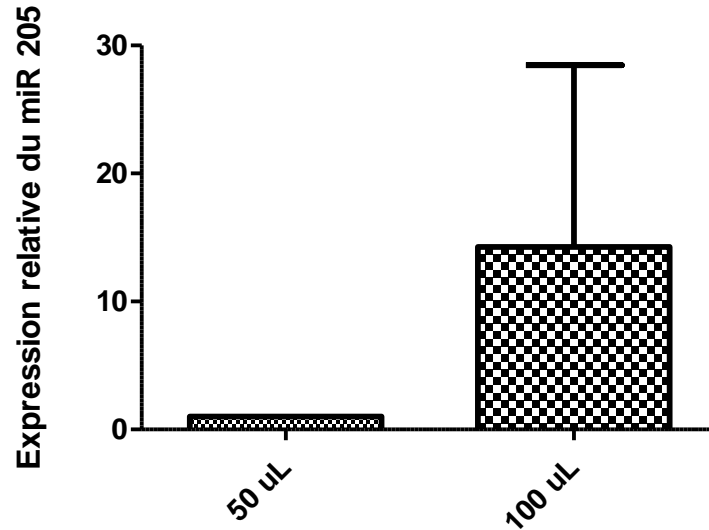
La quantification est relative en fonction de la quantité du miR référent utilisé, à savoir miR15a.

La qPCR est réalisé pour les miR d'intérêt retenus car connus pour être impliqués dans des pathologies cardio-vasculaires, pour rappel le miR205 surexprimé chez nos patients apnéiques et le miR146a sous exprimé.

La technique est très difficile à mettre au point compte tenu d'une quantité très faible des miRNA dans les MV. Lors des 1eres RT-qPCR, aucun des miRNA dosés (U6, 15a, 205 et 146a) n'était détecté. Nous avons donc changé de kit et réalisé une gamme de volume nécessaire à la quantification.

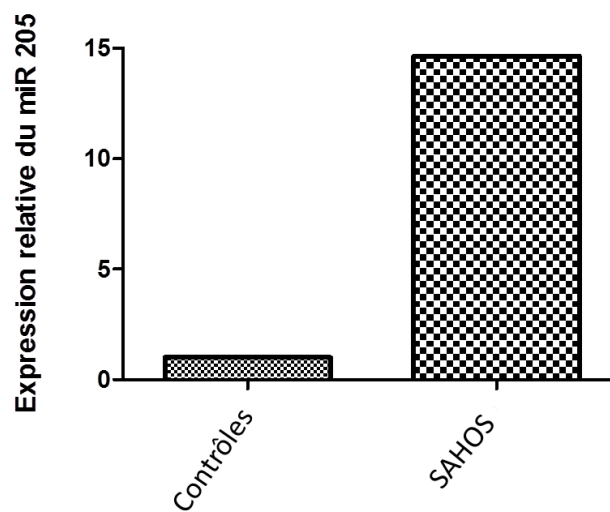
L'hypothèse explicative retenue est une quantité infime et insuffisante de matériel. D'autant plus qu'après quantification des MV, nous nous sommes rendu compte qu'après 3 à 4 ans de conservation à 4°C, les échantillons sont altérés et qu'il ne reste que peu de MV et donc de miRNA dans leur contenu.

Malgré nos tentatives, le miR146 reste indosable. Nous avons donc pris le parti de ne nous intéresser qu'au miR205.



**Figure 19.** Expression du miR205 dans les MV de sujets sains en fonction du volume d'échantillon utilisé.

Après avoir mis en place la technique sur des sujets témoins, nous avons réalisé les dosages sur les couples de sujets appariés. Bien que les résultats des dosages de miR205 des 2 premières paires de patients soit compatibles avec les résultats de Toulouse (figure 18), par la suite, les résultats sont beaucoup plus aléatoires et non reproductibles.



**Figure 20.** Expression relative du miR205 (n=2).

#### **d. Transfection des miR synthétiques et antagomir**

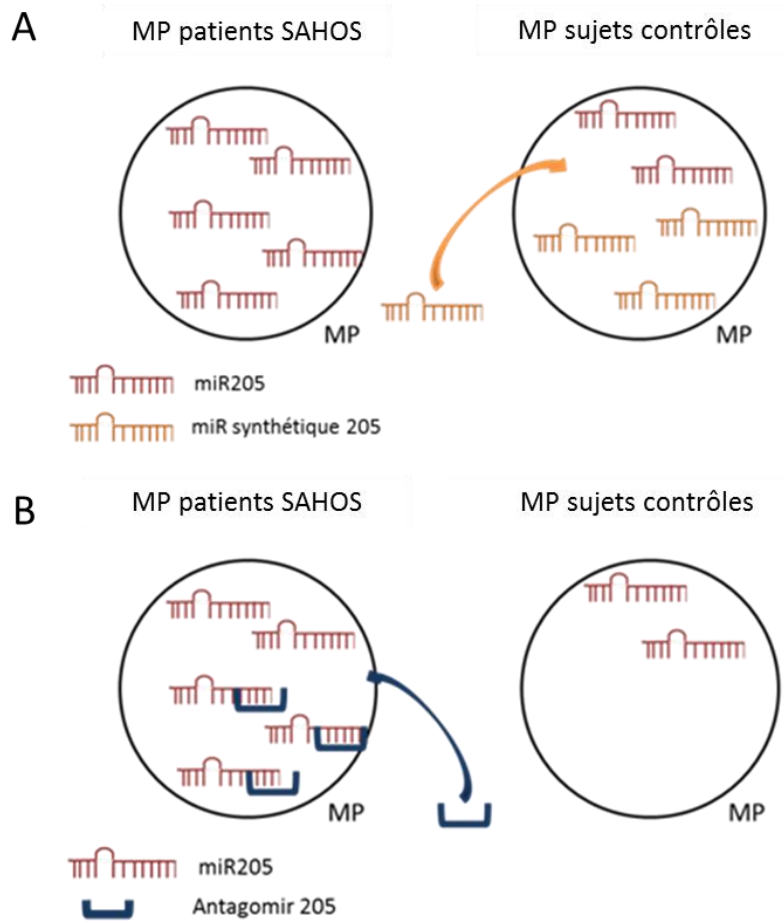
Dans le but d'évaluer l'implication de miR205 dans la dysfonction endothéliale médiée par les MV circulantes de patients apnéiques, nous avons utilisé la technique de transfection.

L'objectif est d'augmenter la concentration de miR205 dans les MV des sujets contrôle afin de mimer celle des patients SAHOS. A l'inverse, en transfectant un antagomir dans les MV des sujets apnéiques, celui-ci va se fixer sur le miR205 et ainsi inhiber son activité. On espère ainsi pouvoir mimer l'activité des MV des sujets sains à partir des MV des patients SAHOS (figure 19).

Pour cela, nous déposons dans un tube Eppendorf :

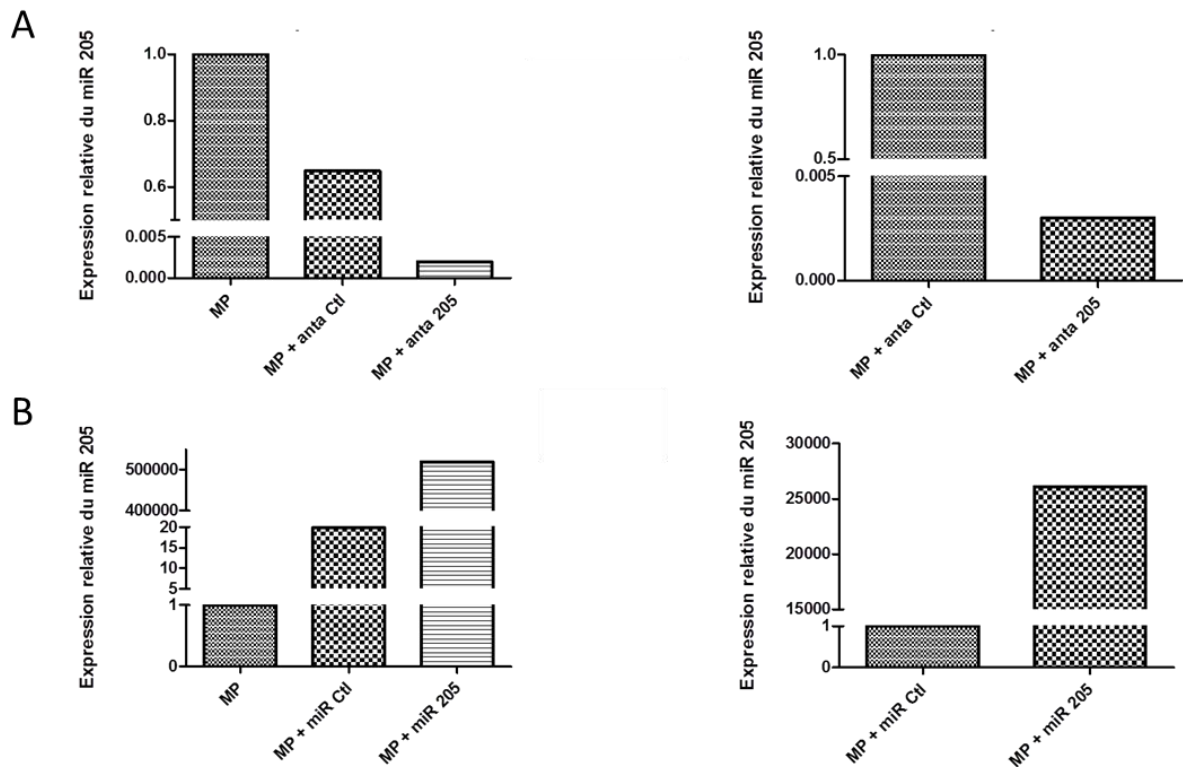
- 10µl d'Exo-Fect solution du kit Exo-Fect Exosome Transfection Reagent (EXFT10A-1)
- 20µl d'acide nucléique
- 70µl de sérum physiologique
- l'ensemble des MV isolées et re suspendues dans 50µl de sérum physiologique

Après mélange manuel, nous laissons incuber l'ensemble à 37°C pendant 10 minutes dans un agitateur. Puis les tubes sont immédiatement placés dans de la glace. Pour arrêter la réaction, nous ajoutons de l'ExoQuick-TC que nous mélangeons là encore manuellement. Les tubes sont ensuite placés à 4°C pendant 30min. Les échantillons sont ensuite centrifugés pendant 3 minutes à 17000g. Après avoir retiré le surnageant, nous resuspendons les MV transfectés dans 150µl de sérum physiologique. Les MV ainsi transfectées sont par la suite conservées à 4°C.



**Figure 21.** Schématisation de la transfection des miR205 synthétique dans les MV des sujets contrôles (A), et des antagomir 205 dans les MV des patients apnéiques (B).

Afin de s'assurer que la technique de transfection soit fonctionnelle, nous avons réalisé une RT-qPCR sur les MV transfectées. Nous avons ainsi pu valider la technique (figure 20).



**Figure 22.** RT-qPCR du miR205 contenu dans les MV circulantes après transfection d'antagomir dans les MV de patients SAHOS (A) et de miR205 synthétique dans les MV de sujets contrôles (B). n=3.

### e. Culture cellulaire

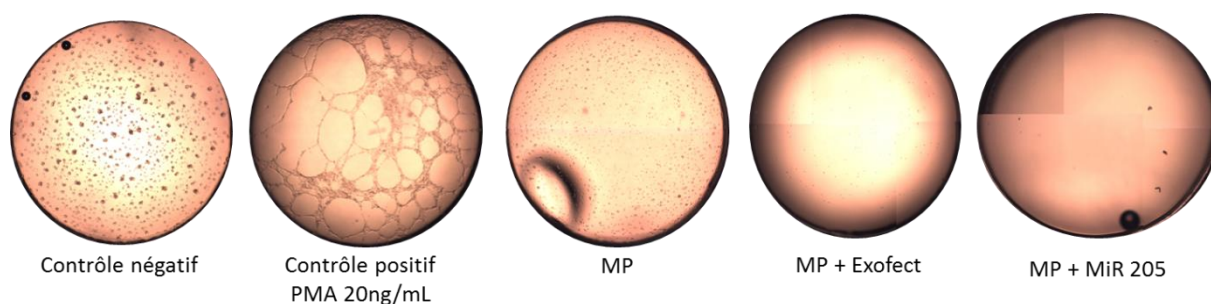
Afin d'évaluer le rôle du miR205 transporté par les MV sur la fonction endothéliale in vitro, nous avons utilisé les cellules EAhy926. Il s'agit de CE de veine ombilicale humaine immortalisées. Elles sont cultivées dans un milieu comprenant : Ham's-F12, DMEM high glucose (glucose 4.5g/l), 1% de Na Pyruvate, 1% de L-Glutamine, 1% de Pénicilline-streptomycine et 10% de sérum de veau fœtal. Le milieu est ensuite changé toutes les 48h. Pour l'ensemble des manipulations, les cellules sont utilisées à un passage inférieur à 10.



## f. Angiogenèse

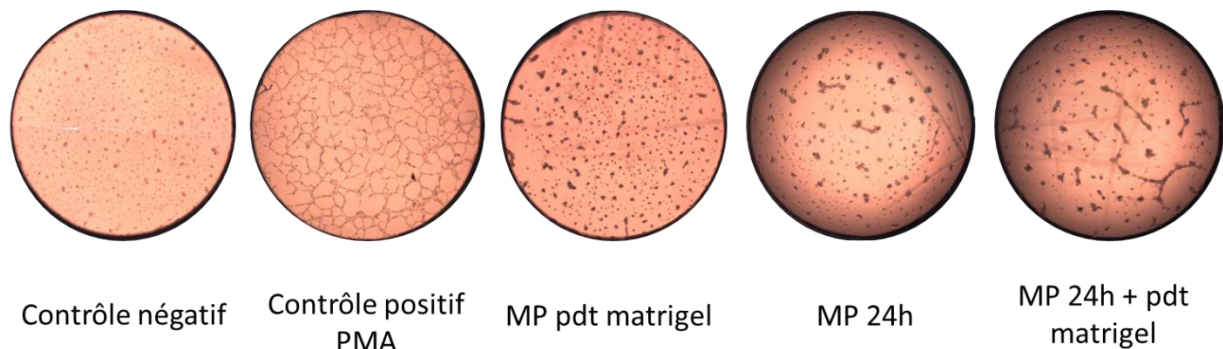
L'angiogenèse ou capacité des CE à former des capillaires est étudiée en utilisant le Matrigel (Sigma-Aldrich), une matrice extra-cellulaire riche en facteurs de croissance qui permet aux CE de s'organiser et de former des structures tubulaires similaires aux capillaires. Sur des plaques IBIDI 15 puits d'une surface de  $0.125 \text{ cm}^2$ , on dépose  $10 \mu\text{L}$  de Matrigel froid par puits. Après polymérisation du Matrigel à  $37^\circ\text{C}$ , on dépose 12000 cellules. Les cellules sont traitées en fonction de différentes conditions : contrôle (cellules non traitées), contrôle positif (cellules traitées avec du PMA) et traitement par les MV des patients apnéiques non transfectées ou transfectées avec l'antagomir 205, et les MV des sujets contrôles, non transfectées ou transfectées avec les miR synthétiques 205. Le traitement par les MV se fait à la concentration circulante. Puis, l'angiogenèse est évaluée à 4 heures et 8 heures.

Lors des premiers résultats, nous constatons une mort cellulaire importante dès lors que les cellules sont traitées par les MV transfectées. En traitant les cellules mises en contact avec l'exoFect sans agent transfecté, nous faisons la même constatation. Nous concluons donc que l'agent de transfection est toxique pour la cellule. Par la suite, nous réalisons alors un lavage supplémentaire avant de resuspendre les MV transfectées (figure 21).



**Figure 23.** Angogenèse des cellules EAhy926 sur puits Ibidi dans les différentes conditions de culture.

Nous avons également cherché à optimiser les conditions de culture et les différents temps de traitement. Nous avons ainsi traité les cellules uniquement sur plaque Ibidi, lors du matrigel. Nous avons également traité les cellules pendant les 24h qui précèdent le matrigel et enfin nous avons réuni les 2 conditions à savoir un traitement 24h avant mais également durant le matrigel. Nous avons mis en évidence, que bien que l'angiogenèse soit faible, l'efficacité des MP semble plus marquée lorsque le traitement est à la fois avant et pendant le matrigel (figure 22).



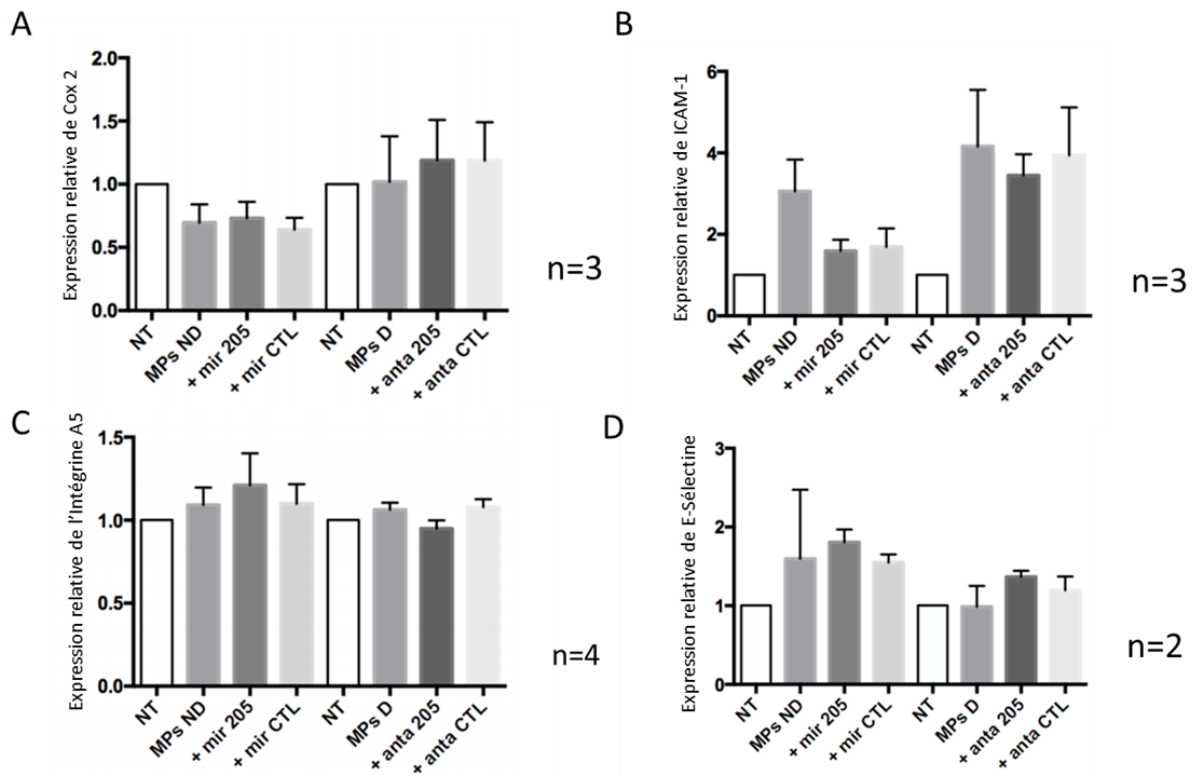
**Figure 24.** Matrigel lors des différentes conditions de traitement.

Par la suite, nous avons poursuivi le matrigel dans les conditions sus définies. Cependant, dès lors que les cellules sont traitées par les MV, de sujets sains ou patients contrôles, transfectées ou non, nous constatons une surmortalité cellulaire qui ne nous permet pas de conclure quant à l'effet du miR205 ou même des MV. Les hypothèses expliquant ce phénomène sont celles de MV très altérées ou de MV contaminées du fait d'une conservation trop longue, à 4°C.

### **g. Western Blot**

Les CE EAhy926 sont traitées pendant 24 heures par les MV, à concentration circulante, des 2 groupes de sujets, sans et avec transfection des miR205 synthétiques ou antagomirs 205. Ensuite, les cellules sont lysées par la technique de congélation afin de récupérer les protéines. La concentration protéique est mesurée par dosage grâce à la méthode de Lowry. Du fait d'une faible quantité de protéines que nous avons à notre disposition, 20µg issues des différentes conditions sont déposés sur les gels BioRad. Après migration par électrophorèse (90min à 130 Volts), le transfert est réalisé sur une membrane grâce au Kit Trans-Blot Turbo Transfer system. Le Western-Blot est réalisé à l'aide des anticorps primaires spécifiques par immunoBlot (LI-COR).

Les difficultés rencontrées pour cette technique sont les mêmes que pour l'étude de l'angiogenèse. En effet, la mort cellulaire après traitement par les MV qu'elles soient transfectées ou non, est majeure. Nous avons donc très peu de matériel et de protéines pour réaliser les Western-Blot. Nous avons cependant commencé à étudier l'expression des protéines pro-inflammatoires que sont : Cox 2, ICAM-1, E-Sélectine et l'Intégrine A5, et ce pour 3 couples de patients appariés. Les résultats portent sur de faibles effectifs (N=2/4). Cependant, il semblerait que miR205 augmente l'expression de l'Intégrine A5 et qu'il n'est aucun effet sur Cox 2. Concernant l'E-Sélectine et ICAM-1, les résultats sont, à ce jour, très discordants (Figure 23).



**Figure 25.** Expression des protéines pro-inflammatoires en fonction des conditions de culture des cellules EAhy926.  
NT : non traitée

### **3. Conclusion**

A ce stade, il nous est impossible de conclure compte tenu des résultats actuels qui sont pour certains discordants.

Cependant, il semblerait que le phénotype des miR présents dans les MV soit différent chez les patients présentant un SAHOS sévère. Certains de ces miR ont été décrits comme impliqués dans la physiopathologie de maladies CV. Cela pourrait donc expliquer celles observées au cours du SAHOS. Leurs mécanismes d'action sont encore à préciser, notamment en termes d'angiogenèse, d'expression protéique, de biodisponibilité du NO, grâce à l'utilisation des miR synthétiques et antagomirs.

## Discussion générale

Ce travail a porté sur l'implication et l'importance du SAHOS dans le développement de complications CV au cours de cette pathologie. Nous avons pu ainsi mettre en évidence le rôle du SAHOS sur l'apparition d'une DE, chez les patients indemnes de toute pathologie CV. Ceci est vrai uniquement en l'absence de comorbidités associées telles que l'HTA, l'obésité ou le diabète. Cette DE va favoriser l'apparition de pathologies CV ultérieures. Ces résultats corroborent avec l'ensemble des données de la littérature de ces dernières années qui décrit le SAHOS comme un facteur de risque CV. En effet, il est retrouvé une nette augmentation de la prévalence de l'ensemble des pathologies CV dans cette population. Cependant, une réserve persiste du fait des 1<sup>ers</sup> résultats de l'étude ISAAC en cours (Sanchez de la Torre et al., 2019) qui va à l'encontre de ces résultats. En effet, le taux d'événements cardiovasculaires a été retrouvé identique chez les patients non SAOS (90 événements [14.95%]) et les SAOS non traités par PPC ( $p=0,28$ )

L'implication du SAHOS dans la DE n'est pas retrouvée chez les patients diabétiques de type 2. En effet, ces derniers présentent du fait de leur pathologie, une DE qui peut être importante. Or, nous n'avons pas retrouvé de majoration de cette DE si les patients diabétiques cumulent en plus un SAHOS. Il n'y aurait donc pas d'effet additif de ces 2 pathologies sur la DE, et ce quel que soit la sévérité du SAHOS et de l'HI qui en résulte. Ces résultats pourraient s'expliquer par une sensibilité et une précision insuffisante de l'EndoPAT qui ne met donc pas en évidence les répercussions fonctionnelles du SAHOS sur l'endothélium. Cette hypothèse de sensibilité insuffisante de la technique a été émise par l'équipe de Schwarz, chez le patient obèse (Schwarz et al., 2015). Il semblerait cependant compliqué de pouvoir identifier avec certitude l'importance du SAHOS dans la DE observée chez les patients diabétiques du fait de co facteurs de risque CV souvent associés (l'obésité, l'âge, le sexe...). Cette absence d'effet sur la fonction endothéliale peut être appuyée par le fait que la concentration de MV issues des cellules endothéliales activées n'est pas modifiée que les patients diabétiques soient également apnéiques ou non. Ceci suggère, tout comme les résultats des études précédentes, que le DT2 a un effet délétère sur la fonction endothéliale majeur, de telle sorte que la DE ne puisse pas être aggravée par le SAHOS.

Le stress oxydant est un mécanisme également impliqué dans la DE. Or, contrairement à ce que l'on aurait pu imaginer, nous retrouvons une diminution du 8-isoprostane (marqueur circulant du stress oxydant). Ces résultats corroborent à ceux d'une étude randomisée récente qui a également montré une diminution des marqueurs urinaires après une période d'HI (Stradling et al., 2015). Ceci laisse supposer que des mécanismes adaptatifs se mettent en place en cas d'HI (Lavie, 2015).

Parallèlement à cela, il semblerait que la présence d'un SAHOS, d'autant plus s'il est sévère, favorise un état pro-coagulant comme le laisse suggérer l'élévation de la P-sélectine ainsi que des MV issues des plaquettes activées.

Les données actuelles de la littérature, en l'absence de résultats contraires publiés à ce jour, confirment le rôle du SAHOS sur l'apparition de pathologies CV, via la DE. Ces pathologies peuvent être très variées allant de l'HTA, à l'IDM en passant par l'AVC. Le

SAHOS est donc un facteur de risque CV à part entière, à prendre en compte et à traiter lors de la prévention secondaire mais également primaire.

Il serait donc attendu qu'une prise en charge adaptée de SAHOS, quel que soit la thérapeutique, puisse diminuer ce risque CV en normalisant la fonction endothéliale. Or, les données actuelles sont extrêmement contradictoires. Ceci peut s'expliquer entre autres par une grande hétérogénéité à la fois des populations de patients inclus mais également de traitement et de durée de prise en charge. Il semblerait qu'un schéma d'étude en intention de traiter soit plus péjoratif en termes de réponse attendu d'un point de vue CV.

Le traitement de première intention du SAHOS sévère est la PPC. Or, elle permettrait d'améliorer la prévention secondaire (Wang et al., 2013) mais également la prévention primaire (Khan et al., 2018). Le risque CV semble diminuer sous PPC d'autant plus chez les patients apnéiques lorsqu'ils sont obèses, et en présence de multiples comorbidités (Joyeux-Faure et al., 2018a). Cependant, ces bénéfices en termes de prévention se confirment uniquement lors d'une bonne observance de la thérapeutique définie par une utilisation supérieure à 4 heures par nuit. Des données permettent de conclure que la ventilation permet également de diminuer la tension artérielle nocturne (Joyeux-Faure et al., 2018a) mais également diurne (Lei et al., 2017; Martínez-García et al., 2013) chez les patients hypertendus, d'autant plus lorsqu'il s'agit d'une HTA sévère et résistante à la thérapeutique médicamenteuse classique (Dernaika et al., 2009). Ces données se confirment également chez les patients hypertendus et diabétiques (Lam et al., 2017; Xu et al., 2019). Ce contrôle des complications des apnées du sommeil peut s'expliquer par différentes hypothèses. La 1<sup>ère</sup> est que la PPC permet d'améliorer les mécanismes du contrôle tensionnel (Casitas et al., 2017). La 2<sup>nd</sup> est une amélioration de la fonction endothéliale sous PPC (Cross et al., 2008; Schwarz et al., 2015; Tulmaç et al., 2012; Xu et al., 2015), passant entre autre par une diminution des récepteurs à l'angiotensine-1 (Khayat et al., 2018). Enfin, il a été décrit que la PPC améliore la vitesse d'onde de pouls, ce qui reflète une amélioration de la rigidité vasculaire (Domingues et al., 2019).

Parallèlement à ces nombreuses études, d'autres tout aussi nombreuses et récentes vont à l'encontre de ces résultats. En effet, ces équipes ont montré que la PPC ne permet pas d'améliorer la prévention du risque d'apparition de maladie CV chez les patients apnéiques (da Silva Paulitsch and Zhang, 2019; McEvoy et al., 2016; J. Yu et al., 2017). De la même façon, il a été montré que la PPC n'améliore ni le risque d'apparition de pathologie CV ni les chiffres tensionnels (Barbé et al., 2012; Peker et al., 2016; Simpson et al., 2013). Contrairement à ce qui a été décrit précédemment, d'autres équipes n'ont pas retrouvé d'amélioration de la fonction endothéliale chez les patients apnéiques traités par PPC (Jones et al., 2013; Turnbull et al., 2017).

Un autre traitement peut être envisageable en 2<sup>ème</sup> intention devant un SAHOS : l'OAM. Là aussi, les données de la littérature sont extrêmement contradictoires puisque certaines études montrent un bénéfice de ce traitement sur la fonction endothéliale et les maladies CV qui peuvent en découler (de Vries et al., 2018; Itzhaki et al., 2007; Phillips et al., 2013), alors que d'autres n'en retrouvent aucun (Gagnadoux et al., 2017b).

Au vu de ces données extrêmement contradictoires, et afin d'améliorer le risque CV réel chez les patients apnéiques, il pourrait être intéressant, non pas de jouer sur la présence du SAHOS mais plutôt de chercher à cibler les mécanismes impliqués dans l'apparition de la DE.

Dans la littérature, il n'existe pas de travaux de ce type. Par contre, des équipes se sont intéressées à une prise en charge médicamenteuse spécifique de la complication CV et notamment de l'HTA. D'autres se sont penchés sur la possibilité de cibler directement le mécanisme responsable de la pathologie, à savoir pour un grand nombre d'entre elles, la DE.

Certaines équipes, et notamment celles de Joyeux-Faure et Toraldo (Joyeux-Faure et al., 2014; Toraldo et al., 2017) ont montré que les statines permettent de prévenir de façon satisfaisant les complications CV liées au SAHOS. Il est acquis que l'Atorvastatine permet de réduire l'inflammation, le stress oxydant et de majorer la biodisponibilité du NO. Tout cela aboutit à une amélioration de la fonction endothéliale. C'est pourquoi une étude a cherché à évaluer les potentiels bénéfiques d'un tel traitement sur les complications CV secondaires à l'HI (Totoson et al., 2013). Ainsi, ils ont montré que cette molécule permet de diminuer les chiffres tensionnels, le risque d'IDM, le stress oxydant, améliorer la fonction endothéliale, la compliance et la structure de la paroi des artères carotidiennes. D'autres traitements anti hypertensifs semblent améliorer la fonction endothéliale : les  $\beta$  bloquants, les antagonistes des récepteurs de l'angiotensine-2 (Ahmad et al., 2017; Heitmann et al., 2010; Kraiczi et al., 2000; Ziegler et al., 2011). Cependant, il semblerait qu'il faille éviter 2 classes médicamenteuses, à savoir, les inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC) qui peuvent entraîner une toux sèche et ainsi un œdème laryngé qui va pouvoir aggraver le SAHOS (Cicolin et al., 2006), ainsi que les inhibiteurs calciques qui peuvent modifier la qualité du sommeil chez des patients qui présente déjà, du fait de leur pathologie respiratoire du sommeil, un sommeil souvent fractionné par de nombreux micro éveils.

Concernant l'exploration de cibles moléculaires impliquées dans les mécanismes d'apparition d'une DE, les résultats des différentes études sont plutôt concluants. Différentes voies de signalisation et molécules ont ainsi été étudiées sur la fonction endothéliale. Ces molécules vont agir sur la biodisponibilité du NO, l'inflammation et le stress oxydant.

Khayat et son équipe (Khayat et al., 2018) ont montré que chez les patients apnéiques sans facteur de risque CV, la DE est liée, tout du moins en partie, à une augmentation des récepteurs de l'angiotensine-1. Or, le stress oxydant au niveau des CE est réversible en bloquant ces récepteurs.

Une autre équipe a mis en évidence une diminution du stress oxydant et une amélioration de la fonction endothéliale observée chez des rats exposés à une HI grâce à une supplémentation en N Acétylcystéine et en inhibiteur de l'arginase (Krause et al., 2018). De la même façon, la vitamine C du fait de ses propriétés antioxydantes, permet d'améliorer la fonction endothéliale (Grebe et al., 2006).

L'acide  $\alpha$  lipoïque permet de limiter la DE chez des souris exposées à l'HI en prévenant à la fois le stress oxydant, l'inflammation et également en restaurant la biodisponibilité du NO (Badran et al., 2019). La mélatonine a également montré un bénéfice chez les rats exposés à une HI là encore en restaurant la biodisponibilité du NO et diminuant le stress oxydant. Cette molécule va également atténuer l'expression de la NADPH oxydase, des médiateurs pro-inflammatoires et des molécules d'adhésion (Hung et al., 2013).

Sun et al (Sun et al., 2019) se sont eux intéressés à *endothelial cell specific molécule-1* qui pourrait être une autre cible thérapeutique de la DE dans le SAHOS puisque lorsque cette molécule diminue, on observe une diminution des molécules d'adhésion (ICAM et VCAM) ainsi que de l'inflammation.

De plus, le métabolisme lipidique pourrait également être une cible potentielle. En effet, en restaurant la signalisation de la leptine, on observe une diminution de l'hyperlipidémie et améliore la rigidité vasculaire liée à l'HI (R. Yang et al., 2011)

Contrairement à l'ensemble de ces résultats, une étude s'intéressant aux polyphénols est peu convaincante. Le polyphénol, présent naturellement dans un certain nombre d'aliments (raisin, chocolat...), est connu pour avoir des vertus antioxydantes et vasodilatatrices. Son intérêt a déjà été démontré sur la fonction endothéliale, la pression artérielle et le métabolisme lipidique chez les patients présentant des facteurs de risque CV (Wightman and Heuberger, 2015). De façon regrettable, l'étude de Trzepizur et al (Trzepizur et al., 2018) n'a pas permis de mettre en évidence une amélioration de la fonction endothéliale *in vivo* chez les patients apnéiques après 1 mois de traitement par supplément de polyphénol.

Au vue de l'ensemble de ces données, nous avons cherché à cibler un autre mécanisme qui pourrait être impliqué dans les complications CV du SAHOS, et qui pourrait devenir une cible thérapeutique ultérieure. C'est dans cet objectif que nous avons commencé le travail portant sur les miRNA. En effet, une étude réalisée antérieurement au sein de notre laboratoire (Priou et al., 2010) a pu montrer le rôle des MV dans l'apparition d'anomalies au sein des CE. Or, comme dit précédemment, les MV sont de véritables vecteurs, transporteurs. Un des éléments transportés via ces MV sont les miR. Or, certains d'autres eux sont connus pour être impliqués dans la DE et la physiopathologie de certaines maladies CV. De plus, ces miR ont un grand intérêt pour des thérapeutiques futures compte tenu qu'il existe de miR synthétiques ou des antagomir qui peuvent moduler leur concentration et donc par ce biais leur activité sur la transcription des gènes. C'est pourquoi, nous avons cherché un ou des miR dont l'expression, dans les MV, serait différente en fonction de l'existence ou non d'un SAHOS. L'objectif est, par la suite, de décrire les conséquences de cette modification sur la fonction endothéliale et *in fine* de savoir si nous pouvons normaliser cela grâce à des antagomir ou miR synthétiques.

En résumé, ce travail a eu pour objectif de définir l'implication réelle du SAHOS et de sa gravité sur les complications CV, via la DE. En effet, il s'agit d'une pathologie qui est associée à de nombreuses comorbidités, elles-mêmes responsables d'une DE. On a ainsi pu confirmer que les apnées au cours du sommeil entraînent une altération de la fonction endothéliale chez les patients indemne de toute pathologie cardio-vasculaire. Cependant, il ne semble pas avoir d'effet additionnel lorsqu'il existe une pathologie associée elle-même responsable d'une dysfonction endothéliale, comme nous avons pu le constater avec le DT2. A moins que les techniques actuelles d'évaluation de la fonction endothéliale, entre autre l'EndoPAT, ne soient pas assez sensibles pour identifier des modifications liées directement au SAHOS.

L'effet réel du traitement du SAHOS, à savoir en 1<sup>ère</sup> intention la PPC, sur la fonction endothéliale et donc la prévention primaire ou secondaire des maladies CV reste discuté d'autant plus que l'observance de cette thérapeutique peut-être très variable. C'est pourquoi il semble indispensable de développer de nouvelles thérapeutiques ciblant directement la dysfonction endothéliale.

Ainsi, dans les suites de ce travail, nous souhaiterions poursuivre les recherches sur les miRNA transportées par les MV, pouvoir identifier ceux impliqués dans la DE médiée par les MV de patients apnéiques et ainsi moduler leur action grâce à des antagomiR ou miR synthétiques. L'objectif final est de cibler ce miR pour ainsi contrer les complications CV du SAHOS.



## Références

- Agouni, A., Andriantsitohaina, R., Martinez, M.C., 2014. Microparticles as biomarkers of vascular dysfunction in metabolic syndrome and its individual components. *Curr Vasc Pharmacol* 12, 483–492.
- Ahmad, M., Makati, D., Akbar, S., 2017. Review of and Updates on Hypertension in Obstructive Sleep Apnea. *Int J Hypertens* 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/1848375>
- Alexiev, F., Brill, A.-K., Ott, S.R., Duss, S., Schmidt, M., Bassetti, C.L., 2018. Sleep-disordered breathing and stroke: chicken or egg? *J Thorac Dis* 10, S4244–S4252. <https://doi.org/10.21037/jtd.2018.12.66>
- Alonso-Fernández, A., Suquia, A.G., de la Peña, M., Casitas, R., Pierola, J., Barceló, A., Soriano, J.B., Fernández-Capitán, C., Martínez-Ceron, E., Carrera, M., García-Río, F., 2016. OSA Is a Risk Factor for Recurrent VTE. *Chest* 150, 1291–1301. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2016.07.011>
- Andreou, I., Sun, X., Stone, P.H., Edelman, E.R., Feinberg, M.W., 2015. miRNAs in atherosclerotic plaque initiation, progression, and rupture. *Trends Mol Med* 21, 307–318. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2015.02.003>
- Andriantsitohaina, R., Gaceb, A., Vergori, L., Martínez, M.C., 2012. Microparticles as regulators of cardiovascular inflammation. *Trends Cardiovasc. Med.* 22, 88–92. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2012.07.001>
- Anothaisintawee, T., Reutrakul, S., Van Cauter, E., Thakkinstian, A., 2016. Sleep disturbances compared to traditional risk factors for diabetes development: Systematic review and meta-analysis. *Sleep Medicine Reviews* 30, 11–24. <https://doi.org/10.1016/j.smrv.2015.10.002>
- Atkeson, A., Jelic, S., 2008. Mechanisms of endothelial dysfunction in obstructive sleep apnea. *Vasc Health Risk Manag* 4, 1327–1335. <https://doi.org/10.2147/vhrm.s4078>
- Aurora, R.N., Punjabi, N.M., 2013. Obstructive sleep apnoea and type 2 diabetes mellitus: a bidirectional association. *The Lancet Respiratory Medicine* 1, 329–338. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(13\)70039-0](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(13)70039-0)
- Badimon, L., Suades, R., Arderiu, G., Peña, E., Chiva-Blanch, G., Padró, T., 2017. Microvesicles in Atherosclerosis and Angiogenesis: From Bench to Bedside and Reverse. *Front Cardiovasc Med* 4, 77. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2017.00077>
- Badran, M., Abuyassin, B., Golbidi, S., Ayas, N., Laher, I., 2019. Alpha Lipoic Acid Improves Endothelial Function and Oxidative Stress in Mice Exposed to Chronic Intermittent Hypoxia. *Oxid Med Cell Longev* 2019, 4093018. <https://doi.org/10.1155/2019/4093018>
- Barbé, F., Durán-Cantolla, J., Sánchez-de-la-Torre, M., Martínez-Alonso, M., Carmona, C., Barceló, A., Chiner, E., Masa, J.F., Gonzalez, M., Marín, J.M., Garcia-Rio, F., Diaz de Atauri, J., Terán, J., Mayos, M., de la Peña, M., Monasterio, C., del Campo, F., Montserrat, J.M., Spanish Sleep And Breathing Network, 2012. Effect of continuous positive airway pressure on the incidence of hypertension and cardiovascular events in nonsleepy patients with obstructive sleep apnea: a randomized controlled trial. *JAMA* 307, 2161–2168. <https://doi.org/10.1001/jama.2012.4366>
- Berghaus, T.M., Faul, C., von Scheidt, W., Schwaiblmair, M., 2016. The prevalence of sleep-disordered breathing among survivors of acute pulmonary embolism. *Sleep Breath* 20, 213–218. <https://doi.org/10.1007/s11325-015-1209-8>
- Bikov, A., Kunos, L., Pállinger, É., Lázár, Z., Kis, A., Horváth, G., Losonczy, G., Komlósi, Z.I., 2017. Diurnal variation of circulating microvesicles is associated with the severity of obstructive sleep apnoea. *Sleep Breath* 21, 595–600. <https://doi.org/10.1007/s11325-017-1464-y>

- Brodsky, S.V., Zhang, F., Nasjletti, A., Goligorsky, M.S., 2004. Endothelium-derived microparticles impair endothelial function in vitro. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 286, H1910-1915. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01172.2003>
- Carberry, J.C., Amatoury, J., Eckert, D.J., 2018. Personalized Management Approach for OSA. *Chest* 153, 744-755. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2017.06.011>
- Casitas, R., Martínez-Cerón, E., Galera, R., Cubillos-Zapata, C., González-Villalba, M.J., Fernández-Navarro, I., Sánchez, B., García-Sánchez, A., Zamarrón, E., García-Río, F., 2017. The effect of treatment for sleep apnoea on determinants of blood pressure control. *Eur. Respir. J.* 50. <https://doi.org/10.1183/13993003.01261-2017>
- Celermajer, D.S., 2008. Reliable endothelial function testing: at our fingertips? *Circulation* 117, 2428-2430. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.775155>
- Cheng, H.S., Sivachandran, N., Lau, A., Boudreau, E., Zhao, J.L., Baltimore, D., Delgado-Olguin, P., Cybulsky, M.I., Fish, J.E., 2013. MicroRNA-146 represses endothelial activation by inhibiting pro-inflammatory pathways. *EMBO Mol Med* 5, 1017-1034. <https://doi.org/10.1002/emmm.201202318>
- Cicolin, A., Mangiardi, L., Mutani, R., Bucca, C., 2006. Angiotensin-converting enzyme inhibitors and obstructive sleep apnea. *Mayo Clin. Proc.* 81, 53-55. <https://doi.org/10.4065/81.1.53>
- Cross, M.D., Mills, N.L., Al-Abri, M., Riha, R., Vennelle, M., Mackay, T.W., Newby, D.E., Douglas, N.J., 2008. Continuous positive airway pressure improves vascular function in obstructive sleep apnoea/hypopnoea syndrome: a randomised controlled trial. *Thorax* 63, 578-583. <https://doi.org/10.1136/thx.2007.081877>
- da Silva Paulitsch, F., Zhang, L., 2019. Continuous positive airway pressure for adults with obstructive sleep apnea and cardiovascular disease: a meta-analysis of randomized trials. *Sleep Med.* 54, 28-34. <https://doi.org/10.1016/j.sleep.2018.09.030>
- Daiber, A., Steven, S., Weber, A., Shuvaev, V.V., Muzykantov, V.R., Laher, I., Li, H., Lamas, S., Münzel, T., 2017. Targeting vascular (endothelial) dysfunction. *Br J Pharmacol* 174, 1591-1619. <https://doi.org/10.1111/bph.13517>
- Daiber, A., Xia, N., Steven, S., Oelze, M., Hanf, A., Kröller-Schön, S., Münzel, T., Li, H., 2019. New Therapeutic Implications of Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) Function/Dysfunction in Cardiovascular Disease. *Int J Mol Sci* 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20010187>
- de Gonzalo-Calvo, D., Iglesias-Gutiérrez, E., Llorente-Cortés, V., 2017. Epigenetic Biomarkers and Cardiovascular Disease: Circulating MicroRNAs. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)* 70, 763-769. <https://doi.org/10.1016/j.rec.2017.05.013>
- de Vries, G.E., Wijkstra, P.J., Houwerzijl, E.J., Kerstjens, H.A.M., Hoekema, A., 2018. Cardiovascular effects of oral appliance therapy in obstructive sleep apnea: A systematic review and meta-analysis. *Sleep Med Rev* 40, 55-68. <https://doi.org/10.1016/j.smrv.2017.10.004>
- Dernaika, T.A., Kinasevitz, G.T., Tawk, M.M., 2009. Effects of nocturnal continuous positive airway pressure therapy in patients with resistant hypertension and obstructive sleep apnea. *J Clin Sleep Med* 5, 103-107.
- Domingues, C.C., Dore, F.J., Cho, A., Ahmadi, N., Kropotova, Y., Kundu, N., Younes, N., Jain, V., Sen, S., 2019. Reassessing the effects of continuous positive airway pressure (CPAP) on arterial stiffness and peripheral blood derived CD34+ progenitor cells in subjects with sleep apnea. *Stem Cell Res Ther* 10, 147. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1251-8>
- Doyle, L.M., Wang, M.Z., 2019. Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells* 8. <https://doi.org/10.3390/cells8070727>
- Durand, S., Fromy, B., Bouyé, P., Saumet, J.L., Abraham, P., 2002. Vasodilatation in response to repeated anodal current application in the human skin relies on aspirin-sensitive mechanisms. *J. Physiol. (Lond.)* 540, 261-269.

- <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2001.013364>
- Flammer, A.J., Anderson, T., Celermajer, D.S., Creager, M.A., Deanfield, J., Ganz, P., Hamburg, N.M., Lüscher, T.F., Shechter, M., Taddei, S., Vita, J.A., Lerman, A., 2012. The assessment of endothelial function: from research into clinical practice. *Circulation* 126, 753–767. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.112.093245>
- Gagnadoux, F., Pépin, J.-L., Vielle, B., Bironneau, V., Chouet-Girard, F., Launois, S., Meslier, N., Meurice, J.-C., Nguyen, X.-L., Paris, A., Priou, P., Tamisier, R., Trzepizur, W., Goupil, F., Fleury, B., 2017. Impact of Mandibular Advancement Therapy on Endothelial Function in Severe Obstructive Sleep Apnea. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 195, 1244–1252. <https://doi.org/10.1164/rccm.201609-1817OC>
- Garcia, M.M.O., Lima, P.R.P., Correia, L.C.L., 2012. Prognostic value of endothelial function in patients with atherosclerosis: systematic review. *Arq. Bras. Cardiol.* 99, 857–865. <https://doi.org/10.1590/s0066-782x2012005000078>
- Grebe, M., Eisele, H.J., Weissmann, N., Schaefer, C., Tillmanns, H., Seeger, W., Schulz, R., 2006. Antioxidant vitamin C improves endothelial function in obstructive sleep apnea. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 173, 897–901. <https://doi.org/10.1164/rccm.200508-1223OC>
- Haas, D.C., Foster, G.L., Nieto, F.J., Redline, S., Resnick, H.E., Robbins, J.A., Young, T., Pickering, T.G., 2005. Age-dependent associations between sleep-disordered breathing and hypertension: importance of discriminating between systolic/diastolic hypertension and isolated systolic hypertension in the Sleep Heart Health Study. *Circulation* 111, 614–621. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000154540.62381.CF>
- Harris, T.A., Yamakuchi, M., Ferlito, M., Mendell, J.T., Lowenstein, C.J., 2008. MicroRNA-126 regulates endothelial expression of vascular cell adhesion molecule 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 1516–1521. <https://doi.org/10.1073/pnas.0707493105>
- Haute Autorité de Santé - Évaluation clinique et économique des dispositifs médicaux et prestations associées pour prise en charge du syndrome d'apnées hypopnées obstructives du sommeil (SAHOS) [WWW Document], n.d. URL [https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c\\_1761818/fr/evaluation-clinique-et-economique-des-dispositifs-medicaux-et-prestations-associees-pour-prise-en-charge-du-syndrome-d-apnees-hypopnees-obstructives-du-sommeil-sahos](https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_1761818/fr/evaluation-clinique-et-economique-des-dispositifs-medicaux-et-prestations-associees-pour-prise-en-charge-du-syndrome-d-apnees-hypopnees-obstructives-du-sommeil-sahos) (accessed 4.11.19).
- Hedner, J., Bengtsson-Boström, K., Peker, Y., Grote, L., Råstam, L., Lindblad, U., 2006. Hypertension prevalence in obstructive sleep apnoea and sex: a population-based case-control study. *Eur. Respir. J.* 27, 564–570. <https://doi.org/10.1183/09031936.06.00042105>
- Heinzer, R., Vat, S., Marques-Vidal, P., Marti-Soler, H., Andries, D., Tobback, N., Mooser, V., Preisig, M., Malhotra, A., Waeber, G., Vollenweider, P., Tafti, M., Haba-Rubio, J., 2015. Prevalence of sleep-disordered breathing in the general population: the HypnoLaus study. *Lancet Respir Med* 3, 310–318. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(15\)00043-0](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(15)00043-0)
- Heitmann, J., Greulich, T., Reinke, C., Koehler, U., Vogelmeier, C., Becker, H.F., Schmidt, A.C., Canisius, S., 2010. Comparison of the effects of nebivolol and valsartan on BP reduction and sleep apnoea activity in patients with essential hypertension and OSA. *Curr Med Res Opin* 26, 1925–1932. <https://doi.org/10.1185/03007995.2010.497326>
- Hung, M.-W., Kravtsov, G.M., Lau, C.-F., Poon, A.M.-S., Tipoe, G.L., Fung, M.-L., 2013. Melatonin ameliorates endothelial dysfunction, vascular inflammation, and systemic hypertension in rats with chronic intermittent hypoxia. *J. Pineal Res.* 55, 247–256. <https://doi.org/10.1111/jpi.12067>
- Itzhaki, S., Dorchin, H., Clark, G., Lavie, L., Lavie, P., Pillar, G., 2007. The effects of 1-year treatment with a Herbst mandibular advancement splint on obstructive sleep apnea, oxidative stress, and endothelial function. *Chest* 131, 740–749. <https://doi.org/10.1378/chest.06-0965>

- Jansen, F., Yang, X., Baumann, K., Przybilla, D., Schmitz, T., Flender, A., Paul, K., Alhusseiny, A., Nickenig, G., Werner, N., 2015. Endothelial microparticles reduce ICAM-1 expression in a microRNA-222-dependent mechanism. *J. Cell. Mol. Med.* 19, 2202–2214. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12607>
- Javaheri, Shahrokh, Barbe, F., Campos-Rodriguez, F., Dempsey, J.A., Khayat, R., Javaheri, Sogol, Malhotra, A., Martinez-Garcia, M.A., Mehra, R., Pack, A.I., Polotsky, V.Y., Redline, S., Somers, V.K., 2017. Sleep Apnea: Types, Mechanisms, and Clinical Cardiovascular Consequences. *J. Am. Coll. Cardiol.* 69, 841–858. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2016.11.069>
- Joannides, R., Bellien, J., Thuillez, C., 2006. Clinical methods for the evaluation of endothelial function-- a focus on resistance arteries. *Fundam Clin Pharmacol* 20, 311–320. <https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.2006.00406.x>
- Joannides, R., Haefeli, W.E., Linder, L., Richard, V., Bakkali, E.H., Thuillez, C., Lüscher, T.F., 1995. Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation* 91, 1314–1319. <https://doi.org/10.1161/01.cir.91.5.1314>
- Jones, A., Vennelle, M., Connell, M., McKillop, G., Newby, D.E., Douglas, N.J., Riha, R.L., 2013. The effect of continuous positive airway pressure therapy on arterial stiffness and endothelial function in obstructive sleep apnea: a randomized controlled trial in patients without cardiovascular disease. *Sleep Med.* 14, 1260–1265. <https://doi.org/10.1016/j.sleep.2013.08.786>
- Joyeux-Faure, M., Baguet, J.-P., Barone-Rochette, G., Faure, P., Sosner, P., Mounier-Vehier, C., Lévy, P., Tamisier, R., Pépin, J.-L., 2018. Continuous Positive Airway Pressure Reduces Night-Time Blood Pressure and Heart Rate in Patients With Obstructive Sleep Apnea and Resistant Hypertension: The RHOOSAS Randomized Controlled Trial. *Front Neurol* 9, 318. <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00318>
- Joyeux-Faure, M., Tamisier, R., Baguet, J.-P., Dias-Domingos, S., Perrig, S., Leftheriotis, G., Janssens, J.-P., Trzepizur, W., Launois, S.H., Stanke-Labesque, F., Lévy, P.A., Gagnadoux, F., Pepin, J.-L., 2014. Response to statin therapy in obstructive sleep apnea syndrome: a multicenter randomized controlled trial. *Mediators Inflamm.* 2014, 423120. <https://doi.org/10.1155/2014/423120>
- Kapur, V.K., 2010. Obstructive sleep apnea: diagnosis, epidemiology, and economics. *Respir Care* 55, 1155–1167.
- Kendzierska, T., Gershon, A.S., Hawker, G., Leung, R.S., Tomlinson, G., 2014. Obstructive sleep apnea and risk of cardiovascular events and all-cause mortality: a decade-long historical cohort study. *PLoS Med.* 11, e1001599. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001599>
- Khalyfa, A., Gozal, D., 2018. Connexins and Atrial Fibrillation in Obstructive Sleep Apnea. *Curr Sleep Med Rep* 4, 300–311. <https://doi.org/10.1007/s40675-018-0130-7>
- Khalyfa, A., Kheirandish-Gozal, L., Khalyfa, A.A., Philby, M.F., Alonso-Álvarez, M.L., Mohammadi, M., Bhattacharjee, R., Terán-Santos, J., Huang, L., Andrade, J., Gozal, D., 2016. Circulating Plasma Extracellular Microvesicle MicroRNA Cargo and Endothelial Dysfunction in Children with Obstructive Sleep Apnea. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 194, 1116–1126. <https://doi.org/10.1164/rccm.201602-0323OC>
- Khan, S.U., Duran, C.A., Rahman, H., Lekkala, M., Saleem, M.A., Kaluski, E., 2018. A meta-analysis of continuous positive airway pressure therapy in prevention of cardiovascular events in patients with obstructive sleep apnoea. *Eur. Heart J.* 39, 2291–2297. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehx597>
- Khayat, R.N., Varadharaj, S., Porter, K., Sow, A., Jarjoura, D., Gavrillin, M.A., Zweier, J.L., 2018. Angiotensin Receptor Expression and Vascular Endothelial Dysfunction in Obstructive Sleep Apnea. *Am. J. Hypertens.* 31, 355–361. <https://doi.org/10.1093/ajh/hpx174>
- Kim, C.W., Kumar, S., Son, D.J., Jang, I.-H., Griendling, K.K., Jo, H., 2014. Prevention of abdominal aortic aneurysm by anti-microRNA-712 or anti-microRNA-205 in angiotensin II-infused mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 34, 1412–1421. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.113.303134>

- Kosaka, N., Iguchi, H., Ochiya, T., 2010. Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Sci.* 101, 2087–2092. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2010.01650.x>
- Kraiczi, H., Hedner, J., Peker, Y., Grote, L., 2000. Comparison of atenolol, amlodipine, enalapril, hydrochlorothiazide, and losartan for antihypertensive treatment in patients with obstructive sleep apnea. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 161, 1423–1428. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.161.5.9909024>
- Krause, B.J., Casanello, P., Dias, A.C., Arias, P., Velarde, V., Arenas, G.A., Preite, M.D., Iturriaga, R., 2018. Chronic Intermittent Hypoxia-Induced Vascular Dysfunction in Rats is Reverted by N-Acetylcysteine Supplementation and Arginase Inhibition. *Front Physiol* 9, 901. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00901>
- Kyotani, Y., Takasawa, S., Yoshizumi, M., 2019. Proliferative Pathways of Vascular Smooth Muscle Cells in Response to Intermittent Hypoxia. *Int J Mol Sci* 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20112706>
- La fonction endothéliale : rôle, méthodes d'évaluation et limites - EM|consulte [WWW Document], n.d. URL <https://www.em-consulte.com/en/article/869527> (accessed 7.29.19).
- Lacedonia, D., Scioscia, G., Pia Palladino, G., Gallo, C., Carpagnano, G.E., Sabato, R., Foschino Barbaro, M.P., 2018. MicroRNA expression profile during different conditions of hypoxia. *Oncotarget* 9, 35114–35122. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.26210>
- Laffont, B., Rayner, K.J., 2017. MicroRNAs in the pathobiology of atherosclerosis. *Can J Cardiol* 33, 313–324. <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2017.01.001>
- Lam, J.C.M., Lai, A.Y.K., Tam, T.C.C., Yuen, M.M.A., Lam, K.S.L., Ip, M.S.M., 2017. CPAP therapy for patients with sleep apnea and type 2 diabetes mellitus improves control of blood pressure. *Sleep Breath* 21, 377–386. <https://doi.org/10.1007/s11325-016-1428-7>
- 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
- Lei, Q., Lv, Y., Li, K., Ma, L., Du, G., Xiang, Y., Li, X., 2017. Effects of continuous positive airway pressure on blood pressure in patients with resistant hypertension and obstructive sleep apnea: a systematic review and meta-analysis of six randomized controlled trials. *J Bras Pneumol* 43, 373–379. <https://doi.org/10.1590/S1806-37562016000000190>
- Li, H., Yang, B.B., 2013. Friend or foe: the role of microRNA in chemotherapy resistance. *Acta Pharmacol. Sin.* 34, 870–879. <https://doi.org/10.1038/aps.2013.35>
- Li, K., Chen, Z., Qin, Y., Wei, Y., 2018. MiR-664a-3p expression in patients with obstructive sleep apnea: A potential marker of atherosclerosis. *Medicine (Baltimore)* 97, e9813. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000009813>
- Li, K., Wei, P., Qin, Y., Wei, Y., 2017. MicroRNA expression profiling and bioinformatics analysis of dysregulated microRNAs in obstructive sleep apnea patients. *Medicine (Baltimore)* 96, e7917. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000007917>
- Lin, Y.-S., Liu, P.-H., Chu, P.-H., 2017. Obstructive Sleep Apnea Independently Increases the Incidence of Heart Failure and Major Adverse Cardiac Events: A Retrospective Population-Based Follow-Up Study. *Acta Cardiol Sin* 33, 656–663. <https://doi.org/10.6515/ACS20170825A>
- Linz, D., Arzt, M., 2015. [Sleep-disordered breathing and cardiac disease]. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 140, 1272–1277. <https://doi.org/10.1055/s-0041-102916>
- Logan, A.G., Perlikowski, S.M., Mente, A., Tisler, A., Tkacova, R., Niroumand, M., Leung, R.S., Bradley, T.D., 2001. High prevalence of unrecognized sleep apnoea in drug-resistant hypertension. *J. Hypertens.* 19, 2271–2277.
- Loscalzo, J., 2010. The cellular response to hypoxia: tuning the system with microRNAs. *J. Clin. Invest.* 120, 3815–3817. <https://doi.org/10.1172/JCI45105>
- Lüdemann, P., Dziewas, R., Sörös, P., Happe, S., Frese, A., 2001. Axonal polyneuropathy in obstructive sleep apnoea. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 70, 685–687.

- <https://doi.org/10.1136/jnnp.70.5.685>
- Mahé, G., Humeau-Heurtier, A., Durand, S., Leftheriotis, G., Abraham, P., 2012. Assessment of skin microvascular function and dysfunction with laser speckle contrast imaging. *Circ Cardiovasc Imaging* 5, 155–163. <https://doi.org/10.1161/CIRCIMAGING.111.970418>
- Mallocci M, Perdomo L, Veerasamy M, Andriantsitohaina R, Simard G, Martinez MC. Extracellular Vesicles : Mechanisms in human Health and Disease. *Antioxid Redox Signal*. 2019 Feb 20;30(6):813-856.
- Marin, J.M., Artal, J., Martin, T., Carrizo, S.J., Andres, M., Martin-Burriel, I., Bolea, R., Sanz, A., Varona, L., Godino, J., Gallego, B., Garcia-Erce, J.A., Villar, I., Gil, V., Forner, M., Cubero, J.P., Ros, L., 2014. Epigenetics modifications and Subclinical Atherosclerosis in Obstructive Sleep Apnea: The EPIOSA study. *BMC Pulm Med* 14, 114. <https://doi.org/10.1186/1471-2466-14-114>
- Martínez-García, M.-A., Capote, F., Campos-Rodríguez, F., Lloberes, P., Díaz de Atauri, M.J., Somoza, M., Masa, J.F., González, M., Sacristán, L., Barbé, F., Durán-Cantolla, J., Aizpuru, F., Mañas, E., Barreiro, B., Mosteiro, M., Cebrián, J.J., de la Peña, M., García-Río, F., Maimó, A., Zapater, J., Hernández, C., Grau SanMarti, N., Montserrat, J.M., Spanish Sleep Network, 2013. Effect of CPAP on blood pressure in patients with obstructive sleep apnea and resistant hypertension: the HIPARCO randomized clinical trial. *JAMA* 310, 2407–2415. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.281250>
- Mause, S.F., Weber, C., 2010. Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange. *Circ. Res.* 107, 1047–1057. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.226456>
- McEvoy, R.D., Antic, N.A., Heeley, E., Luo, Y., Ou, Q., Zhang, X., Mediano, O., Chen, R., Drager, L.F., Liu, Z., Chen, G., Du, B., McArdle, N., Mukherjee, S., Tripathi, M., Billot, L., Li, Q., Lorenzi-Filho, G., Barbe, F., Redline, S., Wang, J., Arima, H., Neal, B., White, D.P., Grunstein, R.R., Zhong, N., Anderson, C.S., SAVE Investigators and Coordinators, 2016. CPAP for Prevention of Cardiovascular Events in Obstructive Sleep Apnea. *N. Engl. J. Med.* 375, 919–931. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1606599>
- McKee, Z., Auckley, D.H., 2019. A sleeping beast: Obstructive sleep apnea and stroke. *Cleve Clin J Med* 86, 407–415. <https://doi.org/10.3949/ccjm.86a.18033>
- Meng, S., Cao, J., Wang, L., Zhou, Q., Li, Y., Shen, C., Zhang, X., Wang, C., 2012. MicroRNA 107 partly inhibits endothelial progenitor cells differentiation via HIF-1 $\beta$ . *PLoS ONE* 7, e40323. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040323>
- Milleron, O., Pillière, R., Foucher, A., de Roquefeuil, F., Aegerter, P., Jondeau, G., Raffestin, B.G., Dubourg, O., 2004. Benefits of obstructive sleep apnoea treatment in coronary artery disease: a long-term follow-up study. *Eur. Heart J.* 25, 728–734. <https://doi.org/10.1016/j.ehj.2004.02.008>
- Mohammad, Y., Almutlaq, A., Al-Ruwaita, A., Aldrees, A., Alsubaie, A., Al-Hussain, F., 2019. Stroke during sleep and obstructive sleep apnea: there is a link. *Neurol. Sci.* 40, 1001–1005. <https://doi.org/10.1007/s10072-019-03753-2>
- Mostefai, H.A., Agouni, A., Carusio, N., Mastronardi, M.L., Heymes, C., Henrion, D., Andriantsitohaina, R., Martinez, M.C., 2008. Phosphatidylinositol 3-kinase and xanthine oxidase regulate nitric oxide and reactive oxygen species productions by apoptotic lymphocyte microparticles in endothelial cells. *J. Immunol.* 180, 5028–5035. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.7.5028>
- Muñoz-Hernandez, R., Vallejo-Vaz, A.J., Sanchez Armengol, A., Moreno-Luna, R., Caballero-Eraso, C., Macher, H.C., Villar, J., Merino, A.M., Castell, J., Capote, F., Stiefel, P., 2015. Obstructive sleep apnoea syndrome, endothelial function and markers of endothelialization. Changes after CPAP. *PLoS ONE* 10, e0122091. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122091>
- Muraki, I., Wada, H., Tanigawa, T., 2018. Sleep apnea and type 2 diabetes. *J Diabetes Investig* 9, 991–997. <https://doi.org/10.1111/jdi.12823>

- Njock, M.-S., Cheng, H.S., Dang, L.T., Nazari-Jahantigh, M., Lau, A.C., Boudreau, E., Roufaiel, M., Cybulsky, M.I., Schober, A., Fish, J.E., 2015. Endothelial cells suppress monocyte activation through secretion of extracellular vesicles containing antiinflammatory microRNAs. *Blood* 125, 3202–3212. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-11-611046>
- Pamidi, S., Aronsohn, R.S., Tasali, E., 2010. Obstructive sleep apnea: role in the risk and severity of diabetes. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 24, 703–715. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2010.08.009>
- Pamidi, S., Tasali, E., 2012. Obstructive sleep apnea and type 2 diabetes: is there a link? *Front Neurol* 3, 126. <https://doi.org/10.3389/fneur.2012.00126>
- Paneni, F., Beckman, J.A., Creager, M.A., Cosentino, F., 2013. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part I. *Eur. Heart J.* 34, 2436–2443. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehs149>
- Peker, Y., Glantz, H., Eulenburg, C., Wegscheider, K., Herlitz, J., Thunström, E., 2016. 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.* 194, 613–620. <https://doi.org/10.1164/rccm.201601-0088OC>
- Peppard, P.E., Young, T., Palta, M., Skatrud, J., 2000. Prospective study of the association between sleep-disordered breathing and hypertension. *N. Engl. J. Med.* 342, 1378–1384. <https://doi.org/10.1056/NEJM200005113421901>
- Peppard PE, Young T, Barnet JH, Palta M, Hagen EW, Hla KM. Increased prevalence of sleep-disordered breathing in adults. *Am J Epidemiol* 2013; **177**: 1006
- Phillips, C.L., Grunstein, R.R., Darendeliler, M.A., Mihailidou, A.S., Srinivasan, V.K., Yee, B.J., Marks, G.B., Cistulli, P.A., 2013. Health outcomes of continuous positive airway pressure versus oral appliance treatment for obstructive sleep apnea: a randomized controlled trial. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 187, 879–887. <https://doi.org/10.1164/rccm.201212-2223OC>
- Porto, F., Sakamoto, Y.S., Salles, C., 2017. Association between Obstructive Sleep Apnea and Myocardial Infarction: A Systematic Review. *Arq. Bras. Cardiol.* 108, 361–369. <https://doi.org/10.5935/abc.20170031>
- Priou, P., Gagnadoux, F., Tesse, A., Mastronardi, M.L., Agouni, A., Meslier, N., Racineux, J.-L., Martinez, M.C., Trzepizur, W., Andriantsitohaina, R., 2010. Endothelial dysfunction and circulating microparticles from patients with obstructive sleep apnea. *Am. J. Pathol.* 177, 974–983. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.091252>
- Rane, S., He, M., Sayed, D., Vashistha, H., Malhotra, A., Sadoshima, J., Vatner, D.E., Vatner, S.F., Abdellatif, M., 2009. Downregulation of miR-199a derepresses hypoxia-inducible factor-1alpha and Sirtuin 1 and recapitulates hypoxia preconditioning in cardiac myocytes. *Circ. Res.* 104, 879–886. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.193102>
- Raposo, G., Stoorvogel, W., 2013. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol* 200, 373–383. <https://doi.org/10.1083/jcb.201211138>
- Ravesloot, M.J.L., White, D., Heinzer, R., Oksenberg, A., Pépin, J.-L., 2017. Efficacy of the New Generation of Devices for Positional Therapy for Patients With Positional Obstructive Sleep Apnea: A Systematic Review of the Literature and Meta-Analysis. *J Clin Sleep Med* 13, 813–824. <https://doi.org/10.5664/jcsm.6622>
- Redline, S., Yenokyan, G., Gottlieb, D.J., Shahar, E., O'Connor, G.T., Resnick, H.E., Diener-West, M., Sanders, M.H., Wolf, P.A., Geraghty, E.M., Ali, T., Lebowitz, M., Punjabi, N.M., 2010. Obstructive sleep apnea-hypopnea and incident stroke: the sleep heart health study. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 182, 269–277. <https://doi.org/10.1164/rccm.200911-1746OC>
- Rooij, E. van, Olson, E.N., 2007. MicroRNAs: powerful new regulators of heart disease and provocative therapeutic targets. *J Clin Invest* 117, 2369–2376. <https://doi.org/10.1172/JCI33099>
- Roos, W.P., Kaina, B., 2013. DNA damage-induced cell death: from specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis. *Cancer Lett.* 332, 237–248.

- <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.01.007>
- Sánchez-de-la-Torre, M., Khalyfa, A., Sánchez-de-la-Torre, A., Martínez-Alonso, M., Martínez-García, M.Á., Barceló, A., Lloberes, P., Campos-Rodriguez, F., Capote, F., Diaz-de-Atauri, M.J., Somoza, M., González, M., Masa, J.-F., Gozal, D., Barbé, F., 2015. Precision Medicine in Patients With Resistant Hypertension and Obstructive Sleep Apnea: Blood Pressure Response to Continuous Positive Airway Pressure Treatment. *Journal of the American College of Cardiology* 66, 1023–1032. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2015.06.1315>
- Sanchez de la Torre M, Sanchez de la Torre A, Bertran S, Abad J, Duran-Cantolla J, Cabriada V, Mediano O et al. Effect of sleep apnea and its treatment in the prognosis of patients with acute coronary syndrome : Isaacc study. *Am J Respir Crit Care Med* 2019; 199: A5607.
- Schnabel, R.B., Wild, P.S., Schulz, A., Zeller, T., Sinning, C.R., Wilde, S., Kunde, J., Lubos, E., Lackner, K.J., Warnholtz, A., Gori, T., Blankenberg, S., Munzel, T., Gutenberg Health Study Investigators, 2012. Multiple endothelial biomarkers and noninvasive vascular function in the general population: the Gutenberg Health Study. *Hypertension* 60, 288–295. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.112.191874>
- Schober, A., Nazari-Jahantigh, M., Wei, Y., Bidzhekov, K., Gremse, F., Grommes, J., Megens, R.T.A., Heyll, K., Noels, H., Hristov, M., Wang, S., Kiessling, F., Olson, E.N., Weber, C., 2014. MicroRNA-126-5p promotes endothelial proliferation and limits atherosclerosis by suppressing Dlk1. *Nat. Med.* 20, 368–376. <https://doi.org/10.1038/nm.3487>
- Schwartz, A.R., Bennett, M.L., Smith, P.L., De Backer, W., Hedner, J., Boudewyns, A., Van de Heyning, P., Ejnell, H., Hochban, W., Knaack, L., Podszus, T., Penzel, T., Peter, J.H., Goding, G.S., Erickson, D.J., Testerman, R., Ottenhoff, F., Eisele, D.W., 2001. Therapeutic electrical stimulation of the hypoglossal nerve in obstructive sleep apnea. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 127, 1216–1223.
- Schwarz, E.I., Puhan, M.A., Schlatzer, C., Stradling, J.R., Kohler, M., 2015. Effect of CPAP therapy on endothelial function in obstructive sleep apnoea: A systematic review and meta-analysis. *Respirology* 20, 889–895. <https://doi.org/10.1111/resp.12573>
- Simpson, P.J.L., Hoyos, C.M., Celermajer, D., Liu, P.Y., Ng, M.K.C., 2013. Effects of continuous positive airway pressure on endothelial function and circulating progenitor cells in obstructive sleep apnoea: a randomised sham-controlled study. *Int. J. Cardiol.* 168, 2042–2048. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2013.01.166>
- Sinauridze, E.I., Kireev, D.A., Popenko, N.Y., Pichugin, A.V., Panteleev, M.A., Krymskaya, O.V., Ataulakhanov, F.I., 2007. Platelet microparticle membranes have 50- to 100-fold higher specific procoagulant activity than activated platelets. *Thromb. Haemost.* 97, 425–434.
- Steven, S., Münzel, T., Daiber, A., 2015. Exploiting the Pleiotropic Antioxidant Effects of Established Drugs in Cardiovascular Disease. *Int J Mol Sci* 16, 18185–18223. <https://doi.org/10.3390/ijms160818185>
- Stiefel, P., Sánchez-Armengol, M.A., Villar, J., Vallejo-Vaz, A., Moreno-Luna, R., Capote, F., 2013. Obstructive sleep apnea syndrome, vascular pathology, endothelial function and endothelial cells and circulating microparticles. *Arch. Med. Res.* 44, 409–414. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2013.08.005>
- Stradling JR, Schwarz EI, Schlatzer C, Manuel AR, Lee R, Antoniades C, Kohler M. Biomarkers of oxidative stress following continuous positive airway pressure withdrawal: data from two randomised trials. *Eur Respir J.* 2015;46(4):1065–1071.
- Suárez, Y., Wang, C., Manes, T.D., Pober, J.S., 2010. Cutting edge: TNF-induced microRNAs regulate TNF-induced expression of E-selectin and intercellular adhesion molecule-1 on human endothelial cells: feedback control of inflammation. *J. Immunol.* 184, 21–25. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902369>



- Suessenbacher, A., Dörler, J., Wunder, J., Hohenwarter, F., Alber, H.F., Pachinger, O., Frick, M., 2013. Comparison of brachial artery wall thickness versus endothelial function to predict late cardiovascular events in patients undergoing elective coronary angiography. *Am. J. Cardiol.* 111, 671–675. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2012.11.020>
- Sun, H., Zhang, H., Li, K., Wu, H., Zhan, X., Fang, F., Qin, Y., Wei, Y., 2019. ESM-1 promotes adhesion between monocytes and endothelial cells under intermittent hypoxia. *J. Cell. Physiol.* 234, 1512–1521. <https://doi.org/10.1002/jcp.27016>
- Tooke, J.E., Hannemann, M.M., 2000. Adverse endothelial function and the insulin resistance syndrome. *J. Intern. Med.* 247, 425–431.
- Toraldo, D.M., Benedetto, M.D., Conte, L., De Nuccio, F., 2017. Statins May Prevent Atherosclerotic Disease in OSA Patients without Co-Morbidities? *Curr Vasc Pharmacol* 15, 5–9.
- Torres, G., Sánchez-de-la-Torre, M., Barbé, F., 2015. Relationship Between OSA and Hypertension. *Chest* 148, 824–832. <https://doi.org/10.1378/chest.15-0136>
- Totoson, P., Fhayli, W., Faury, G., Korichneva, I., Cachot, S., Baldazza, M., Ribuet, C., Pépin, J.-L., Lévy, P., Joyeux-Faure, M., 2013. Atorvastatin protects against deleterious cardiovascular consequences induced by chronic intermittent hypoxia. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* 238, 223–232. <https://doi.org/10.1177/1535370212473696>
- Trzepizur, W., Bironneau, V., Recoquillon, S., Priou, P., Meslier, N., Hamel, J.-F., Henni, S., Darsonval, A., Messaoudi, K., Martínez, M.C., Andriantsitohaina, R., Gagnadoux, F., 2018. Polyphenols Have No Impact on Endothelial Function in Patients with Obstructive Sleep Apnea: A Randomized Controlled Trial. *J. Nutr.* 148, 581–586. <https://doi.org/10.1093/jn/nxy005>
- Trzepizur, W., Gagnadoux, F., 2014. [Epidemiology of obstructive sleep apnoea syndrome]. *Rev Mal Respir* 31, 568–577. <https://doi.org/10.1016/j.rmr.2014.01.013>
- Trzepizur, W., Martinez, M.C., Priou, P., Andriantsitohaina, R., Gagnadoux, F., 2014. Microparticles and vascular dysfunction in obstructive sleep apnoea. *European Respiratory Journal* 44, 207–216. <https://doi.org/10.1183/09031936.00197413>
- Trzepizur, W., Priou, P., Paris, A., Nardi, J., Tual-Chalot, S., Meslier, N., Urban, T., Andriantsitohaina, R., Martinez, M.C., Gagnadoux, F., 2011. Nocturnal release of leukocyte-derived microparticles in males with obstructive sleep apnoea. *Eur. Respir. J.* 37, 1293–1295. <https://doi.org/10.1183/09031936.00150010>
- Tual-Chalot, S., Fatoumata, K., Priou, P., Trzepizur, W., Gaceb, A., Contreras, C., Prieto, D., Martinez, M.C., Gagnadoux, F., Andriantsitohaina, R., 2012. Circulating microparticles from patients with obstructive sleep apnea enhance vascular contraction: mandatory role of the endothelium. *Am. J. Pathol.* 181, 1473–1482. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.06.020>
- Tual-Chalot, S., Gagnadoux, F., Trzepizur, W., Priou, P., Andriantsitohaina, R., Martinez, M.C., 2014. Circulating microparticles from obstructive sleep apnea syndrome patients induce endothelin-mediated angiogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1842, 202–207. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.11.017>
- Tulmaç, M., Tireli, E., Ebinç, H., Şimşek, V., Doğru, M.T., Yıldırım, N., Kısa, Ü., Ekici, M.S., 2012. Effect of overnight nasal continuous positive airway pressure treatment on the endothelial function in patients with obstructive sleep apnea. *Anadolu Kardiyol Derg* 12, 560–565. <https://doi.org/10.5152/akd.2012.181>
- Turnbull, C.D., Rossi, V.A., Santer, P., Schwarz, E.I., Stradling, J.R., Petousi, N., Kohler, M., 2017. Effect of OSA on hypoxic and inflammatory markers during CPAP withdrawal: Further evidence from three randomized control trials. *Respirology* 22, 793–799. <https://doi.org/10.1111/resp.12946>
- Umut Somuncu, M., Bulut, U., Karakurt, H., Utkusavas, A., Akbay, E., Kartal Kilinc, F., 2019. The Relationship Between Obstructive Sleep Apnea and Coronary Plaque: A Coronary Computed Tomographic Angiography Study. *Acta Cardiol Sin* 35, 325–334. [https://doi.org/10.6515/ACS.201905\\_35\(3\).20181029A](https://doi.org/10.6515/ACS.201905_35(3).20181029A)

- Wagschal, A., Najafi-Shoushtari, S.H., Wang, L., Goedeke, L., Sinha, S., deLemos, A.S., Black, J.C., Ramírez, C.M., Li, Y., Tewhey, R., Hatoum, I., Shah, N., Lu, Y., Kristo, F., Psychogios, N., Vrbanac, V., Lu, Y.-C., Hla, T., de Cabo, R., Tsang, J.S., Schadt, E., Sabeti, P.C., Kathiresan, S., Cohen, D.E., Whetstine, J., Chung, R.T., Fernández-Hernando, C., Kaplan, L.M., Bernardis, A., Gerszten, R.E., Näär, A.M., 2015. Genome-wide identification of microRNAs regulating cholesterol and triglyceride homeostasis. *Nat. Med.* 21, 1290–1297. <https://doi.org/10.1038/nm.3980>
- Wang, J., Chen, S., Ma, X., Cheng, C., Xiao, X., Chen, J., Liu, S., Zhao, B., Chen, Y., 2013. Effects of endothelial progenitor cell-derived microvesicles on hypoxia/reoxygenation-induced endothelial dysfunction and apoptosis. *Oxid Med Cell Longev* 2013, 572729. <https://doi.org/10.1155/2013/572729>
- Wei, Y., Schober, A., 2016. MicroRNA regulation of macrophages in human pathologies. *Cell. Mol. Life Sci.* 73, 3473–3495. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2254-6>
- Wethal, T., Nedregaard, B., Andersen, R., Fosså, A., Lund, M.B., Günther, A., Kvaløy, S., Fosså, S.D., Kjekshus, J., 2014. Atherosclerotic lesions in lymphoma survivors treated with radiotherapy. *Radiother Oncol* 110, 448–454. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2013.10.029>
- Wightman, J.D., Heuberger, R.A., 2015. Effect of grape and other berries on cardiovascular health. *J. Sci. Food Agric.* 95, 1584–1597. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6890>
- Wu, W., Xiao, H., Laguna-Fernandez, A., Villarreal, G., Wang, K.-C., Geary, G.G., Zhang, Y., Wang, W.-C., Huang, H.-D., Zhou, J., Li, Y.-S., Chien, S., Garcia-Cardena, G., Shyy, J.Y.-J., 2011. Flow-Dependent Regulation of Kruppel-Like Factor 2 Is Mediated by MicroRNA-92a. *Circulation* 124, 633–641. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.005108>
- Xu, H., Wang, Y., Guan, J., Yi, H., Yin, S., 2015. Effect of CPAP on Endothelial Function in Subjects With Obstructive Sleep Apnea: A Meta-Analysis. *Respir Care* 60, 749–755. <https://doi.org/10.4187/respcare.03739>
- Xu, P.H., Hui, C.K.M., Lui, M.M.S., Lam, D.C.L., Fong, D.Y.T., Ip, M.S.M., 2019. Incident Type 2 Diabetes in OSA and Effect of CPAP Treatment: A Retrospective Clinic Cohort Study. *Chest*. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2019.04.130>
- Yamakuchi, M., Lotterman, C.D., Bao, C., Hruban, R.H., Karim, B., Mendell, J.T., Huso, D., Lowenstein, C.J., 2010. P53-induced microRNA-107 inhibits HIF-1 and tumor angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 6334–6339. <https://doi.org/10.1073/pnas.0911082107>
- Yáñez-Mó, M., Siljander, P.R.-M., Andreu, Z., Zavec, A.B., Borràs, F.E., Buzas, E.I., Buzas, K., Casal, E., Cappello, F., Carvalho, J., Colás, E., Cordeiro-da Silva, A., Fais, S., Falcon-Perez, J.M., Ghobrial, I.M., Giebel, B., Gimona, M., Graner, M., Gursel, I., Gursel, M., Heegaard, N.H.H., Hendrix, A., Kierulf, P., Kokubun, K., Kosanovic, M., Kralj-Iglic, V., Krämer-Albers, E.-M., Laitinen, S., Lässer, C., Lener, T., Ligeti, E., Linē, A., Lipps, G., Llorente, A., Lötvall, J., Manček-Keber, M., Marcilla, A., Mittelbrunn, M., Nazarenko, I., Nolte-‘t Hoen, E.N.M., Nyman, T.A., O’Driscoll, L., Olivan, M., Oliveira, C., Pällinger, É., Del Portillo, H.A., Reventós, J., Rigau, M., Rohde, E., Sammar, M., Sánchez-Madrid, F., Santarém, N., Schallmoser, K., Ostenfeld, M.S., Stoorvogel, W., Stukelj, R., Van der Grein, S.G., Vasconcelos, M.H., Wauben, M.H.M., De Wever, O., 2015. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles* 4, 27066. <https://doi.org/10.3402/jev.v4.27066>
- Yang, R., Sikka, G., Larson, J., Watts, V.L., Niu, X., Ellis, C.L., Miller, K.L., Camara, A., Reinke, C., Savransky, V., Polotsky, V.Y., O’Donnell, C.P., Berkowitz, D.E., Barouch, L.A., 2011. Restoring leptin signaling reduces hyperlipidemia and improves vascular stiffness induced by chronic intermittent hypoxia. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 300, H1467–1476. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00604.2009>
- Yoshida, T., Kuwabara, M., Hoshida, S., Kario, K., 2016. Recurrence of stroke caused by

- nocturnal hypoxia-induced blood pressure surge in a young adult male with severe obstructive sleep apnea syndrome. *J Am Soc Hypertens* 10, 201–204. <https://doi.org/10.1016/j.jash.2016.01.013>
- Yu, C., Liu, Y., Sun, L., Wang, D., Wang, Y., Zhao, S., Dai, H., Zhao, J., Zhang, S., Li, M., Han, Y., Lu, S., Dong, X., Liu, G., Yu, S., Li, Y., 2017. Chronic obstructive sleep apnea promotes aortic remodeling in canines through miR-145/Smad3 signaling pathway. *Oncotarget* 8, 37705–37716. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17144>
- Yu, J., Zhou, Z., McEvoy, R.D., Anderson, C.S., Rodgers, A., Perkovic, V., Neal, B., 2017. Association of Positive Airway Pressure With Cardiovascular Events and Death in Adults With Sleep Apnea: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA* 318, 156–166. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.7967>
- Zaborowski, M.P., Balaj, L., Breakefield, X.O., Lai, C.P., 2015. Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study. *Bioscience* 65, 783–797. <https://doi.org/10.1093/biosci/biv084>
- Zeicher, A.M., Drexler, H., Wollschläger, H., Just, H., 1991. Modulation of coronary vasomotor tone in humans. Progressive endothelial dysfunction with different early stages of coronary atherosclerosis. *Circulation* 83, 391–401. <https://doi.org/10.1161/01.cir.83.2.391>
- Ziegler, M.G., Milic, M., Elayan, H., 2011. Cardiovascular Regulation in Obstructive Sleep Apnea. *Drug Discov Today Dis Models* 8, 155–160. <https://doi.org/10.1016/j.ddmod.2011.03.003>

## **Annexes**

# Polyphenols Have No Impact on Endothelial Function in Patients with Obstructive Sleep Apnea: A Randomized Controlled Trial

Wojciech Trzepizur,<sup>1,6</sup> Vanessa Bironneau,<sup>6</sup> Sylvain Recoquillon,<sup>6</sup> Pascaline Priou,<sup>1,6</sup> Nicole Meslier,<sup>1,6</sup> Jean-François Hamel,<sup>2</sup> Samir Henni,<sup>5</sup> Astrid Darsonval,<sup>3</sup> Khaled Messaoudi,<sup>4</sup> Maria Carmen Martínez,<sup>6</sup> Ramaroson Andriantsitohaina,<sup>6</sup> and Frédéric Gagnadoux<sup>1,6</sup>

Departments of <sup>1</sup>Pneumology, <sup>2</sup>Methodology and Biostatistics, <sup>3</sup>Pharmacy, and <sup>4</sup>Biochemistry and Genetics, <sup>5</sup>Laboratory of Physiology and Vascular Explorations Vasculaires, CHU d'Angers, Angers, France, and <sup>6</sup>Stress Oxydant et Pathologies Métaboliques (SOPAM), UNIV Angers, University of Bretagne Loire, Angers, France

## Abstract

**Background:** Endothelial dysfunction, a pathophysiologic determinant of atherogenesis, has been found to occur in obstructive sleep apnea syndrome (OSA) and is improved by continuous positive airway pressure (CPAP). However, the efficacy of CPAP therapy is limited by variable adherence. Alternative treatment strategies are needed. The impact of polyphenols on endothelial function has never been evaluated in OSA.

**Objective:** We evaluated the impact of 1-mo supplementation with grape juice polyphenols (GJPs) on the reactive hyperemia index (RHI), a validated measure of endothelial function in patients with severe OSA.

**Methods:** Forty participants [75% men, median (IQR) age: 61 y (34, 64 y), BMI (in kg/m<sup>2</sup>): 30.6 (20.9, 33.7)] with severe OSA [median apnea-hypopnea index 43/h (33/h, 56/h)] were randomly assigned to receive GJPs (300 mg/d; *n* = 20) or placebo (*n* = 20) for 1 mo. The primary outcome was the change in RHI between baseline and after 1 mo of GJPs or placebo. Secondary outcome measures included changes in blood pressure (BP), heart rate (HR), and polysomnographic indexes.

**Results:** No significant differences in RHI and BP outcomes were observed between the GJPs and placebo groups. A significant between-group difference was observed for HR changes [−1 bpm (−5, +5 bpm) in the GJPs group compared with +6 bpm (+3, +10 bpm) in the placebo group; *P* = 0.001]. A significant decrease in total sleep time was observed in the GJPs group compared with the placebo group [−10 min (−33, 6 min) compared with +15 min (−12, 40 min), respectively; *P* = 0.02], with no between-group differences in the distribution of sleep stages.

**Conclusions:** In participants with severe OSA and no overt cardiovascular disease, 1-mo GJP supplementation had no effect on endothelial function. This trial was registered at clinicaltrials.gov as NCT01977924. *J Nutr* 2018;148:581–586.

**Keywords:** obstructive sleep apnea, polyphenols, endothelial dysfunction

## Introduction

Obstructive sleep apnea syndrome (OSA) affects 2–10% of the general population and is recognized as an independent risk factor for the development of cardiovascular (CV) disorders such as stroke and coronary heart disease (1). OSA may accelerate atherosclerosis by exacerbating key atherogenic risk

factors such as hypertension, diabetes, and dyslipidemia (2–4). Clinical and experimental data in animal models suggest that OSA can have direct proatherogenic effects (5). In addition to increased sympathetic activity and proinflammatory changes, an increase in oxidative stress has been demonstrated in OSA (6, 7), as supported by increased lipid peroxidation, decreased plasma concentrations of nitric oxide derivatives, and enhanced *in vitro* release of free oxygen radicals from neutrophils and monocytes harvested from the blood of OSA patients (8). Prior to the onset of CV events, OSA is associated with several subclinical CV alterations, including nocturnal hypertension and endothelial dysfunction (9–12). Endothelial dysfunction precedes the development of morphological atherosclerotic changes and subsequent clinical complications (13). Reversal of endothelial dysfunction may therefore improve CV outcomes of OSA patients.

Supported by the "Institut de Recherche en Santé Respiratoire des Pays de la Loire."

Author disclosures: WT, VB, SR, PP, NM, J-FH, SH, AD, KM, MCM, RA, and FG, no conflicts of interest.

Address correspondence to WT (e-mail: wotrzepizur@chu-angers.fr).

Abbreviations used: BP, blood pressure; CPAP, continuous positive airway pressure; CV, cardiovascular; ESS, Epworth sleepiness scale; FMD, flow-mediated vasodilation; GJP, grape juice polyphenol; HR, heart rate; OSA, obstructive sleep apnea syndrome; PAT, peripheral arterial tonometry; RHI, reactive hyperemia index; TST, total sleep time.

© 2018 American Society for Nutrition. All rights reserved.

Manuscript received October 16, 2017; initial review completed November 22, 2017; revision accepted January 3, 2018.  
First published online 0, 2018; doi: <https://doi.org/10.1093/nj/nxy005>.

Small-scale randomized controlled trials have suggested that continuous positive airway pressure (CPAP), the first-line therapy for OSA, improves endothelial function (14, 15). However, the efficacy of CPAP therapy is limited by poor adherence (16). Furthermore, CPAP therapy alone has limited impact on cardiometabolic risk factors in OSA patients (17, 18). A nutritional approach has already been proposed in a few studies to counterbalance the negative vascular and metabolic impact of OSA (19, 20). A single dose of the antioxidant vitamin C was associated with immediate improvement in endothelial function in OSA patients (20).

Polyphenols constitute a large family of natural compounds with antioxidant and vasodilator properties, and are widely present in plant foods. Epidemiologic studies have revealed an inverse correlation between the intake of polyphenol-containing foods and coronary artery disease mortality (21). Several randomized studies have demonstrated the beneficial impact of polyphenol-containing foods and beverages on endothelial function, blood pressure (BP), and lipid metabolism in patients with cardiometabolic risk factors (22–26). The impact of polyphenols on endothelial function has never been evaluated in OSA.

The aim of this randomized, double-blind, placebo-controlled trial was to determine the effect of 1 mo of grape juice polyphenol (GJP) supplementation on endothelial function in patients with severe OSA and no overt CV disease.

## Methods

**Experimental design.** This was a randomized, double-blind, parallel-group trial. Men and women aged 18–70 y with severe OSA (apnea-hypopnea index  $\geq 30$ ) were assessed for eligibility. Exclusion criteria were BMI (in  $\text{kg/m}^2$ )  $\geq 35$ ; history of CV disease, including coronary heart disease, heart failure, and stroke; severe daytime sleepiness, defined by an Epworth sleepiness scale (ESS) of  $\geq 16$ ; and anemia or iron deficiency, defined as hemoglobin  $< 13$  g/dL and blood ferritin  $< 30$   $\mu\text{g/L}$ . All participants provided their written informed consent to participate in the study. The study was approved by the local ethics committee (Comité de Protection des Personnes Ouest II, Angers; No. 2013/14) and was registered with clinicaltrials.gov as NCT01977924.

Participants were randomly assigned to receive 1 mo of supplementation with 300 mg GJPs/d or placebo according to a 1:1 allocation with the use of a computer-generated randomization list.

GJPs were extracted from *Vitis vinifera* grape juice by distillation, filtration, concentration, and dehydration. This product is marketed as a nutritional supplement called exGrape®TOTAL (Grap'Sud). The final grape extract presents a standardized polyphenolic profile with a guaranteed content in total polyphenols, procyanidins, anthocyanins, and resveratrol. The phenolic composition of grape juice powder is summarized in Table 1. GJPs and placebo powder were encapsulated in identical capsules and patients and investigators were both blinded to the treatment delivered. Participants were asked to take three 100-mg GJPs capsules or 3 placebo capsules each morning and to return the

empty blister packs and unused capsules in order to evaluate treatment adherence.

The primary outcome was the change in endothelial function as assessed by the reactive hyperemia index (RHI) from baseline to 1-mo follow-up. Secondary outcomes included changes in BP, heart rate (HR), and polysomnographic indexes of OSA severity. Endothelial function, HR, and BP measurements were performed at baseline and after 1 mo of GJP or placebo treatment in the morning following overnight polysomnography.

**Clinical and routine laboratory examinations.** Clinical evaluation included anthropometric data, vital signs, smoking habits, medical history, and medication use. Excessive daytime sleepiness was evaluated by the ESS. Participants were considered to present hypertension, diabetes, and dyslipidemia when these conditions had been previously diagnosed.

**Assessment of peripheral endothelial function.** Endothelial function was assessed by peripheral arterial tonometry (PAT; EndoPAT, Itamar Medical Ltd) (27). Participants, who were lying down in a quiet room, had probes applied to both index fingers and a BP cuff placed around the right arm above the elbow to test the reactive hyperemia response. The left finger was used as the control. The finger arterial pulse wave amplitude was recorded throughout the protocol, which comprises 3 consecutive 5-min stages: 1) baseline recording, 2) brachial artery occlusion by inflating the BP cuff to 50 mm Hg above the baseline systolic pressure, and 3) postocclusion recording after deflation of the cuff to measure the reactive hyperemia response. The RHI was calculated as the ratio of the average amplitude of the post- to preocclusion PAT signal in the tested arm, normalized to the concomitant signal from the contralateral finger.

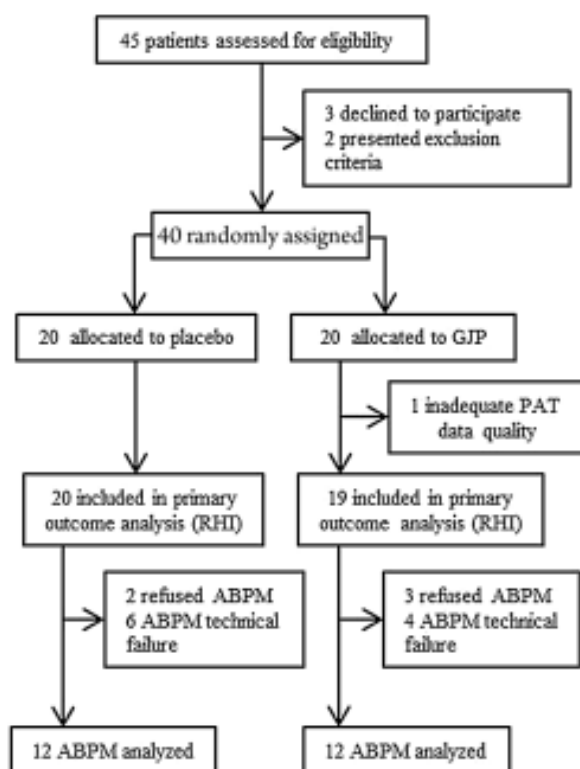
**BP measurements.** Office BP was measured in the morning following overnight polysomnography with the use of a periodically calibrated mercury sphygmomanometer with an appropriate cuff size. The BP recorded was the mean of 3 consecutive readings over a 5-min period following  $\geq 5$  min of rest in the sitting position. Ambulatory BP monitoring was performed with the use of Diasys Intégra II (NovacoR). BP measurements were performed every 15 min during the day and every 30 min at night. Average systolic, diastolic, and mean BP were measured during the day (0700–2200) and at night (2200–0700).

**Polysomnography.** Sleep recording was assessed by overnight in-laboratory polysomnography (CID 102, Cidelec), with continuous recording of the following channels: electroencephalogram, electrooculogram, chin electromyogram, arterial oxygen saturation, nasal-oral airflow, electrocardiogram, chest and abdominal wall motion, and body position. Respiratory events were scored manually. Apnea was defined as a complete cessation of airflow and hypopnea was defined as a decrease in the nasal pressure signal by  $\geq 30\%$  associated with either  $\geq 3\%$  arterial oxygen desaturation or arousal, both lasting  $\geq 10$  s (28).

**Sample size and statistical analysis.** No data are available in the literature concerning the impact of polyphenols on RHI in OSA patients. In this pilot study, we evaluated the impact of GJP on RHI in 20 participants compared with 20 participants receiving placebo. Categorical data were expressed as numbers and percentages, and were compared by Fisher's exact test. Continuous data were expressed as medians and IQRs, and were compared by Mann-Whitney *U* tests. All randomly assigned participants were included in the intention-to-treat analysis. In a post hoc analysis, the median baseline RHI in the overall population was used to classify patients into low and high RHI groups. The type I error was set at 0.05.

**TABLE 1** Grape juice powder phenolic compound concentrations

Hydroxybenzoic acids, mg/g	1.22
Flavan-3-ols, mg/g	45.01
Stilbenes, mg/g	0.70
Dihydroflavonol, mg/g	0.82
Hydroxycinnamic acids, mg/g	4.34
Flavonols, mg/g	8.08
Anthocyanins, mg/g	15.23



**FIGURE 1** Flow diagram showing trial allocation. ABPM, ambulatory blood pressure measurement; GJP, grape juice polyphenol; PAT, peripheral arterial tonometry; RHI, reactive hyperemia index.

## Results

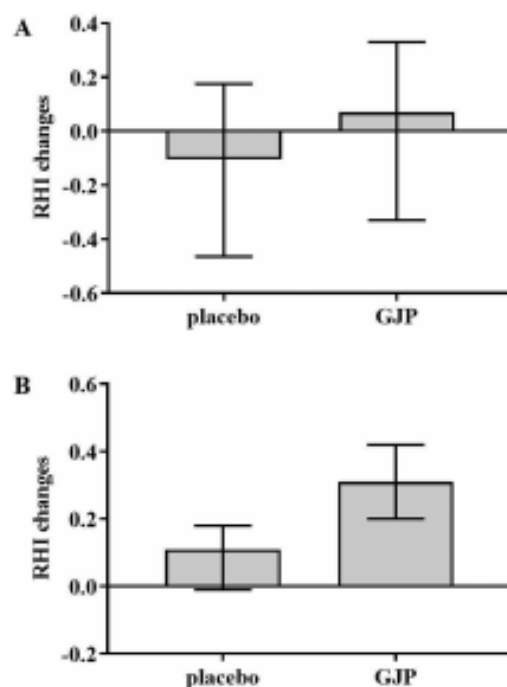
A flow diagram depicting the recruitment and randomization pathway is shown in Figure 1. Between 18 December 2013 and 24 August 2015, 45 participants were screened, 40 of whom were enrolled and completed the study. Treatment adherence was 100% in both the test and placebo groups. Baseline characteristics of all randomly assigned participants are summarized in Table 2. Most participants were overweight or obese, and no significant between-group differences were observed at baseline.

**TABLE 2** Baseline characteristics of participants with severe obstructive sleep apnea<sup>1</sup>

	Placebo	GJPs	<i>P</i> value <sup>2</sup>
<i>n</i>	20	20	
Age, y	60 [56, 63]	61 [50, 64]	0.89
BMI, kg/m <sup>2</sup>	30 [29, 33]	31 [29, 34]	0.38
Women, <i>n</i> (%)	6 (30)	4 (20)	0.71
Hypertension, <i>n</i> (%)	8 (40)	13 (65)	0.20
Diabetes, <i>n</i> (%)	4 (20)	6 (30)	0.71
Dyslipidemia, <i>n</i> (%)	5 (25)	7 (35)	0.73
ESS	11 [8, 12]	12 [10, 14]	0.44
AHI, <i>n</i>	45 [38, 55]	38 [32, 59]	0.51
RHI	2.10 [1.77, 2.73]	1.83 [1.59, 2.40]	0.13

<sup>1</sup>Data are expressed as median [IQR] or *n* (%), *n* = 40. AHI, apnea-hypopnea index; ESS, Epworth sleepiness score; GJP, grape juice polyphenol; RHI, reactive hyperemia index.

<sup>2</sup>*P* value corresponds to the between-group differences in baseline characteristics.



**FIGURE 2** Effects of GJP on 30-d changes in peripheral endothelial function as assessed by RHI in all participants with severe sleep apnea (A) and in those with baseline RHI <2 (median value of RHI in all participants at baseline) (B). Values are medians and IQRs, *n* = 20 in placebo group and *n* = 19 in GJP group in panel A; *n* = 7 in placebo group and *n* = 11 in GJP group in panel B. In B, the increase tended to be greater in the GJP group compared with the placebo group (*P* = 0.07). GJP, grape juice polyphenol; RHI, reactive hyperemia index.

No changes in body weight were observed between baseline and after 1 mo of treatment in the 2 groups.

**Primary outcome.** No significant difference in RHI outcome was observed between the GJP and placebo groups in the overall population (Figure 2) (*P* = 0.36). In the low RHI population a trend toward a more marked increase in RHI was observed in the GJP group compared with the placebo group [+0.31 (+0.20, +0.42) compared with +0.11 (−0.01, 0.18), respectively; *P* = 0.07].

**Secondary outcomes.** Owing to technical failures and limited device availability, ambulatory BP monitoring measures were available from only 24 participants (*n* = 12 GJP, *n* = 12 placebo). As shown in Table 3, no significant between-group differences in BP outcomes were observed between the GJP and placebo groups. The decrease in nocturnal mean BP during the study tended to be greater in the GJP group than in the placebo group (*P* = 0.09). A significant between-group difference was observed for HR changes [−1 bpm (−5, +5 bpm) in the GJP group compared with +6 bpm (+3, +10 bpm) in the placebo group; *P* = 0.001]. As shown in Table 4, no significant between-group differences were observed between GJP and placebo groups for the apnea-hypopnea index or oxygen desaturation index outcomes. A significant decrease in total sleep time (TST) was observed in the GJP group compared with the placebo group (*P* = 0.02), with no between-group differences in the distribution of sleep stages.

**TABLE 3** Effects of GJPs vs. placebo for 1 mo on office and ambulatory diurnal and nocturnal blood pressure and heart rate in participants with obstructive sleep apnea<sup>1</sup>

	Placebo		GJPs		P value <sup>2</sup>
	Baseline, mm Hg	Changes, mm Hg	Baseline, mm Hg	Changes, mm Hg	
<b>Office</b>					
SBP	128 [120, 147]	-4 [-10, 4]	128 [116, 131]	0 [-9, 7.5]	0.63
DBP	81 [72, 87]	-1 [-9, 8]	77 [71, 84]	-1 [-7, 5.5]	0.84
<b>MBP</b>					
Diurnal	97 [92, 105]	-2 [-8, 1]	99 [93, 103]	-3 [-6, 1]	0.88
Nocturnal	86 [80, 97]	5 [-2, 9]	84 [79, 103]	-3 [-6, 4]	0.09
<b>SBP</b>					
Diurnal	137 [124, 144]	-10 [-15, 1]	133 [124, 146]	+1 [-4, 4]	0.17
Nocturnal	118 [106, 127]	+3 [-4, 9]	122 [110, 141]	-1 [-8, 7]	0.31
<b>DBP</b>					
Diurnal	82 [80, 89]	-1 [-7, 6]	84 [79, 93]	-1 [-10, 2]	0.59
Nocturnal	71 [64, 80]	+4.5 [-0.8, 8]	67 [64, 83]	-1 [-5, 4]	0.17
<b>HR</b>					
Diurnal	77 [69, 86]	+5 [-2, 17]	87 [89, 96]	-3 [-10, 4]	0.09
Nocturnal	64 [57, 77]	+6 [3, 10]	75 [62, 85]	-1 [-5, 5]	0.001

<sup>1</sup>Data are medians [IQRs], n = 12/group. DBP, diastolic blood pressure; GJP, grape juice polyphenol; HR, heart rate; MBP, mean blood pressure; SBP, systolic blood pressure.

<sup>2</sup>P value corresponds to the between-group differences in changes from baseline to 1-mo follow-up.

## Discussion

To the best of our knowledge, this is the first randomized study to evaluate the impact of polyphenols on endothelial function in patients with OSA. GJP supplementation for 1 mo had no effect on endothelial function in participants with severe OSA and no history of CV disease. A trend toward an improvement in endothelial function was observed in the subgroup of participants with low baseline RHI. A trend toward a decrease in nocturnal mean BP with GJP supplementation compared with placebo was also observed.

There is growing evidence that OSA induces endothelial dysfunction that may be improved by CPAP therapy (29). Several factors may explain our negative findings concerning RHI outcomes. Although all patients had severe OSA, the mean baseline value of RHI was within the normal range, which may have been responsible for a floor effect of the intervention. This hypothesis is supported by our post hoc analysis showing a trend toward improvement of endothelial function with GJP supplementation in patients with low baseline RHI. An uncontrolled study demonstrated an improvement in RHI after 3 mo of oral appliance therapy in patients with a lower baseline RHI (~1.7) than the patients of the present study (~2.0) (12). In contrast,

a sham-controlled study (30) found no impact of CPAP therapy for 3 mo on endothelial function in participants with a similar baseline RHI to that observed in our study. It cannot be formally excluded that a 1-mo intervention was not sufficiently long to detect an improvement in RHI. However, previous studies in patients with coronary artery disease (26) or diabetes (31) demonstrated an improvement in endothelial function after 1 mo of polyphenol supplementation at similar dosages. The daily dose of polyphenols used in this study was that recommended for CV prevention (32), corresponding to the amount of polyphenols contained in 3 glasses (450 mL) of wine or grape juice.

Previous studies evaluating the impact of polyphenols on BP in patients with metabolic syndrome have reported discordant results (33). In the present study, no impact of GJPs on BP was observed in severe OSA patients with relatively low baseline BP values. However, a trend toward a decrease in nighttime BP was observed in the GJP group compared with the placebo group. This finding is consistent with the nocturnal predominance of hypertension in OSA, which is likely to be associated with the nondipping pattern of nocturnal BP. In patients with OSA and resistant hypertension, 12 wk of CPAP therapy was found to improve the nocturnal BP pattern (34).

**TABLE 4** Effects of GJPs vs. placebo for 1 mo on sleep variables in participants with obstructive sleep apnea<sup>1</sup>

	Placebo		GJPs		P value <sup>2</sup>
	Baseline	Changes	Baseline	Changes	
ESS	11 [8, 12]	-1 [-2, 0]	12 [10, 14]	-1 [-3, 0]	0.84
AHI, <i>n</i> /h	45 [38, 55]	-6 [-8, 3]	38 [32, 59]	-7 [-15, -1]	0.28
ODI, <i>n</i> /h	42 [32, 56]	-3 [-10, 3]	34 [29, 61]	-3 [-8, 2]	0.80
TST, min	463 [410, 493]	+15 [-12, 40]	447 [398, 492]	-10 [-33, 6]	0.02
N1 sleep, min	42 [27, 57]	-8 [-15, 5]	42 [28, 63]	+3 [-12, 10]	0.29
N2 sleep, min	250 [203, 289]	-10 [-44, 33]	249 [200, 265]	-30 [-61, 3]	0.22
N3 sleep, min	76 [55, 87]	+11 [-2, 21]	78 [41, 97]	+4 [-22, 16]	0.25
REM, min	90 [72, 105]	+7 [-15, 20]	87 [54, 106]	+11 [-13, 27]	0.50
MAI, <i>n</i> /h	40 [30, 47]	+40 [30, 47]	36 [27, 50]	-1 [-8, 2]	0.72

<sup>1</sup>Data are medians [IQRs], n = 20/group. AHI, apnea-hypopnea index; ESS, Epworth sleepiness scale; GJP, grape juice polyphenol; MAI, microarousal index; N1 sleep, stage 1 sleep time; N2 sleep, stage 2 sleep time; N3 sleep, stage 3 sleep time; ODI, oxygen desaturation index; REM, rapid eye movement sleep; TST, total sleep time.

<sup>2</sup>P value corresponds to the between-group differences in changes from baseline to 1-mo follow-up.



A previous randomized study in 110 healthy subjects demonstrated a decrease in nocturnal HR after 4 wk of treatment with tea polyphenols (35). Polyphenols were found to induce a negative chronotropic effect on isolated heart (36) and to decrease renal sympathetic nerve activity in hypertensive rats (37). It can be hypothesized that GJPs decreased nocturnal HR in our patients by reducing OSA-related nocturnal sympathetic activation (38).

Surprisingly, GJP supplementation was associated with a decrease in TST compared with the placebo group. Previous studies based on limited sample sizes have suggested that herbal extracts rich in polyphenols may decrease sleep latency or promote slow-wave sleep in healthy subjects or insomniac participants (39). In rodents, marine polyphenols were found to promote nonrapid eye movement sleep by modulating the benzodiazepine site of the GABA<sub>A</sub> receptor (40). As rodents present a specific polyphasic sleep pattern, it is difficult to transpose these results to the participants of the present study. However, of note in our study, the decrease in TST had no effect on subjective sleepiness assessed by ESS. Further studies are required to evaluate the impact of polyphenols on sleep.

This study presents a number of potential limitations. Endothelial function was assessed by PAT in the arterioles, whereas previous studies have reported that polyphenols improve the endothelial function of large conductance arteries, as assessed by flow-mediated vasodilation (FMD) (26). Although discordant results have been reported concerning the correlation between PAT and FMD (41, 42), there is strong evidence that PAT is a reliable and reproducible technique to accurately characterize endothelial function (43, 44). A recent review suggested that microvascular function, as assessed by PAT, might be more relevant in subjects without overt CV disease and may be an earlier indicator of CV risk than macrovascular function assessed by FMD (45). Another potential limitation of the present study is its relatively small sample size. The results of the post hoc analysis in patients with low baseline RHI indicate the need for further randomized trials to determine whether GJP supplementation may be beneficial in patients with overt CV disease and metabolic disorders who exhibit more severe baseline endothelial dysfunction.

In conclusion, 1-mo GJP supplementation had no effect on endothelial function in patients with severe OSA and no overt CV disease.

### Acknowledgments

We thank Elsa Parrot-Schinkel and Caroline Erignoux for their help with trial administration, monitoring, and coordination, as well as data management. GJPs were a generous gift from Grape'Sud. The authors' responsibilities were as follows—WT, MCM, RA, and FG: were substantially involved in the design of the study and critical revision of the paper for important intellectual content; WT, SR, VB, KM, and SH: performed the experiments; WT, SH, PP, NM, and FG: were involved in the data acquisition; J-FH: analyzed the data and performed the statistical analysis; AD: was in charge of the design of GJP and placebo capsules; and all authors: read and approved the final content of the manuscript.

### References

- Lévy P, Pépin J-L, Arnaud C, Baguet J-P, Dematteis M, Mach F. Obstructive sleep apnea and atherosclerosis. *Prog Cardiovasc Dis* 2009;51:400–10.

- Kendzierska T, Gershon AS, Hawker G, Tomlinson G, Leung RS. Obstructive sleep apnea and incident diabetes. A historical cohort study. *Am J Respir Crit Care Med* 2014;190:218–25.
- Nieto FJ, Young TB, Lind BK, Shahar E, Samet JM, Redline S, D'Agostino RB, Newman AB, Lebowitz MD, Pickering TG. Association of sleep-disordered breathing, sleep apnea, and hypertension in a large community-based study. Sleep Heart Health Study. *JAMA* 2000;283:1829–36.
- Trzepizur W, Le Vaillant M, Meslier N, Pigeanne T, Masson P, Humeau MP, Bizieux-Thaminy A, Goupil F, Choller S, Duchazeau PH, et al. Independent association between nocturnal intermittent hypoxemia and metabolic dyslipidemia. *Chest* 2013;143:1584–9.
- Savransky V, Nanayakkara A, Li J, Bevans S, Smith PL, Rodriguez A, Polotsky VY. Chronic intermittent hypoxia induces atherosclerosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175:1290–7.
- Lavie L, Lavie P. Molecular mechanisms of cardiovascular disease in OSAHS: the oxidative stress link. *Eur Respir J* 2009;33:1467–84.
- 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.
- Lavie L, Vishnevsky A, Lavie P. Evidence for lipid peroxidation in obstructive sleep apnea. *Sleep* 2004;27:123–8.
- Kohler M, Craig S, Nicoll D, Leeson P, Davies RJO, Stradling JR. Endothelial function and arterial stiffness in minimally symptomatic obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;178:984–8.
- Foster GE, Hanly PJ, Ahmed SB, Beaudin AE, Pialoux V, Poulin MJ. Intermittent hypoxia increases arterial blood pressure in humans through a renin-angiotensin system-dependent mechanism. *Hypertension* 2010;56:369–77.
- Kizawa T, Nakamura Y, Takahashi S, Sakurai S, Yamauchi K, Inoue H. Pathogenic role of angiotensin II and oxidized LDL in obstructive sleep apnea. *Eur Respir J* 2009;34:1390–8.
- Itzhaki S, Dorchin H, Clark G, Lavie L, Lavie P, Pillar G. The effects of 1-year treatment with a Herbst mandibular advancement splint on obstructive sleep apnea, oxidative stress, and endothelial function. *Chest* 2007;131:740–9.
- Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial function and dysfunction testing and clinical relevance. *Circulation* 2007;115:1285–95.
- Kohler M, Stoewhas A-C, Ayers L, Senn O, Bloch KE, Russi EW, Stradling JR. Effects of continuous positive airway pressure therapy withdrawal in patients with obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;184:1192–9.
- Trzepizur W, Gagnadoux F, Abraham P, Rousseau P, Meslier N, Saumer J-L, Racineux J-L. Microvascular endothelial function in obstructive sleep apnea: Impact of continuous positive airway pressure and mandibular advancement. *Sleep Med* 2009;10:746–52.
- Weaver TE, Grunstein RR. Adherence to continuous positive airway pressure therapy. *Proc Am Thorac Soc* 2008;5:173–8.
- 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;375:919–31.
- Peker Y, Glantz H, Eulenburger 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;194:613–20.
- Kerley CP, Hutchinson K, Bramham J, McGowan A, Faul J, Cormican L. Vitamin D Improves selected metabolic parameters but not neuropsychological or quality of life indices in OSA: a pilot study. *J Clin Sleep Med JCSM Off Publ Am Acad Sleep Med* 2017;13:19–26.
- Grebe M, Eisele HJ, Weissmann N, Schaefer C, Tillmanns H, Seeger W, Schulz R. Antioxidant vitamin C improves endothelial function in obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173:897–901.
- Arts ICW, Hollman PCH. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr* 2005;81:317S–25S.
- Erlund I, Koli R, Alfthan G, Marniemi J, Puukka P, Mustonen P, Mattila P, Jula A. Favorable effects of berry consumption on platelet function, blood pressure, and HDL cholesterol. *Am J Clin Nutr* 2008;87:323–31.
- Karlsen A, Svendsen M, Seljeflot I, Laake P, Duttaroy AK, Drevon CA, Arnesen H, Tonstad S, Blomhoff R. Kiwifruit decreases blood pressure and whole-blood platelet aggregation in male smokers. *J Hum Hypertens* 2013;27:126–30.

24. Keevil JG, Osman HE, Reed JD, Folts JD. Grape juice, but not orange juice or grapefruit juice, inhibits human platelet aggregation. *J Nutr* 2000;130:53–6.
25. Corti R, Flammer AJ, Hollenberg NK, Luscher TF. Cocoa and cardiovascular health. *Circulation* 2009;119:1433–41.
26. Heiss C, Jahn S, Taylor M, Real WM, Angeli FS, Wong ML, Amabile N, Prasad M, Rassaf T, Ottaviani JJ, et al. Improvement of endothelial function with dietary flavanols is associated with mobilization of circulating angiogenic cells in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2010;56:218–24.
27. Gagnadoux F, Pépin J-L, Vielle B, Bironneau V, Chouet-Girard F, Launois S, Meslier N, Meurice J-C, Nguyen X-L, Paris A, et al. Impact of mandibular advancement therapy on endothelial function in severe obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 2017;195:1244–52.
28. Berry RB, Budhiraja R, Gottlieb DJ, Gozal D, Iber C, Kapur VK, Marcus CL, Mehra R, Parthasarathy S, Quan SF, 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;8:597–619.
29. Schwarz EL, Puhon MA, Schlatter C, Stradling JR, Kohler M. Effect of CPAP therapy on endothelial function in obstructive sleep apnoea: a systematic review and meta-analysis. *Respirol Carlton Vic* 2015;20:889–95.
30. Simpson PJJ, Hoyos CM, Celermajer D, Liu PY, Ng MKC. Effects of continuous positive airway pressure on endothelial function and circulating progenitor cells in obstructive sleep apnoea: a randomised sham-controlled study. *Int J Cardiol* 2013;168:2042–8.
31. Kwak JH, Paik JK, Kim HI, Kim OY, Shin DY, Kim H-J, Lee JH, Lee JH. Dietary treatment with rice containing resistant starch improves markers of endothelial function with reduction of postprandial blood glucose and oxidative stress in patients with prediabetes or newly diagnosed type 2 diabetes. *Atherosclerosis* 2012;224:457–64.
32. Renaud SC, Guéguen R, Conard P, Lanzmann-Petithory D, Orgogozo J-M, Henry O. Moderate wine drinkers have lower hypertension-related mortality: a prospective cohort study in French men. *Am J Clin Nutr* 2004;80:621–5.
33. Amiot MJ, Riva C, Vinet A. Effects of dietary polyphenols on metabolic syndrome features in humans: a systematic review. *Obes Rev Off J Int Assoc Study Obes* 2016;17:573–86.
34. Martínez-García M-A, Capote F, Campos-Rodríguez F, Lloberes P, Díaz de Azañón MJ, Somoza M, Masa JF, González M, Sacristán L, Barbé F, et al. Effect of CPAP on blood pressure in patients with obstructive sleep apnea and resistant hypertension: the HIPARCO randomized clinical trial. *JAMA* 2013;310:2407–15.
35. Hodgson JM, Woodman RJ, Puddey IB, Mulder T, Fuchs D, Croft KD. Short-term effects of polyphenol-rich black tea on blood pressure in men and women. *Food Funct* 2013;4:111–5.
36. Lim Y-C, Budin SB, Othman F, Latip J, Zainalabidin S. Roselle polyphenols exert potent negative inotropic effects via modulation of intracellular calcium regulatory channels in isolated rat heart. *Cardiovasc Toxicol* 2016;1–9.
37. Tanida M, Tsuruoka N, Shen J, Kiso Y, Nagai K. Effects of oolong tea on renal sympathetic nerve activity and spontaneous hypertension in rats. *Metabolism* 2008;57:526–34.
38. Fletcher EC. Sympathetic over activity in the etiology of hypertension of obstructive sleep apnea. *Sleep* 2003;26:15–9.
39. Meolie AL, Rosen C, Kristo D, Kohrman M, Gooneratne N, Aguilard RN, Fayle R, Troell R, Townsend D, Claman D, et al. Oral nonprescription treatment for insomnia: an evaluation of products with limited evidence. *J Clin Sleep Med JCSM Off Publ Am Acad Sleep Med* 2005;1:173–87.
40. Cho S, Yoon M, Pae AN, Jin Y-H, Cho N-C, Takata Y, Urade Y, Kim S, Kim J-S, Yang H, et al. Marine polyphenol phlorotannins promote non-rapid eye movement sleep in mice via the benzodiazepine site of the GABAA receptor. *Psychopharmacology (Berl)* 2014;231:2825–37.
41. Kuvin JT, Patel AR, Sliney KA, Pandian NG, Sheffy J, Schnell RP, Karas RH, Udelsion JE. Assessment of peripheral vascular endothelial function with finger arterial pulse wave amplitude. *Am Heart J* 2003;146:168–74.
42. Lian BQ, Keaney JF. Predicting ischemic heart disease in women: the value of endothelial function. *J Am Coll Cardiol* 2010;55:1697–9.
43. Bonetti PO, Pumper GM, Higano ST, Holmes DR, Kuvin JT, Lerman A. Noninvasive identification of patients with early coronary atherosclerosis by assessment of digital reactive hyperemia. *J Am Coll Cardiol* 2004;44:2137–41.
44. Matsuzawa Y, Sugiyama S, Sugamura K, Nozaki T, Ohba K, Konishi M, Matsubara J, Sumida H, Kaikita K, Kojima S, et al. Digital assessment of endothelial function and ischemic heart disease in women. *J Am Coll Cardiol* 2010;55:1688–96.
45. Flammer AJ, Anderson T, Celermajer DS, Creager MA, Deanfield J, Ganz P, Hamburg NM, Luscher TF, Shechter M, Taddei S, et al. The assessment of endothelial function: from research into clinical practice. *Circulation* 2012;126:753–67.

## ORIGINAL ARTICLE

# Impact of Mandibular Advancement Therapy on Endothelial Function in Severe Obstructive Sleep Apnea

Frédéric Gagnadoux<sup>1,2</sup>, Jean-Louis Pépin<sup>3,4</sup>, Bruno Vielle<sup>5</sup>, Vanessa Bironneau<sup>6</sup>, Frédérique Chouet-Girard<sup>7</sup>, Sandrine Launols<sup>3,4</sup>, Nicole Meslier<sup>1,2</sup>, Jean-Claude Meurice<sup>6</sup>, Xuan-Lan Nguyen<sup>8</sup>, Audrey Paris<sup>9</sup>, Pascaline Priou<sup>1,2</sup>, Renaud Tamisier<sup>3,4</sup>, Wojciech Trzepizur<sup>1,2</sup>, François Goupil<sup>9</sup>, and Bernard Fleury<sup>8</sup>

<sup>1</sup>Université Bretagne Loire, INSERM UMR 1063, Angers, France; <sup>2</sup>Département de Pneumologie and <sup>5</sup>Centre de Recherche Clinique, CHU d'Angers, Angers, France; <sup>3</sup>Université Grenoble Alpes, HP2, INSERM UMR 1042, Grenoble, France; <sup>4</sup>CHU de Grenoble, Laboratoire EFCR, Clinique Universitaire de Physiologie, Grenoble, France; <sup>6</sup>Université de Poitiers, CHU, Service de Pneumologie, Poitiers, France; <sup>7</sup>Service de Chirurgie Maxillo-faciale et Stomatologie and <sup>8</sup>Service de Pneumologie, Centre Hospitalier, Le Mans, France; and <sup>9</sup>Université Paris VI, Hôpital Saint-Antoine, Unité de Sommeil, Paris, France

### Abstract

**Rationale:** Endothelial dysfunction, a major predictor of late cardiovascular events, is linked to the severity of obstructive sleep apnea (OSA).

**Objectives:** To determine whether treatment with mandibular advancement device, the main alternative to continuous positive airway pressure, improves endothelial function in patients with severe OSA.

**Methods:** In this trial, we randomized patients with severe OSA and no overt cardiovascular disease to receive 2 months of treatment with either effective mandibular advancement device or a sham device. The primary outcome, change in reactive hyperemia index, a validated measurement of endothelial function, was assessed on an intention-to-treat basis. An embedded microsensor objectively measured treatment compliance.

**Measurements and Main Results:** A total of 150 patients (86% males; mean [SD] age, 54 [10] yr; median [interquartile range] apnea-hypopnea index, 41 [35–53]; mean [SD] Epworth sleepiness

scale, 9.3 [4.2]) were randomized to effective mandibular advancement device (n = 75) or sham device (n = 75). On intention-to-treat analysis, effective mandibular advancement device therapy was not associated with improvement of endothelial function compared with the sham device. Office and ambulatory blood pressure outcomes did not differ between the two groups. Effective mandibular advancement device therapy was associated with significant improvements in apnea-hypopnea index ( $P < 0.001$ ); microarousal index ( $P = 0.008$ ); and symptoms of snoring, fatigue, and sleepiness ( $P < 0.001$ ). Mean (SD) objective compliance was 6.6 (1.4) h/night with the effective mandibular advancement device versus 5.6 (2.3) h/night with the sham device ( $P = 0.006$ ).

**Conclusions:** In moderately sleepy patients with severe OSA, mandibular advancement therapy reduced OSA severity and related symptoms but had no effect on endothelial function and blood pressure despite high treatment compliance.

Clinical trial registered with [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov) (NCT 01426607).

**Keywords:** obstructive sleep apnea; mandibular advancement device; endothelial function

(Received in original form September 8, 2016; accepted in final form January 27, 2017)

Supported by a grant from the French Ministry of Health (PHRC-I 2010-06).

**Author Contributions:** F. Gagnadoux, J.-L.P., B.V., V.B., F.C.-G., S.L., N.M., J.-C.M., X.-L.N., A.P., P.P., R.T., W.T., F. Goupil, and B.F. were substantially involved in the design of the study and critical revision of the paper for important intellectual content. F. Gagnadoux, J.-L.P., B.V., and B.F. were substantially involved in drafting the article. All authors were substantially involved in data acquisition, data analysis, or interpretation of data. All authors critically revised the article for important intellectual content. All authors approved this final version of the article.

Correspondence and requests for reprints should be addressed to Frédéric Gagnadoux, M.D., Ph.D., Département de Pneumologie, CHU, 4 rue Larrey, 49100, Angers, France. E-mail: [fgagnadoux@chu-angers.fr](mailto:fgagnadoux@chu-angers.fr)

This article has an online supplement, which is accessible from this issue's table of contents at [www.atsjournals.org](http://www.atsjournals.org)

Am J Respir Crit Care Med Vol 195, Iss 9, pp 1244–1252, May 1, 2017

Copyright © 2017 by the American Thoracic Society

Originally Published in Press as DOI: 10.1164/rccm.201609-1817OC on January 27, 2017

Internet address: [www.atsjournals.org](http://www.atsjournals.org)

### At a Glance Commentary

#### Scientific Knowledge on the

**Subject:** Endothelial dysfunction, a major predictor of late cardiovascular events, is linked to the severity of obstructive sleep apnea, and the impact of continuous positive airway pressure remains debated. Whether mandibular advancement therapy, the main alternative to continuous positive airway pressure, improves endothelial function in patients with severe obstructive sleep apnea has not been evaluated in properly controlled and adequately powered trials.

#### What This Study Adds to the

**Field:** This multicenter randomized controlled trial shows that treating severe obstructive sleep apnea with a mandibular advancement device reduces sleep-disordered breathing and related symptoms but has no impact on peripheral endothelial function and blood pressure in moderately sleepy patients with no overt cardiovascular disease.

Obstructive sleep apnea (OSA) is a highly prevalent disease (1) characterized by recurrent episodes of partial or complete obstruction of the upper airway during sleep. Continuous positive airway pressure (CPAP), the first-line therapy for moderate-to-severe OSA, improves daytime alertness and health-related quality of life, and reduces blood pressure (BP) (2, 3). In prospective cohort studies, regular CPAP use is associated with a lower risk of cardiovascular (CV) events (4). However, about 40% of patients who are prescribed CPAP are at risk of nonadherence (5). Mandibular advancement devices (MAD) have emerged as the main therapeutic alternative for OSA. Despite the superior efficacy of CPAP in reducing sleep-disordered breathing, most randomized trials comparing MAD and CPAP in OSA have reported similar health outcomes in terms of sleepiness, neurobehavioral functioning, quality of life, and BP (2, 6, 7). In a recent randomized trial, MAD and CPAP therapy resulted in a similar improvement in cardiac autonomic function (8).

Endothelial dysfunction is a pathophysiologic determinant of atherosclerosis that occurs at the early stages of coronary artery disease (9) and predicts the occurrence of CV events in at-risk subjects (10). Flow-mediated dilatation (FMD) of the brachial artery has been extensively used as a noninvasive measure of endothelial function. However, the FMD technique is time-consuming and requires a careful learning curve, which limits its routine application in large multicenter studies. Measuring endothelial function by peripheral arterial tonometry (PAT) has recently gained increased attention, as the reactive hyperemia index (RHI) measured by PAT is a validated marker of endothelial function (11). Validation studies have demonstrated that RHI is correlated with coronary microvascular function in patients with early atherosclerosis (12) and predicts CV events (13–15). Nitric oxide plays an important role in digital reactive hyperemia (16). Kuvin and colleagues (17) found a significant correlation ( $r = 0.55$ ;  $P < 0.0001$ ) between RHI and FMD in 89 subjects, 38% of whom had a history of coronary artery disease. RHI was also significantly correlated with FMD ( $r = 0.47$ ;  $P < 0.001$ ) in nonobese and nonsmoker subjects free of overt CV disease (18). In the Framingham Health Study, RHI correlated with traditional CV risk factors but the association with FMD was not significant in multivariable-adjusted analyses (19). RHI may provide a more comprehensive assessment of vascular function by measuring components of vasodilatation that are not reflected by FMD (20). Several clinic-based and population-based studies have demonstrated that OSA is associated with severity-dependent deterioration of endothelial function assessed by RHI in adults and children (21–26).

Previous studies of endothelial function outcomes in response to CPAP therapy of OSA have reported conflicting results (27–29). A recent metaanalysis concluded that CPAP leads to significant improvement of endothelial function (28). However, most of these trials were small single-center studies evaluating endothelial function by FMD that may be prone to intraoperator and interoperator variability. Conversely, two recent randomized controlled trials showed no impact of 12 weeks of CPAP on endothelial function evaluated by PAT

(27, 29). The impact of MAD therapy on endothelial function in patients with OSA has not been evaluated in properly controlled and adequately powered trials. MAD studies are also frequently flawed by the absence of objectively measured compliance with the device. The aim of this multicenter randomized controlled trial was to investigate whether effective MAD therapy versus a sham device for 2 months is associated with improvement of endothelial function in patients with severe OSA and no overt CV disease with objective measurement of MAD compliance by an embedded microsensor.

## Methods

### Study Design and Patients

This randomized, single-blind, parallel-group trial was conducted in five French sleep centers. This study was approved by our local ethics committee (Comité de Protection des Personnes, Ouest II, Angers; No. 2010/14) and was registered with ClinicalTrials.gov (NCT01426607).

### Participants

Patients aged 18–70 years with severe OSA (apnea-hypopnea index [AHI],  $\geq 30$ ), for whom MAD therapy was considered as second-line therapy because of CPAP intolerance, were assessed for eligibility. Exclusion criteria were body mass index (BMI) greater than or equal to 32 kg/m<sup>2</sup>; history of CV disease including coronary heart disease, heart failure, arrhythmias, and stroke; coexisting sleep disorders other than OSA; central sleep apnea defined by a central apnea index greater than or equal to 5; severe daytime sleepiness defined by an Epworth Sleepiness Scale (ESS) greater than or equal to 16 (5); and inadequate dental structure or temporomandibular joint disease contraindicating MAD treatment as assessed by a dentist. All patients gave their written informed consent to participate in the study.

### Randomization

Patients were randomly assigned to receive 2 months of treatment with either effective MAD or a sham device according to a 1:1 allocation using a computer-generated randomization list stratified by site with permuted blocks of

random sizes. As previously described (30), the MAD was custom-made, consisting of an adjustable two-piece acrylic oral appliance (AMO; Orthosom, Beaucauzé, France) with attachments of various sizes allowing mandibular advancement adjustment (Figure 1). The sham device consisted of the upper appliance only and did not advance the mandible (31). Patients were informed that the aim of the study was to evaluate the efficacy of two intraoral devices for OSA therapy by comparing two appliances. With ethics committee approval, patient blinding was achieved by concealing the less effective nature of the sham device (31).

### Interventions

At baseline, patients underwent overnight in-laboratory polysomnography (PSG), PAT, clinic BP measurement, and 24-hour ambulatory BP monitoring (ABPM), followed by a 6-week MAD acclimatization period, during which the mandible was incrementally advanced by 1-mm steps every 1 or 2 weeks until symptom relief or until adverse effects prevented further advancement. This acclimatization period was performed to optimize MAD adaptation and therapeutic efficacy during the subsequent randomized trial (31). Patients were then submitted to a 1-week washout period, after which they were allocated to receive 2 months of treatment with either effective MAD or the sham device. Clinical assessment, PSG with effective MAD or sham device, PAT, clinic BP, and ABPM were performed after the 2-month treatment period.



**Figure 1.** The effective mandibular advancement device used in the study. Full-coverage acrylic appliances designed to fit onto the upper and lower dental arches are connected by acrylic plates of various sizes allowing mandibular advancement adjustment. The microsensor thermometer was sealed into the upper arch of the device. The sham device consisted of the upper appliance alone.

### Outcomes

The primary outcome was the change in RHI assessed by PAT (EndoPAT; Itamar Medical Ltd., Caesarea, Israel) between baseline and after 2 months of effective MAD or sham device. All participating centers followed the same procedure and investigators assessing PAT were blinded to the patient's study arm.

Secondary outcome measures included changes in PSG data, BP, clinical symptoms of OSA, treatment side effects, and compliance. Overnight PSG was analyzed manually according to recommended criteria (32). The recorded clinic BP was the average of three consecutive readings over a 5-minute period after resting for at least 5 minutes in the sitting position. ABPM was performed using Diasys Intégra II (NovacoR, Rueil Malmaison, France). Excessive daytime sleepiness was evaluated at baseline and at 2-month follow-up by the ESS (5). Outcome of OSA symptoms, global treatment satisfaction, and reported side effects were assessed at 2-month follow-up using specific questionnaires (30). Reported compliance was assessed by means of a diary and objective compliance was measured by an embedded microsensor thermometer, safety and reliability of which have been previously validated (TheraMon; IFT Handels und Entwicklungsgesellschaft GmbH, Handelsagentur Gschladt, Hargelsberg, Austria) (33).

Additional details on methods are provided in the online supplement.

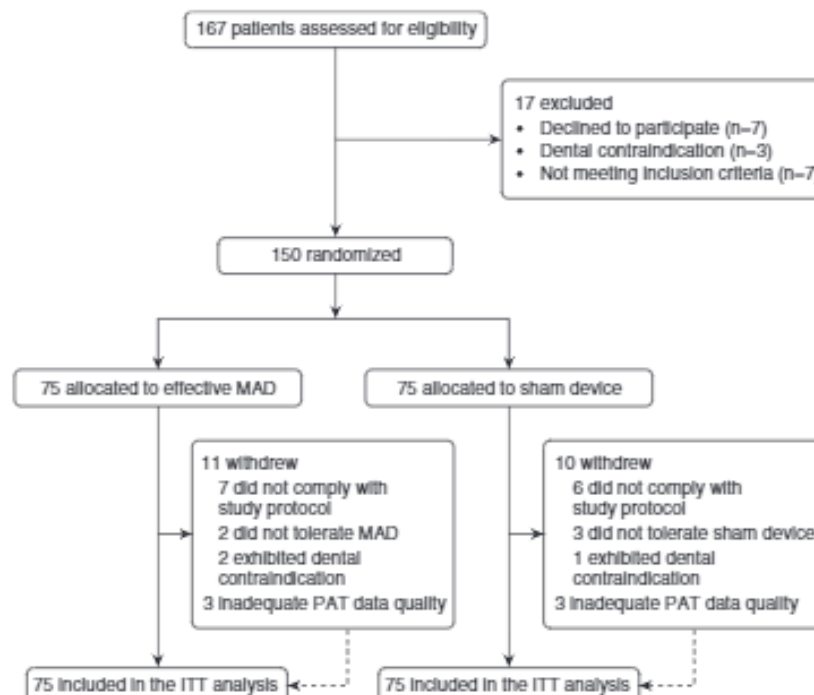
### Sample Size and Statistical Analysis

Based on previous studies using PAT in OSA (22, 34), we assumed that the RHI

would increase by 0.20 with MAD versus 0 with the sham device with a SD of 0.40. To detect a difference of 0.20 in RHI between groups with a 0.80 power at a 0.05 type I error, the sample size in each group was 64 patients plus 11 patients for potential patients lost to follow-up (i.e., 75 patients per group). Continuous variables were described as mean (SD) or mean (95% confidence interval [CI]) for variables with a normal distribution and as median (interquartile range) for variables with a nonnormal distribution. Normality of distribution was assessed using the Kolmogorov-Smirnov test. Normal variables were analyzed using an unpaired Student's *t* test for intergroup difference and a paired *t* test for intragroup difference. Linear regression analysis was used to adjust for baseline values and potential covariates. Nonnormal variables were analyzed using the Mann-Whitney test for intergroup difference and the Wilcoxon signed rank test for intragroup difference. The chi-square test and Fisher exact test were used for categorical variables, as appropriate. The correlation between continuous variables was assessed by Pearson correlation coefficient. All randomized patients were included in the intention-to-treat analysis. A sensitivity analysis using multiple imputation to impute missing data for the primary outcome was performed (35). All reported *P* values were two-sided. A *P* value less than or equal to 0.05 was considered to indicate statistical significance. All analyses were performed using STATA version 13.1 (STATA Corp., College Station, TX).

### Results

A flow diagram depicting the recruitment and randomization pathway is shown in Figure 2. Between March 2011 and November 2014, a total of 167 patients were screened and 150 were deemed eligible and randomly assigned (75 to the effective MAD group and 75 to the sham device group). In the effective MAD group, mean mandibular advancement was 7.9 (1.5) mm, corresponding to an average of 106% of maximum voluntary advancement. The baseline characteristics of all randomized patients are summarized in Table 1. Only sex was significantly different between the two groups, with a higher proportion of



**Figure 2.** Flow diagram showing trial allocation. ITT – intention-to-treat; MAD – mandibular advancement device; PAT – peripheral arterial tonometry.

women in the effective MAD group ( $P=0.02$ ). In the effective MAD group, 11 patients dropped out of the study and three had inadequate PAT data. In the sham device group, 10 patients dropped out of the study and three had inadequate

PAT data. BMI did not change during the study period in either of the two groups. After 2 months of effective MAD, a complete response (AHI reduced by  $\geq 50\%$  to  $< 5$ ) was obtained in 9.7% patients. A partial response (AHI reduced by  $\geq 50\%$

to  $\geq 5$ ) was observed in 45.3% of patients. Forty-five percent of patients were poor responders with less than 50% reduction in AHI (median AHI reduction, 30%).

### Primary Outcome

In the intention-to-treat analysis, RHI decreased by 0.03 in the effective MAD group ( $P=0.95$ ) and by 0.13 ( $P=0.13$ ) in the sham device group (Table 2). After adjustment for baseline values, age, sex, BMI, AHI, and smoking habits, the difference in RHI outcome between effective MAD and sham device was not statistically significant (adjusted intergroup difference: 0.15; 95% CI,  $-0.08$  to  $0.38$ ;  $P=0.20$ ). In the overall population, change in RHI from baseline to follow-up was not correlated with either change in AHI ( $r=-0.08$ ;  $P=0.41$ ) or change in 3% oxygen desaturation index ( $r=-0.04$ ;  $P=0.64$ ). In a *post hoc* analysis, we used the median value of baseline RHI (2.1) to classify patients into low- and high-RHI groups. In the low-RHI group, a significant improvement in RHI was observed with both effective MAD ( $P=0.004$ ) and sham device ( $P=0.03$ ) with no significant adjusted intergroup difference between the two treatments. Further *post hoc* analyses showed no significant interaction between intergroup differences in RHI outcome and sex (0.54 [95% CI,  $-0.67$  to  $1.74$ ] in women vs. 0.12 [95% CI,  $-0.17$  to  $0.41$ ] in men;  $P=0.37$ ) or

**Table 1.** Baseline Characteristics of all Randomized Patients

	All Patients (n = 150)	Effective MAD (n = 75)	Sham Device (n = 75)	P Value
Age, yr	53.8 (10.2)	54.8 (9.9)	52.9 (10.5)	0.27
BMI, kg/m <sup>2</sup>	27.0 (3.2)	26.9 (2.9)	27.0 (3.5)	0.85
Women, %	14.4	21.4	7.2	0.02
Hypertension,* %	20.7	22.4	19.1	0.64
Diabetes, %	5.1	2.9	7.3	0.44
Dyslipidemia, %	11.7	13.0	10.3	0.62
Current smoker, %	17.4	10.8	23.9	0.05
Epworth Sleepiness Score	9.3 (4.2)	9.4 (4.1)	9.2 (4.3)	0.82
VAS for snoring intensity	8.0 (6.6–9.0)	8.0 (6.8–9.0)	8.0 (6.5–9.0)	0.93
Apnea–hypopnea index, n	41.0 (35.0–53.0)	40.0 (34.0–50.5)	47.0 (36.0–58.0)	0.06
3% oxygen desaturation index, n	31.9 (17.8)	29.2 (17.6)	34.6 (17.6)	0.07
Reactive hyperemia index	2.15 (0.61)	2.13 (0.60)	2.17 (0.63)	0.69
Clinic systolic BP, mm Hg	125.7 (14.4)	125.7 (13.8)	125.7 (15.1)	1.00
Clinic diastolic BP, mm Hg	77.7 (10.9)	76.5 (11.9)	78.9 (9.7)	0.20

*Definition of abbreviations:* BMI – body mass index; BP – blood pressure; MAD – mandibular advancement devices; VAS – 0–10 visual analog scale.

Data are expressed as mean (SD), median (interquartile range), or percentages.

\*Only patients previously diagnosed as hypertensive and taking antihypertensive medication were considered to have hypertension.

**Table 2.** Effects of Effective MAD versus Sham Device on Peripheral Endothelial Function Assessed by RHI

	Effective MAD		Sham Device		Adjusted Intergroup Differences* [Mean (95% CI)]
	Baseline	Follow-up	Baseline	Follow-up	
Overall population, mean (SD)	2.13 (0.60)	2.10 (0.63)	2.17 (0.63)	2.04 (0.59)	0.15 ( - 0.08 to 0.38)
Low RHI population <sup>†</sup> , mean (SD)	1.65 (0.24)	1.93 (0.53) <sup>‡</sup>	1.64 (0.25)	1.88 (0.57) <sup>§</sup>	0.05 ( - 0.27 to 0.37)

Definition of abbreviations: CI = confidence interval; MAD = mandibular advancement devices; RHI = reactive hyperemia index. Data are expressed as mean (SD) or mean (95% CI).

\*Adjusted for baseline value, age, sex, body mass index, apnea-hypopnea index, and smoking habits.

<sup>†</sup>Patients with baseline RHI <2.1; n = 70.

<sup>‡</sup>P < 0.01 versus baseline.

<sup>§</sup>P < 0.05 versus baseline.

BMI (0.21 [95% CI, -0.15 to 0.56] in patients with BMI  $\geq 27$  kg/m<sup>2</sup> [mean BMI, 29.5 (2.1) kg/m<sup>2</sup>; n = 70] vs. 0.10 [95% CI, -0.35 to 0.54] in patients with BMI <27 kg/m<sup>2</sup>; P = 0.70). No significant intergroup differences in RHI outcome were observed when the analysis was restricted to complete and partial responders to effective MAD (0.20; 95% CI, -0.12 to 0.52; P = 0.22), and to patients with objective compliance greater than or equal to 6 h/night on effective MAD (0.19; 95% CI, -0.10 to 0.48; P = 0.21).

### Secondary Outcomes

After adjustment for baseline values, age, sex, BMI, and AHI, effective MAD was superior to sham device in reducing AHI (P < 0.001), apnea index (P < 0.001), 3% oxygen desaturation index (P < 0.001),

and microarousal index (P = 0.008) (Table 3). With an adjusted intergroup difference of -1.0 (95% CI, -2.3 to 0.3), effective MAD was not superior to sham device for reducing ESS.

The prevalence of patients with previously diagnosed and treated hypertension was relatively low (20.7%) with no significant difference between effective MAD and sham device groups. Because of technical failures and limited device availability, ABPM measures were available in only 97 patients (n = 48 effective MAD; n = 49 sham device). Two months of MAD therapy was not associated with any significant change in clinic or ambulatory BP values compared with the sham device (Table 4).

As shown in Table 5, effective MAD was associated with significant

improvement of snoring, fatigue, and sleepiness complaints compared with sham device (P < 0.001). The global treatment satisfaction was also markedly higher in the effective MAD group than in the sham device group (P < 0.001). The mean side effects score was not significantly different between the two groups.

Compliance data are presented in Table 6. Because of technical defects in transmitting microsensor data to the TheraMon reading station, objective compliance data were available for only 105 patients (52 with MAD and 53 with sham device). The mean objective use rate was 6.6 (1.4) h/night in the effective MAD group versus 5.6 (2.3) h/night in the sham device group (P = 0.006). The percentage of compliant users was 96.1%

**Table 3.** Effects of Effective MAD versus Sham Device on Sleep Variables

	Effective MAD		Sham Device		Adjusted Intergroup Differences* [Mean (95% CI)]
	Baseline	Follow-up	Baseline	Follow-up	
ESS	9.4 (4.1)	6.8 (3.8) <sup>†</sup>	9.4 (4.1)	8.3 (4.0) <sup>‡</sup>	-1.0 (-2.3 to 0.3)
AHI, n	40.0 (34.0 to 50.5)	18.5 (11.5 to 26.0) <sup>†</sup>	40.0 (34.0 to 50.5)	38.0 (23.0 to 51.0) <sup>†</sup>	-16.6 (-22.5 to -10.7) <sup>§</sup>
AI, n	8.5 (4.5 to 18.0)	1.0 (0.0 to 5.0) <sup>†</sup>	8.5 (4.5 to 18.0)	7.0 (2.0 to 19.0) <sup>‡</sup>	-8.8 (-13.6 to -4.0) <sup>§</sup>
3% ODI, n	29.2 (17.6)	15.6 (11.4) <sup>†</sup>	29.2 (17.6)	27.4 (17.2) <sup>‡</sup>	-10.8 (-16.2 to -5.4) <sup>§</sup>
TST, min	401.5 (68.6)	396.5 (64.2)	401.5 (68.6)	378.2 (67.2)	8.2 (-15.5 to 31.8)
N1 sleep, min	36.8 (32.6)	29.4 (24.4)	36.8 (32.6)	26.5 (22.1)	0.5 (-6.3 to 7.3)
N2 sleep, min	209.1 (68.5)	199.0 (49.7)	209.1 (68.5)	202.9 (58.6)	-4.2 (-23.7 to 15.2)
N3 sleep, min	69.5 (45.5)	80.1 (40.5)	69.5 (45.5)	69.0 (40.8)	11.3 (-1.9 to 24.4)
REM, min	82.5 (31.7)	88.7 (29.7)	82.5 (31.7)	77.3 (35.1) <sup>  </sup>	2.6 (-8.6 to 13.8)
MAI, n	32.8 (16.6)	24.0 (11.5) <sup>†</sup>	32.8 (16.6)	31.7 (15.8) <sup>  </sup>	-7.0 (-12.1 to -1.8) <sup>¶</sup>

Definition of abbreviations: AHI = apnea-hypopnea index; AI = apnea index; CI = confidence interval; ESS = Epworth sleepiness score; MAD = mandibular advancement devices; MAI = microarousal index; ODI = oxygen desaturation index; TST = total sleep time.

Data are expressed as mean (SD), median (interquartile range), or mean (95% CI).

\*Adjusted for baseline value, age, sex, body mass index, and AHI.

<sup>†</sup>P < 0.001 versus baseline.

<sup>‡</sup>P < 0.01 versus baseline.

<sup>§</sup>P < 0.001.

<sup>||</sup>P < 0.05 versus baseline.

<sup>¶</sup>P < 0.01.

**Table 4.** Effects of Effective MAD versus Sham Device on Blood Pressure

	Effective MAD		Sham Device		Adjusted Intergroup Differences* [Mean (95% CI)]
	Baseline	Follow-up	Baseline	Follow-up	
Office BP, mm Hg					
SBP <sup>†</sup>	125.7 (13.8)	126.3 (16.2)	125.7 (15.1)	125.3 (14.8)	2.1 (−2.9 to 7.0)
DBP	76.5 (11.9)	76.3 (13.0)	78.9 (9.7)	77.9 (10.7)	0.4 (−4.0 to 4.8)
ABPM, mm Hg <sup>†</sup>					
Diurnal MBP <sup>‡</sup>	98.1 (10.1)	97.9 (8.6)	99.3 (10.0)	98.4 (10.7)	1.7 (−1.5 to 4.8)
Nocturnal MBP	86.4 (11.2)	87.7 (11.5)	88.0 (10.1)	86.0 (10.9)	1.6 (−2.0 to 5.2)
Diurnal SBP	130.4 (13.1)	130.5 (13.5)	132.1 (15.8)	130.9 (14.4)	3.0 (−1.3 to 7.3)
Nocturnal SBP	116.1 (13.9)	118.1 (15.1)	118.1 (15.0)	115.6 (13.7)	4.2 (−0.5 to 8.9)
Diurnal DBP	83.5 (9.5)	83.7 (8.0)	85.4 (9.2)	84.6 (9.3)	1.2 (−1.5 to 4.0)
Nocturnal DBP	71.8 (9.8)	73.1 (10.0)	74.0 (8.6)	71.9 (10.2)	1.3 (−2.0 to 4.6)

Definition of abbreviations: ABPM – ambulatory blood pressure measurement; BP – blood pressure; CI – confidence interval; DBP – diastolic BP; MAD – mandibular advancement devices; MBP – mean BP; SBP – systolic BP.

Data are expressed as mean (SD) or mean (95% CI).

\*Adjusted for baseline value, apnea-hypopnea index, age, sex, body mass index, and medical history of hypertension for BP.

<sup>†</sup>n=97.

in the effective MAD group versus 73.6% in the sham device group ( $P=0.001$ ).

Reported and objective compliances were strongly correlated in the effective MAD group ( $R^2=0.24$ ;  $P=0.002$ ), but not in the sham device group ( $R^2=0.06$ ;  $P=0.15$ ) (see Figure E1 in the online supplement).

**Table 5.** Symptoms of Obstructive Sleep Apnea, Global Treatment Satisfaction, and Perceived Side Effects after 2 Months with Effective MAD versus Sham Device

	Effective MAD	Sham Device	P Value
Snoring, %			
Markedly reduced	57.9	17.9	<0.001
Reduced	24.6	30.4	
Unchanged	5.3	33.9	
Increased	1.7	14.3	
Not applicable	10.5	3.6	
Fatigue, %			
Markedly reduced	25.0	3.6	<0.001
Reduced	53.6	32.1	
Unchanged	19.6	48.2	
Increased	0.0	14.3	
Not applicable	1.8	1.8	
Sleepiness, %			
Markedly reduced	30.4	9.1	0.001
Reduced	35.7	29.1	
Unchanged	26.8	50.9	
Increased	0.0	9.1	
Not applicable	7.1	1.8	
Global treatment satisfaction*	8 (7–9)	5 (2–7)	<0.001
Mean side effects score <sup>†</sup>	2 (1–4)	2 (0–3)	0.14

Definition of abbreviation: MAD – mandibular advancement devices.

Data are expressed as percentages or median (interquartile range).

\*Global treatment satisfaction was assessed using a 0–10 visual analog scale.

<sup>†</sup>Patients were asked to give a score from 0 to 3 (0, absent; 1, mild; 2, moderate; 3, severe) regarding six common side effects of oral appliance therapy (jaw pain, tooth pain, muscle stiffness, dry mouth, hypersalivation, and occlusal change). A mean side effects score from 0 to 18 was then calculated (30).

## Discussion

This randomized sham-controlled multicenter trial showed that 2 months of effective MAD therapy with a high level of compliance had no effect on endothelial function in patients with severe OSA and no overt CV disease. Moreover, BP outcomes

did not differ between the effective MAD and the sham device groups. Effective MAD was more effective than the sham device to improve OSA severity and related symptoms.

There is growing evidence that OSA directly affects the vascular endothelium by promoting inflammation and oxidative stress, while decreasing nitric oxide availability and repair capacity (4). Endothelial dysfunction is considered to be one of the intermediate mechanisms that potentially contribute to the increased risk of CV disease in OSA (4).

Very few studies have evaluated whether effective MAD therapy of OSA may improve endothelial function (34, 36). An observational study in 16 OSA subjects reported a significant improvement of endothelial function measured by PAT after 3 months of MAD therapy (34). A crossover trial in 12 patients with OSA reported an equivalent improvement of microvascular endothelial function after 2 months of CPAP versus MAD therapy (36). Several hypotheses can be proposed to explain our negative findings for RHI outcome. Previous studies have reported higher response rates on MAD despite similar degrees of mandibular advancement, but these studies included a majority of patients with mild-to-moderate OSA (7, 37) or excluded MAD nonresponders during the titration procedure (30). The hypothesis of an insufficient reduction in AHI is not supported by the fact that changes in RHI were not correlated with changes in



**Table 6.** Treatment Compliance with Effective MAD versus Sham Device in 105 Patients for whom Objective Compliance Measurement Data were Available

	MAD (n = 52)	Sham Device (n = 53)	P Value
Objective compliance			
Use rate, h/night	6.6 (1.4)	5.6 (2.3)	0.006
Compliant users,* %	96.1	73.6	0.001
Self-reported compliance			
Use rate, h/night	7.3 (0.9)	6.8 (1.1)	0.03
Compliant users,* %	100.0	97.4	0.46

Definition of abbreviation: MAD = mandibular advancement devices.

Data are expressed as mean (SD) or percentages.

\*Use rate >4 h/day.

either AHI or 3% oxygen desaturation index and that *post hoc* analysis restricted to effective MAD responders showed no intergroup differences in RHI outcome. Furthermore, two recent randomized studies reported no impact of CPAP therapy on RHI despite suppression of apneic events by CPAP (27, 29).

It cannot be formally excluded that a 2-month intervention was not sufficiently long to detect an improvement of RHI. A previous study reported a significant increase in RHI after 3 months of MAD therapy in 16 subjects with OSA (34), but this was an uncontrolled study with no sham device group. A randomized trial in type 2 diabetes, a frequent comorbid condition in OSA, demonstrated improvement of RHI after only 4 weeks of dietary intervention (38).

In the present study, we assessed endothelial function by PAT in the arterioles, whereas several previous studies have reported that CPAP improves endothelial function of large conductance arteries as assessed by FMD (28). Although discordant results have been reported concerning the correlation between PAT and FMD (17–19), there is strong evidence that PAT is a reliable and reproducible technique to accurately characterize endothelial function in multicenter studies (11–15, 39). A recent review (11) suggested that microvascular function might be more relevant in subjects without overt CV disease and may be an earlier indicator of CV risk than macrovascular function assessed by FMD. From a technical viewpoint, PAT offers the advantages of being less prone to operator error than FMD (20).

Only a few randomized, controlled trials have evaluated the impact of MAD on

BP in patients with OSA. In a randomized crossover trial including 61 patients diagnosed with OSA of whom 39% were on antihypertensive medication, MAD therapy for 4 weeks was associated with a significant reduction in mean 24-hour diastolic BP, awake-systolic BP, and awake-diastolic BP when compared with the sham device (31). However, in a subsequent study from the same group, neither CPAP nor MAD improved BP in 108 patients with moderate-to-severe OSA (7). Our negative findings on BP outcomes should not be generalized to all patients with OSA, because our study population presented several baseline characteristics that have been associated with lower BP reduction in response to OSA therapy, including a low prevalence of hypertension, low baseline BP values, and mild daytime sleepiness (40). Further randomized trials are required to determine whether MAD therapy improves BP in patients with OSA and uncontrolled or resistant hypertension.

In line with a recent randomized clinical trial (37), we observed improvements in ESS with both effective MAD and sham device, but changes in ESS did not significantly differ between the two groups. However, our study clearly demonstrates the beneficial impact of effective MAD on OSA severity and related symptoms. Because all patients underwent a 6-week MAD acclimatization period, it can be hypothesized that some participants would have detected a difference in mandibular advancement when randomized to the sham device, which may have influenced improvement of symptoms. However, our findings are in accordance with previous sham-controlled trials demonstrating that

MAD therapy improves the symptoms of OSA (41).

To the best of our knowledge, this is the first randomized trial of MAD therapy with objective compliance measurement. The mean objective compliance with effective MAD (6.6 h/night) was reasonably high and similar to that reported in a recent observational study using the same microsensor (33). In this study, a mean objective compliance of 6.7 h/night corresponded to approximately 90% of reported sleep duration. Interestingly, we found that reported and objective compliance were highly correlated in the effective MAD group but not in the sham device group, which emphasizes the importance of objective compliance measurement in sham-controlled trials of MAD therapy.

Although this was a randomized trial, significant differences were observed for the proportion of women in the effective MAD (21.4%) and sham device (7.2%) groups. Previous studies have reported an interaction between sex and OSA on endothelial function assessed by FMD or PAT (24, 42), suggesting a higher vulnerability of the vascular endothelium to the adverse effects of OSA in women. However, despite a higher proportion of women in the effective MAD group, we found no significant impact on RHI. Furthermore, our *post hoc* analysis showed no interaction between intergroup differences in RHI outcome and sex.

One of the strengths of this study is that we included a relatively small proportion of patients with obesity and metabolic disorders and no patients with overt CV disease, allowing us to address the impact of OSA without confounders. Previous data have shown that the negative association between OSA and FMD was only observed in subjects with metabolic syndrome (43). Most studies included in a recent review on CPAP therapy and endothelial function included obese patients with a mean BMI between 29 and 37 kg/m<sup>2</sup> (28). It can be hypothesized that RHI was not sufficiently sensitive to detect changes in endothelial function directly caused by OSA. However, two recent studies demonstrated that OSA is associated with low RHI values, independently of BMI and visceral fat (21, 26). Furthermore, our *post hoc* analysis showed no interaction between intergroup

differences in RHI outcome and BMI. Recent data have shown that CPAP therapy alone in obese patients with OSA had remarkably small effects on BP, systemic inflammation, and metabolic dysfunction (44).

Considering that endothelial dysfunction is an early determinant of vascular damage that precedes clinically overt vascular disease, patients with overt CV disease were excluded from the present study and from most previous studies evaluating the impact of CPAP on endothelial function (45–47). Recent studies have shown that OSA treatment does not improve CV outcomes in patients with

OSA and overt CV disease (48, 49). The exclusion of patients with overt CV disease probably contributed to the fact that our patients had a mean baseline value of RHI within the normal range despite the presence of severe OSA (22), which may have been associated with a floor effect of the intervention. Although our *post hoc* analysis showed no intergroup differences in RHI outcome in patients with low baseline RHI, further studies are required to determine whether MAD therapy for OSA can improve endothelial function in patients with overt CV disease and metabolic disorders, who exhibit more severe endothelial dysfunction at baseline.

## Conclusions

In moderately sleepy patients with severe OSA, MAD therapy reduced sleep-disordered breathing and OSA-related symptoms with no effect on endothelial function and BP despite high treatment compliance. ■

**Author disclosures** are available with the text of this article at [www.atsjournals.org](http://www.atsjournals.org).

**Acknowledgment:** The authors thank Jean-Marie Chrélien, Sonia Dias Domingo, Caroline Erignoux, Anaïs Le Cam, Mathieu Lelay, and Marie Peeters for their help with trial administration, monitoring, and coordination, as well as data management.

## References

- Peppard PE, Young T, Barnet JH, Palta M, Hagen EW, Hla KM. Increased prevalence of sleep-disordered breathing in adults. *Am J Epidemiol* 2013;177:1006–1014.
- Bratton DJ, Gaisl T, Wons AM, Kohler M. CPAP vs mandibular advancement devices and blood pressure in patients with obstructive sleep apnea: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 2015;314:2280–2293.
- McDaid C, Griffin S, Weatherly H, Duree K, van der Burgt M, van Hout S, Akers J, Davies RJ, Sculpher M, Westwood M. Continuous positive airway pressure devices for the treatment of obstructive sleep apnoea-hypopnoea syndrome: a systematic review and economic analysis. *Health Technol Assess* 2009;13:iii–iv, xi–xiv, 1–119, 143–274.
- Sánchez-de-la-Torre M, Campos-Rodríguez F, Barbé F. Obstructive sleep apnoea and cardiovascular disease. *Lancet Respir Med* 2013;1:61–72.
- Gagnadoux F, Le Vaillant M, Goupil F, Pigeanne T, Chollet S, Masson P, Humesau MP, Bizieux-Thaminy A, Meslier N; IRSR sleep cohort group. Influence of marital status and employment status on long-term adherence with continuous positive airway pressure in sleep apnea patients. *PLoS One* 2011;6:e22503.
- Sharples LD, Clutterbuck-James AL, Glover MJ, Bennett MS, Chadwick R, Pittman MA, Quinnell TG. Meta-analysis of randomised controlled trials of oral mandibular advancement devices and continuous positive airway pressure for obstructive sleep apnoea-hypopnoea. *Sleep Med Rev* 2016;27:108–124.
- Phillips CL, Grunstein RR, Darendeliler MA, Mihailidou AS, Srinivasan VK, Yee BJ, Marks GB, Cistulli PA. Health outcomes of continuous positive airway pressure versus oral appliance treatment for obstructive sleep apnea: a randomized controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med* 2013;187:879–887.
- Glos M, Perzel T, Schoebel C, Nitzsche GR, Zimmermann S, Rudolph C, Blau A, Baumann G, Jost-Brinkmann PG, Rautengarten S, et al. Comparison of effects of OSA treatment by MAD and by CPAP on cardiac autonomic function during daytime. *Sleep Breath* 2016;20:635–646.
- Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 2003;348:593–600.
- Perticone F, Ceravolo R, Pujia A, Ventura G, Iacopino S, Scozzafava A, Ferraro A, Chello M, Mastroberberio P, Verdecchia P, et al. Prognostic significance of endothelial dysfunction in hypertensive patients. *Circulation* 2001;104:191–196.
- Flammer AJ, Anderson T, Celermajer DS, Creager MA, Deanfield J, Ganz P, Hamburg NM, Lüscher TF, Shechter M, Taddei S, et al. The assessment of endothelial function: from research into clinical practice. *Circulation* 2012;126:753–767.
- Bonetti PO, Pumper GM, Higano ST, Holmes DR Jr, Kuvin JT, Lerman A. Noninvasive identification of patients with early coronary atherosclerosis by assessment of digital reactive hyperemia. *J Am Coll Cardiol* 2004;44:2137–2141.
- Akiyama E, Sugiyama S, Matsuzawa Y, Konishi M, Suzuki H, Nozaki T, Ohba K, Matsubara J, Maeda H, Horibata Y, et al. Incremental prognostic significance of peripheral endothelial dysfunction in patients with heart failure with normal left ventricular ejection fraction. *J Am Coll Cardiol* 2012;60:1778–1786.
- Rubinshtein R, Kuvin JT, Soffler M, Lennon RJ, Lavi S, Nelson RE, Pumper GM, Lerman LO, Lerman A. Assessment of endothelial function by non-invasive peripheral arterial tonometry predicts late cardiovascular adverse events. *Eur Heart J* 2010;31:1142–1148.
- Matsuzawa Y, Sugiyama S, Sugamura K, Nozaki T, Ohba K, Konishi M, Matsubara J, Sumida H, Kaikita K, Kojima S, et al. Digital assessment of endothelial function and ischemic heart disease in women. *J Am Coll Cardiol* 2010;55:1688–1696.
- Nohria A, Gerhard-Herman M, Creager MA, Hurley B, Mitra D, Ganz P. Role of nitric oxide in the regulation of digital pulse volume amplitude in humans. *J Appl Physiol* (1985) 2006;101:545–548.
- Kuvin JT, Patel AR, Sliney KA, Pandian NG, Sheffy J, Schnall RP, Karas RH, Udelson JE. Assessment of peripheral vascular endothelial function with finger arterial pulse wave amplitude. *Am Heart J* 2003;146:168–174.
- Dhindsa M, Sommerlad SM, DeVan AE, Barnes JN, Sugawara J, Ley O, Tanaka H. Interrelationships among noninvasive measures of postischemic macro- and microvascular reactivity. *J Appl Physiol* (1985) 2008;105:427–432.
- Hamburg NM, Palmisano J, Larson MG, Sullivan LM, Lehman BT, Vasan RS, Levy D, Mitchell GF, Vita JA, Benjamin EJ. Relation of brachial and digital measures of vascular function in the community: the Framingham Heart Study. *Hypertension* 2011;57:390–396.
- Lian BQ, Keaney JF Jr. Predicting ischemic heart disease in women: the value of endothelial function. *J Am Coll Cardiol* 2010;55:1697–1699.
- Azuma M, Chihara Y, Yoshimura C, Murase K, Hamada S, Tachikawa R, Matsumoto T, Inouchi M, Tanizawa K, Handa T, et al. Association between endothelial function (assessed on reactive hyperemia peripheral arterial tonometry) and obstructive sleep apnea, visceral fat accumulation, and serum adiponectin. *Circ J* 2015;79:1381–1389.
- Itzhaki S, Lavie L, Pillar G, Tal G, Lavie P. Endothelial dysfunction in obstructive sleep apnea measured by peripheral arterial tone response in the finger to reactive hyperemia. *Sleep* 2005;28:594–600.
- Kheirandish-Gozal L, Etzioni T, Bhattacharjee R, Tan HL, Samiei A, Molero Ramirez H, Abu Ela B, Pillar G. Obstructive sleep apnea in children is associated with severity-dependent deterioration in overnight endothelial function. *Sleep Med* 2013;14:526–531.

24. Randby A, Namtvedt SK, Hrubos-Strøm H, Einvik G, Somers VK, Omland T. Sex-dependent impact of OSA on digital vascular function. *Chest* 2013;144:915–922.
25. Seif F, Patel SR, Wafia H, Rueschman M, Bhatt DL, Gottlieb DJ, Lewis EF, Patil SP, Punjabi NM, Babineau DC, et al. Association between obstructive sleep apnea severity and endothelial dysfunction in an increased background of cardiovascular burden. *J Sleep Res* 2013;22:443–451.
26. Olafiranye O, Kip KE, Rhinehart Z, Mulukutla SR, Aiyer A, Strollo PJ, Reis SE. Impact of race and obesity on arterial endothelial dysfunction associated with sleep apnea: results from the Heart SCORE study. *Int J Cardiol* 2015;201:476–478.
27. Gottlieb DJ, Punjabi NM, Mehra R, Patel SR, Quan SF, Babineau DC, Tracy RP, Rueschman M, Blumenthal RS, Lewis EF, et al. CPAP versus oxygen in obstructive sleep apnea. *N Engl J Med* 2014;370:2276–2285.
28. Schwarz EI, Puhon MA, Schlatter C, Stradling JR, Kohler M. Effect of CPAP therapy on endothelial function in obstructive sleep apnoea: a systematic review and meta-analysis. *Respirology* 2015;20:889–895.
29. Simpson PJ, Hoyos CM, Celestine D, Liu PY, Ng MK. Effects of continuous positive airway pressure on endothelial function and circulating progenitor cells in obstructive sleep apnoea: a randomised sham-controlled study. *Int J Cardiol* 2013;168:2042–2048.
30. Gagnadoux F, Fleury B, Vielle B, Pételle B, Meslier N, N'Guyen XL, Trzepizur W, Racineux JL. Titrated mandibular advancement versus positive airway pressure for sleep apnoea. *Eur Respir J* 2009;34:914–920.
31. Gotsopoulos H, Kelly JJ, Cistulli PA. Oral appliance therapy reduces blood pressure in obstructive sleep apnea: a randomized, controlled trial. *Sleep* 2004;27:934–941.
32. Berry RB, Budhiraja R, Gottlieb DJ, Gozal D, Iber C, Kapur VK, Marcus CL, Mehra R, Parthasarathy S, Quan SF, et al.; American Academy of Sleep Medicine; Deliberations of the Sleep Apnea Definitions Task Force of the American Academy of Sleep Medicine. Rules for scoring respiratory events in sleep: update of the 2007 AASM Manual for the Scoring of Sleep and Associated Events. *J Clin Sleep Med* 2012;8:597–619.
33. Vanderveken OM, Dieltjens M, Wouters K, De Backer WA, Van de Heyning PH, Braem MJ. Objective measurement of compliance during oral appliance therapy for sleep-disordered breathing. *Thorax* 2013;68:91–96.
34. Itzhaki S, Dorchin H, Clark G, Lavie L, Lavie P, Pillar G. The effects of 1-year treatment with a Herbst mandibular advancement splint on obstructive sleep apnea, oxidative stress, and endothelial function. *Chest* 2007;131:740–749.
35. Little RJA, Rubin DB. *Statistical analysis with missing data*, 2nd ed. New York: Wiley; 2002.
36. Trzepizur W, Gagnadoux F, Abraham P, Rousseau P, Meslier N, Saumet JL, Racineux JL. Microvascular endothelial function in obstructive sleep apnea: impact of continuous positive airway pressure and mandibular advancement. *Sleep Med* 2009;10:746–752.
37. Marklund M, Carlberg B, Forsgren L, Olsson T, Stenlund H, Franklin KA. Oral appliance therapy in patients with daytime sleepiness and snoring or mild to moderate sleep apnea: a randomized clinical trial. *JAMA Intern Med* 2015;175:1278–1285.
38. Kwak JH, Paik JK, Kim HI, Kim OY, Shin DY, Kim HJ, Lee JH, Lee JH. Dietary treatment with rice containing resistant starch improves markers of endothelial function with reduction of postprandial blood glucose and oxidative stress in patients with prediabetes or newly diagnosed type 2 diabetes. *Atherosclerosis* 2012;224:457–464.
39. Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA, Deanfield J, Drexler H, Gerhard-Herman M, Herrington D, et al.; International Brachial Artery Reactivity Task Force. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol* 2002;39:257–265.
40. Torres G, Sánchez-de-la-Torre M, Barbé F. Relationship between OSA and hypertension. *Chest* 2015;148:824–832.
41. Gotsopoulos H, Chen C, Qian J, Cistulli PA. Oral appliance therapy improves symptoms in obstructive sleep apnea: a randomized, controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:743–748.
42. Faulk MD, Larkin EK, Hoit BD, Aylor JE, Wright AT, Redline S. Sex influences endothelial function in sleep-disordered breathing. *Sleep* 2004;27:1113–1120.
43. Korcarz CE, Stein JH, Peppard PE, Young TB, Bamet JH, Nieto FJ. Combined effects of sleep disordered breathing and metabolic syndrome on endothelial function: the Wisconsin Sleep Cohort study. *Sleep* 2014;37:1707–1713.
44. Chirinos JA, Gurubhagavatula I, Teff K, Rader DJ, Wadden TA, Townsend R, Foster GD, Maislin G, Saif H, Broderick P, et al. CPAP, weight loss, or both for obstructive sleep apnea. *N Engl J Med* 2014;370:2265–2275.
45. Cross MD, Mills NL, Al-Abri M, Riha R, Vennelle M, Mackay TW, Newby DE, Douglas NJ. Continuous positive airway pressure improves vascular function in obstructive sleep apnoea/hypopnoea syndrome: a randomised controlled trial. *Thorax* 2008;63:578–583.
46. Ip MS, Lam B, Chan LY, Zheng L, Tsang KW, Fung PC, Lam WK. Circulating nitric oxide is suppressed in obstructive sleep apnea and is reversed by nasal continuous positive airway pressure. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:2166–2171.
47. Nguyen PK, Katikireddy CK, McConnell MV, Kushida C, Yang PC. Nasal continuous positive airway pressure improves myocardial perfusion reserve and endothelial-dependent vasodilation in patients with obstructive sleep apnea. *J Cardiovasc Magn Reson* 2010;12:50.
48. McEvoy RD, Antic NA, Heeley E, Luo Y, Ou Q, Zhang X, Mediano O, Chen R, Drager LF, Liu Z, et al.; SAVE Investigators and Coordinators. CPAP for prevention of cardiovascular events in obstructive sleep apnea. *N Engl J Med* 2016;375:919–931.
49. 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 non-sleepy obstructive sleep apnea: the RICCADSA Randomized Controlled Trial. *Am J Respir Crit Care Med* 2016;194:613–620.

**Titre :** Impact du Syndrome d'Apnées Hypopnées Obstrucitives du sommeil sur la fonction endothéliale

**Mots clés :** SAHOS, dysfonction endothéliale, EndoPATH, diabète de type 2, miRNA

**Résumé :** Le Syndrome d'apnées hypopnées obstructives du sommeil (SAHOS) est défini par un collapsus partiel ou total des voies aériennes supérieures à l'origine d'hypopnées ou d'apnées. Ceci va engendrer une hypoxie intermittente (HI) ainsi qu'une fragmentation du sommeil. Le SAHOS est associé à une augmentation de la prévalence des pathologies cardio-vasculaires (CV). Cependant, ce syndrome est très souvent associé à des comorbidités elles-mêmes responsables de complications CV : hypertension artérielle, diabète de type 2 (DT2), obésité... Un des mécanismes communs à l'ensemble de ces maladies CV est la dysfonction endothéliale (DE). Son évaluation in vivo est possible grâce à différentes techniques et notamment l'Endopath. Or, la DE est décrite comme facteur prédictif de complications CV ultérieures. Il a déjà été montré que la DE décrite au cours du SAHOS est médiée par les microvésicules (MV).

Il s'agit de petites vésicules ayant un rôle de vecteur, dans la communication inter cellulaire. Ces MV contiennent un certains nombres de molécules tels que les protéines, de l'ADN, des miRNA. Les miRNA sont de simples brins non codant d'ARN qui permettent de réguler la traduction. Certains d'entre eux sont décrits comme impliqués dans les pathologies CV et notamment la DE. Ils pourraient être une cible thérapeutique pour lutter contre les complications CV du SAHOS. L'objectif de ce travail est d'évaluer l'implication réelle du SAHOS sur l'apparition d'une DE notamment en fonction de comorbidités associées telle que le DT2 ; puis de déterminer les miR qui puissent être impliqués dans ce phénomène et de moduler leur action pour lutter contre l'apparition de complications CV.

**Title :** Impact of Obstructive Hypopnea Apnea Syndrome on endothelial function

**Keywords :** OSA, endothelial dysfunction, Endopath, type 2 diabetes, miRNA

**Abstract :** Obstructive Sleep Apnea Syndrome (OSA) is defined as a partial or total collapse of the upper airways leading to hypopneas or apneas. This will lead to intermittent hypoxia (IH) and sleep fragmentation. OSA is associated with an increase in the prevalence of cardiovascular disease (CVD). However, this syndrome is very often associated with comorbidities that are themselves responsible for CVD complications: high blood pressure, type 2 diabetes (T2D), obesity... One of the mechanisms common to all these CVD diseases is the endothelial dysfunction (ED). Its in vivo evaluation is possible thanks to different techniques and in particular Endopath. ED is described as a predictor of subsequent CVD complications. It has already been shown that the ED described during OSA is mediated by microvesicles (MV).

These are small vesicles that act as vectors for intercellular communication. These MVs contain a number of molecules such as proteins, DNA, miRNAs. miRNAs are simple, non-coding strands of RNA that regulate translation. Some of them are described as involved in CVD and in particular ED. They could be a therapeutic target to fight against the CD complications of OSA. The objective of this work is to evaluate the real involvement of OSA in the development of ED, particularly in terms of associated co-morbidities such as T2D; then to determine the miRs that may be involved in this phenomenon and to modulate their action to combat the development of CVD.

