



HAL
open science

Syndrome d'apnées obstructives du sommeil et athérosclérose : vers l'identification de la VE-Cadhérine comme biomarqueur et comme nouvelle cible thérapeutique

Olfa Harki

► To cite this version:

Olfa Harki. Syndrome d'apnées obstructives du sommeil et athérosclérose : vers l'identification de la VE-Cadhérine comme biomarqueur et comme nouvelle cible thérapeutique. Physiologie [q-bio.TO]. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2022. Français. NNT : 2022GRALV029 . tel-03917155

HAL Id: tel-03917155

<https://theses.hal.science/tel-03917155>

Submitted on 1 Jan 2023

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

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



THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : Physiologie-Physiopathologies-Pharmacologie

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Olfa HARKI

Thèse dirigée par le Dr **Anne BRIANCON-MARJOLLET**, UGA,
et codirigée par le Pr **Gilles FAURY**, UGA

Préparée au sein du **Laboratoire Hypoxie et Physiopathologie
Cardiovasculaires et Respiratoires HP2, INSERM U1300-UGA**
dans l'**École Doctorale de Chimie et Sciences du Vivant EDCSV**

Syndrome d'apnées obstructives du sommeil et athérosclérose : vers l'identification de la VE-Cadhérine comme biomarqueur et comme nouvelle cible thérapeutique.

Thèse soutenue publiquement le **29 mars 2022**, devant le jury
composé de :

Monsieur François BOUCHER

PU, Université Grenoble Alpes, Président , Examineur

Madame Muriel LAFFARGUE

Directrice de recherche, I2MC, INSERM U1297, Rapporteuse

Monsieur Wojciech TRZEPIZUR

PU-PH, Université d'Angers, CHU d'Angers, Rapporteur

Monsieur Grégory MEYER

Maitre de conférences, Université d'Avignon, Examineur

Madame Isabelle VILGRAIN

Directrice de recherche, CEA, INSERM U1036, Invitée

Monsieur Jean-Louis PEPIN

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

Mes remerciements les plus sincères...

À Mme Muriel LAFFARGUE, Mr Wojciech TRZEPIZUR, Mr François BOUCHER et Mr Grégory MEYER de l'honneur que vous m'avez fait en acceptant d'évaluer mon travail. Je remercie particulièrement Mme Muriel LAFFARGUE et Mr Wojciech TRZEPIZUR d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse.

A Mr Jean-Louis PEPIN et Mme Isabelle VILGRAIN, c'est un grand honneur de vous compter parmi ce jury. Merci pour vos précieux conseils au cours de ces années de thèse.

À Anne BRIANÇON-MARJOLLET, ma directrice de thèse, de m'avoir fait confiance dès le stage M2, de m'avoir partagé ton expertise et de m'avoir bien introduit dans le magnifique monde de la recherche scientifique et de l'enseignement. Je suis reconnaissante pour ton accompagnement et ton soutien ainsi que ta gentillesse sans faille.

À Gilles FAURY, mon co-directeur de thèse, de m'avoir partagé son savoir et pour son soutien et ses conseils professionnels et scientifiques très enrichissants. Je te remercie pour tout ça et pour la confiance que tu m'as accordée.

À toute l'équipe HP2 pour votre accueil et votre aide précieuse durant toutes ces années et tous les moments partagés. Particulièrement à Claire de m'avoir accordé de ton temps et de m'avoir partagé ton savoir notamment sur les expériences sur les souris APOE^{-/-}, et à Charles pour ton accompagnement tout au long de l'étude de méta-analyse. Merci à Audrey pour ta précieuse contribution administrative et pour toutes les demandes à contretemps. Au personnel technique pour votre soutien et pour votre compétence. Merci à Guillaume pour la bonne organisation, Sophie pour les expériences d'immunohistologie, Emeline pour les qPCR et à Sandrine et Alexandra pour votre aide notamment lors des prélèvements.

À mes co-thésards docteurs ou futurs docteurs : Mélanie, Quentin, Bilgehan, Emma, Raphael, Axel, Clément, Fatima et tous les autres pour les moments partagés.

À ma famille et mes amis, pour leur soutien au cours de ces années. À mes parents Myriam et Ammar, mes sœurs et frères, pour votre confiance et vos encouragements sans faille. À Souhail, tu étais toujours présent malgré la distance qui nous sépare... Il est temps de vivre ensemble.

A la Fondation du Souffle et Fond de Recherche en Santé Respiratoire, la fondation de l'avenir et le fond scientifique APMC "Agir pour les maladies chroniques" d'avoir financé ce projet. Grâce à vous, la thèse s'est déroulée dans des conditions optimales.

Enfin, merci à tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail et qui m'ont gentiment soutenue.

Table des matières

Liste des abréviations.....	1
Liste des Figures	3
Liste des tables.....	4
I. Introduction	5
1. L'endothélium vasculaire	6
1.1. Fonction de de l'endothélium vasculaire	6
1.1.1. Contrôle de la tonicité vasculaire.....	7
1.1.2. Contrôle de l'hémostase	9
1.1.3. Contrôle de l'angiogenèse.....	10
1.1.4. Fonction barrière.....	11
1.2. Les jonctions endothéliales	13
1.2.1. Les jonctions serrées	14
1.2.2. Les jonctions communicantes ou Gap.....	17
1.2.3. Les jonctions adhérentes	18
1.3. Focus sur la VE-cadhérine	21
1.3.1. Le domaine extracellulaire	21
1.3.2. Le domaine intracellulaire.....	22
1.3.3. Interaction de la VE-cadhérine avec les protéines adjacentes	23
1.3.4. Régulation de l'expression de la VE-cadhérine	23
1.3.5. sVE-cadhérine comme biomarqueur d'altération endothéliale	25
2. Physiopathologie de l'athérosclérose	29
3. Le syndrome d'apnées obstructives du sommeil.....	31
3.1. Epidémiologie.....	31
3.2. Définitions et aspects cliniques.....	33
3.3. Traitement par Pression Positive Continue (PPC)	35
3.4. Les complications cardiovasculaires du SAOS et impact de la PPC.....	36
3.5. L'athérosclérose et le SAOS.....	38
3.5.1. Données cliniques et précliniques.....	38
3.5.2. Mécanismes physiopathologiques sous-jacents	39
4. Hypothèse et objectifs de la thèse.....	41

II.	Approche expérimentale.....	45
1.	Modèles expérimentaux d'hypoxie intermittente.....	46
1.1.	Dispositif d'hypoxie intermittente <i>in vitro</i>	46
1.2.	Dispositif d'hypoxie intermittente <i>in vivo</i> pour rongeurs.....	48
1.3.	Dispositif d'hypoxie intermittente chez l'humain.....	49
2.	Etudes réalisées.....	51
	Etude 1 : Caractérisation des mécanismes moléculaires du clivage de la VE-cadhérine <i>in vitro</i> et recherche de sVE sérique chez l'humain.....	52
	Etude 2 : Etude de l'impact de l'inhibition du clivage de la VE-cadhérine sur l'athérosclérose induite par l'hypoxie intermittente.....	82
	Etude 3 : Méta-analyse préclinique pour étudier l'effet de l'hypoxie intermittente sur la structure et la fonction des artères chez les rongeurs.....	114
III.	Discussion générale et perspectives.....	152
IV.	Références bibliographiques.....	158
V.	Annexes.....	177

Liste des abréviations

AC: adénylate cyclase	HIF-1 : hypoxia inducible factor-1
ADAM : A disintegrin and metalloproteinase	HPMC : hydroxypropylméthylcellulose
ADP: adénosine diphosphate	HUVEC : Human umbilical vein endothelial cells
AHI : Apnea-Hypopnea Index	IARC: International Agency for Research on Cancer
AMPC: adénosine monophosphate cyclique	ICAM-1: InterCellular Adhesion Molecule-1
APOE: Apolipoprotein E	IH: intermittent hypoxia
AVC: accident vasculaire cérébral	IMC : indice de masse corporelle
CI : confidence interval	IL : interleukine
COX : cyclooxygenase	IP3 : inositol trisphosphate
CPD: cytoplasmic domain	JAM : Junctional adhesion molecule
DMSO : Diméthylsulfoxyde	LDL: Low Density Lipoprotein
EC: extracellular	LDLc: LDL-cholestérol
EDHF : Endothelium-derived hyperpolarizing factor	LPS : lipopolysaccharide
eNOS : endothelial nitric oxyde synthase	LVES : Large Vessel Endothelial Supplement
F : phenylalanine	MCP1: monocyte chemoattractant protein 1
FGF : fibroblast growth factor	MMP : matrix metalloproteinase
F _i O ₂ : fraction inspirée en oxygène	N : Normoxie
FITC : fluorescein isothiocyanate	NaBH ₄ : Sodium borohydride
FMD : flow-mediated dilation	NF-kB : nuclear factor-kB
FT: Facteur tissulaire	NO : Nitric Oxide
GMPC: guanosine monophosphate cyclique	NOS : Nitric Oxyde synthase
GTP : Guanosine triphosphate	NOX : NADPH oxydase
HAEC : Human aortic endothelial cells	ORO : Oil Red O
HI : hypoxie intermittente	OSAS: obstructive sleep apnea syndrome

PAF : platelet activating factor
PAI-1 : plasminogen activator inhibitor-1
PAT : peripheral arterial tonometry
PBS : Phosphate-buffered saline
PDGF : Platelet-derived growth factor
PECAM-1 : Platelet endothelial cell adhesion molecule
PGI2 : Prostaglandin I2
PI3K : Phosphoinositide 3-kinase
pO2 : Pression partielle de l'oxygène
PPC : pression positive continue
RHI : Reactive hyperemia index
ROS : reactive oxygen species
S : sérine
SAOS : syndrome d'apnées obstructives du sommeil
SD : standard deviation
SMD : Standardized mean difference
sVE : VE-cadhérine soluble
SYRCLE : Systematic Review Centre for Laboratory Animal Experimentation
TEER : trans-endothelial electrical resistance

TMD: transmembrane domain
TNF- α : tumor necrosis factor- α
t-PA : Tissue plasminogen activator
TXA2: thromboxane A2
usCRP : Ultra-Sensitive C-Reactive Protein
VCAM-1 : vascular cell adhesion molecule-1
VEGF: Vascular endothelial growth factor
VEGFR : Vascular endothelial growth factor receptor
WT: Wild Type
XO : xanthine oxydase
Y: tyrosine
ZO : Zonula occludens
2-ME : 2-méthoxyestradiol

Liste des Figures

Figure 1 :Récapitulatif des fonctions de l'endothélium en réponse à différents signaux.....	7
Figure 2 : Passage paracellulaire et transcellulaire à travers l'endothélium	12
Figure 3 : Structure des jonctions endothéliales.....	14
Figure 4 : A) Structure d'une jonction Gap, les structures bleues sont les connexons qui sont constitués de 6 molécules de connexine B) Expression des connexines dans les vaisseaux normaux et en fonction du stade de l'athérosclérose	18
Figure 5: Structure d'une jonction adhérente interendothéliale.....	18
Figure 6 : Interactions inter-endothéliales via les molécules de VE-cadhérines	22
Figure 7 : Etudes cliniques qui ont dosé la sVE dans le sérum de patients atteints de différentes maladies susceptibles d'altérer l'endothélium vasculaire.....	25
Figure 8 : Les étapes de formation d'une plaque d'athérome.....	30
Figure 9 : Prévalence estimée du syndrome d'apnées obstructives du sommeil dans le monde ...	32
Figure 10 : Un polysomnogramme montrant les modifications des différents paramètres pendant le sommeil dans le syndrome d'apnées obstructives du sommeil.	34
Figure 11 : A) premier modèle commercial de PPC des années 1981. B) un mini-PPC de voyage pesant 300 g, soit 5 à 6 fois moins que le premier modèle commercial.	36
Figure 12 : Mécanismes impliqués dans la dysfonction endothéliale et l'athérosclérose induite par l'hypoxie intermittente.	39
Figure 13 : Hypothèse de travail.	43
Figure 14 : Dispositif d'exposition cellulaire à l'hypoxie intermittente..	47
Figure 15: Dispositif d'exposition des rongeurs à l'hypoxie intermittente.....	49
Figure 16 : Le modèle d'hypoxie intermittente de l'humain et protocole de l'étude pour chaque sujet.....	50
Figure 17 : protocole d'exposition des volontaires sains à l'air intermittent (IA) ou à l'hypoxie intermittente (IH).	52
Figure 18: a) Les deux électrodes de l'appareil à TEER placées de part et d'autre de la monocouche cellulaire pour mesurer sa résistance électrique. b) Les deux électrodes sont reliées à un voltmètre qui affiche une valeur de résistance en Ω/cm^2	54
Figure 19 : Résumé visuel de l'article.....	56
Figure 20: Protocole de l'étude de l'impact de l'inhibition du clivage de la VE-cadhérine sur l'athérosclérose induite par l'hypoxie intermittente.....	82
Figure 21: Modèles expérimentaux qui miment le syndrome d'apnées obstructives du sommeil chez des animaux	225
Figure 22: Les différents modèles murins d'athérosclérose et leurs caractéristiques	229

Liste des tables

Tableau 1 : Définition de la sévérité du SAOS en fonction de l'AHI et des symptômes associés. ... 35

I. Introduction

1. L'endothélium vasculaire

Le vaisseau sanguin est constitué de 3 couches :

- L'intima : c'est la tunique interne qui consiste en une monocouche de cellules endothéliales appelée **endothélium** qui tapisse la lumière des vaisseaux et repose le plus souvent sur une membrane basale puis sur une couche sous-endothéliale.
- La média : c'est la tunique moyenne, elle est composée de cellules musculaires lisses et de fibres élastiques qui contrôlent le tonus vasculaire et jouent un rôle dans la régulation du débit et de la pression du sang.
- L'adventice : c'est la tunique externe et elle est constituée, parmi d'autres composants, de fibroblastes et de fibres de collagène qui protègent les vaisseaux.

1.1. Fonction de de l'endothélium vasculaire

L'endothélium est la monocouche de cellules endothéliales qui tapissent la paroi interne de tous les vaisseaux de l'organisme. Il repose sur une membrane basale riche en collagène et en glycoprotéines. L'endothélium est considéré comme un organe à part entière au vu de ses fonctions multiples indispensables dans les régulations de la tonicité vasculaire, de la perméabilité aux cellules et aux molécules lors des échanges sang-paroi vasculaire, de l'hémostase et de la fluidité sanguine et de l'angiogenèse (figure 1) (Ait-Oufella et al., 2008).

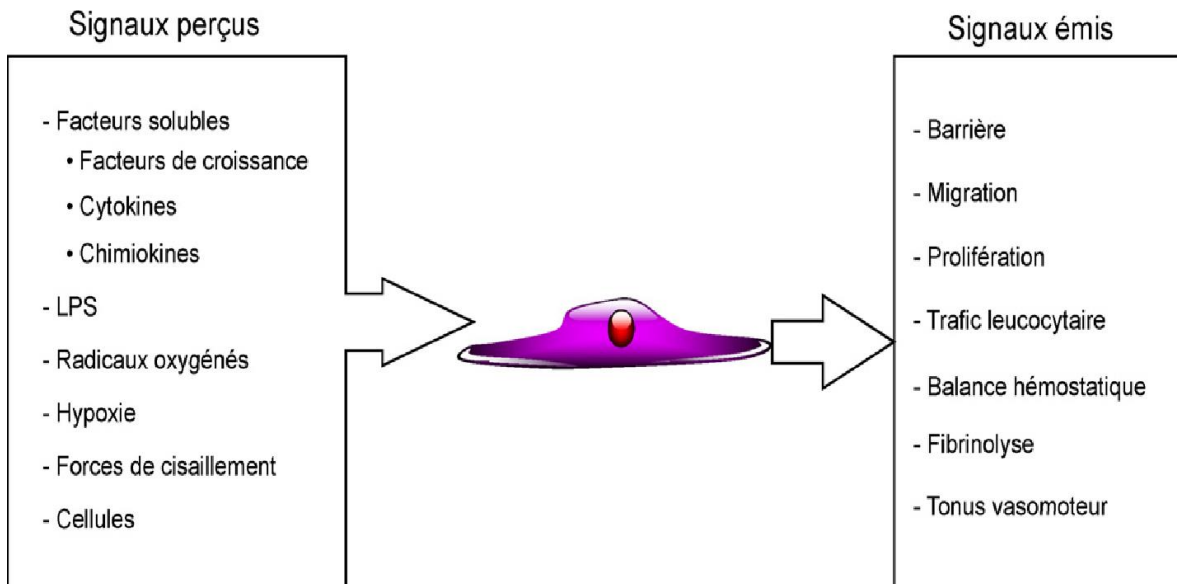


Figure 1 :Récapitulatif des fonctions de l'endothélium en réponse à différents signaux (d'après Ait-Oufella et al., 2008).

1.1.1. Contrôle de la tonicité vasculaire

En parallèle du contrôle nerveux, l'endothélium assure le contrôle local de la vasomotricité par la régulation, en réponse à des stimuli mécaniques ou chimiques, du métabolisme de substances circulantes et de la synthèse de médiateurs vasoactifs comme le monoxyde d'azote (NO), des prostaglandines, l'endothéline et le facteur activateur des plaquettes (PAF) (Ait-Oufella et al., 2008).

- Molécules vasodilatatrices

Le gaz NO est le principal vasodilatateur, il est produit par les cellules endothéliales par l'enzyme endothelial nitric oxide synthase (eNOS) à partir de la L-arginine. Après sa production, le NO diffuse vers les cellules musculaires lisses adjacentes où il active sa cible majeure qui est la guanylate cyclase soluble. Cette dernière produit, à partir du GTP, le cGMP responsable d'une cascade physiologique impliquée dans la relaxation des cellules musculaires lisses et ainsi dans la vasodilatation (Russwurm and Koesling, 2004). Cependant, l'activation accrue de la eNOS en réponse à des facteurs comme le VEGF, le TNF- α ou le PAF déclenche la S-nitrosylation de la VE-cadhérine, de la β -caténine et de la p120-caténine. Cette réaction déstabilise le complexe caténines/VE-cadhérine, altère les jonctions adhérentes et augmente la perméabilité endothéliale (Guequén et al., 2016; Marín

et al., 2012; Thibeault et al., 2010). Une anomalie de production ou de régulation du NO définit la dysfonction endothéliale fréquente dans les pathologies vasculaires comme l'athérosclérose ou l'hypertension artérielle et constitue une complication du syndrome d'apnées obstructives du sommeil qui sera détaillé dans la partie 3 de cette thèse (Lévy et al., 2015). Le NO possède aussi d'autres effets, comme l'inhibition de l'agrégation plaquettaire (Riddell and Owen, 1999).

L'endothélium produit également la prostacycline (PGI₂) à partir de l'acide arachidonique sous l'effet de la cyclooxygénase puis de la prostacycline synthase. La PGI₂ a un effet vasodilatateur via la voie IP₃/AC/AMPC et un effet antithrombotique par l'inhibition de l'agrégation plaquettaire (Six et al., 2020).

Enfin, une autre molécule essentielle qui a un effet vasodilatateur est le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF). Ce dernier stimule l'ouverture des canaux potassiques des cellules musculaires lisses vasculaires entraînant ainsi leur hyperpolarisation et leur relaxation notamment au niveau de la microcirculation et des artères coronaires (Six et al., 2020).

- **Molécules vasoconstrictrices**

L'endothéline-1 est le principal vasoconstricteur dépendant de l'endothélium. Elle est sécrétée par l'endothélium vasculaire en réponse à des stimuli comme l'hypoxie et les forces de cisaillement. Elle diffuse dans la média où elle agit sur son récepteur présent sur les cellules musculaires lisses provoquant une vasoconstriction (Pinet, 2004). L'endothéline-1 est impliquée dans les complications cardiovasculaires de l'hypoxie intermittente via une voie de signalisation qui implique le stress oxydatif et le facteur HIF-1 (Gras et al., 2016).

Au niveau de l'endothélium, il y a aussi production du facteur activateur des plaquettes (PAF) à partir de son précurseur l'acide arachidonique. Le PAF a un effet vasoconstricteur via la stimulation de la libération de la thromboxane A₂, et a aussi un effet prothrombotique (Six et al., 2020).

En clinique, la fonction endothéliale est évaluée par la mesure de la vasodilatation médiée par le flux (flow-mediated dilation = **FMD**) qui est une méthode à ultrasons non-invasive qui mesure la capacité de l'artère humérale à se dilater pendant une phase d'hyperémie réactive provoquée par une ischémie occlusive à l'aide d'un brassard. La FMD est exprimée en pourcentage de changement de diamètre de l'artère par rapport à son niveau de base (Puissant et al., 2014).

La fonction endothéliale peut aussi être mesurée par la quantification de la réponse périphérique vasodilatatrice (peripheral arterial tonometry = **PAT**) via un doigtier électronique qui mesure la tonicité artérielle périphérique. La PAT mesure l'indice d'hyperémie réactive (Reactive hyperemia index = **RHI**) qui reflète la fonction vasodilatatrice endothéliale (Puissant et al., 2014).

1.1.2. Contrôle de l'hémostase

L'endothélium à l'état physiologique constitue une surface anti-thrombogène grâce ses charges négatives et à la synthèse de molécules protectrices comme la prostacycline (à activité antiagrégante plaquettaire), l'héparane sulfate (potentialise l'activité de l'antithrombine III), l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (à activité anticoagulante intrinsèque par l'inhibition directe du facteur X activé et du complexe FT-VII activé) et la thrombomoduline (qui fixe la protéine C et renforce son activité anticoagulante en l'associant à la protéine S). En plus, l'endothélium exprime un récepteur de la protéine C qui accélère son activation par ses cofacteurs, inhibant ainsi les facteurs V et VIII (Ait-Oufella et al., 2008).

Lors d'une brèche vasculaire, le sous-endothélium, à phénotype thrombogène, déclenche un phénomène d'hémostase qui englobe l'ensemble des phénomènes physiologiques qui préviennent un saignement après une lésion vasculaire par la formation d'un clou plaquettaire, l'activation de la coagulation et enfin une mise en place simultanée de la fibrinolyse et de la réparation vasculaire (Ait-Oufella et al., 2008). L'endothélium vasculaire est le majeur acteur de ce processus d'hémostase puisqu'il participe à toutes les étapes (l'hémostase primaire, la coagulation et la fibrinolyse).

- **L'hémostase primaire**

Suite à une brèche vasculaire, une vasoconstriction réflexe se produit pour diminuer le débit sanguin. Ensuite, il y a une activation plaquettaire qui permet l'adhésion des plaquettes via des glycoprotéines au sous-endothélium riche en collagène et en facteur de von Willebrand synthétisé par les cellules endothéliales avoisinantes. Les plaquettes activées changent de forme qui devient étoilée et libèrent des substances qui renforcent le phénomène de vasoconstriction réflexe (ADP, sérotonine, TXA2, etc.). Ce processus aboutit à la formation d'un thrombus blanc ou clou plaquettaire contenant des plaquettes et des leucocytes, et limité par la prostacycline et l'ADPases (enzymes métabolisant l'ADP, qui est un activateur plaquettaire) secrétées par les cellules endothéliales (Ait-Oufella et al., 2008).

- **La coagulation**

Lors d'une lésion vasculaire, le phénotype de l'endothélium devient procoagulant pour permettre la formation d'un thrombus rouge contenant des globules rouges et des plaquettes dans un réseau de fibrine consolidant le thrombus blanc. L'endothélium exprime le facteur tissulaire (FT) qui active le facteur VII. Le complexe FT-VIIa active à son tour les facteurs IX et X. Le facteur X activé forme avec le facteur V en présence des phospholipides la prothrombinase qui transforme la prothrombine en thrombine responsable de la formation de fibrine et de l'amplification de la cascade de coagulation (Ait-Oufella et al., 2008).

- **La fibrinolyse**

L'endothélium active la fibrinolyse en sécrétant l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA) qui transforme le plasminogène en plasmine qui dégrade la fibrine. L'endothélium produit également l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI-1) qui participe à l'inhibition de la fibrinolyse, le mécanisme physiologique de lyse de caillots sanguins (Ait-Oufella et al., 2008).

1.1.3. Contrôle de l'angiogénèse

L'angiogénèse est un phénomène physiologique qui consiste en la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux existants au cours du développement (période pré et postnatale) ou chez l'adulte au cours du remodelage tissulaire cyclique (cycle menstruel

chez la femme) ou au cours des processus de réparation tissulaire (par exemple lors d'une inflammation ou d'une ischémie tissulaire).

L'angiogenèse tumorale est un phénomène pathologique qui sert à l'irrigation du tissu tumoral. Ce phénomène est régulé par des facteurs de croissance, les mieux étudiés sont le VEGF (vascular endothelial growth factor), le FGF (fibroblast growth factor), PDGF (Platelet-derived growth factor), les angiopoïétines, etc. Le VEGF et l'angiopoïétine sont les seuls qui agissent sélectivement sur les cellules endothéliales. Le VEGF-A agit via ses récepteurs à activité tyrosine kinase exprimés par les cellules endothéliales, le VEGFR-1 et VEGFR-2, qui transmettent différents signaux cellulaires (Pepper, 2000; Treps and Gavard, 2015). Le VEGF est surexprimé dans les conditions d'hypoxie associées aux cancers (Choueiri and Kaelin, 2020; Zhao et al., 2020) et d'hypoxie intermittente associées au syndrome d'apnées obstructives du sommeil (Briançon-Marjollet et al., 2014; Qi et al., 2019; Vilaseca et al., 2017) via l'activation du facteur HIF-1 dont il est un gène cible.

1.1.4. Fonction barrière

L'endothélium vasculaire est le régulateur majeur de l'intégrité et de la perméabilité vasculaire. Il contrôle les échanges des solutés et des cellules entre le sang et la paroi vasculaire ou les tissus avoisinants. Le passage à travers la membrane endothéliale peut être transcellulaire ou paracellulaire (figure 2). Les petites molécules diffusent plutôt par voie paracellulaire par passage passif selon un gradient de concentration, alors que les grosses molécules et les cellules traversent la barrière endothéliale essentiellement par voie transcellulaire via des vésicules d'endocytose/exocytose et des récepteurs. Les deux voies transcellulaire et paracellulaire sont interdépendantes (Komarova and Malik, 2010).

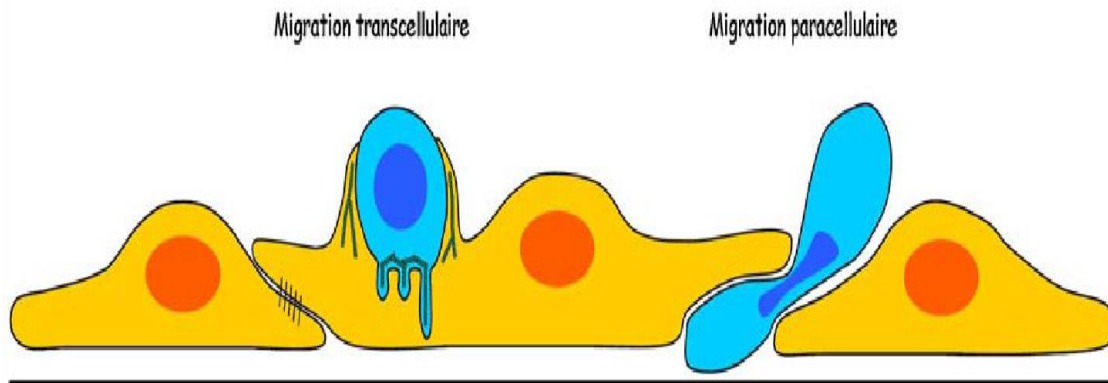


Figure 2 : Passage paracellulaire et transcellulaire à travers l'endothélium (d'après Weiss et al., 2009).

- Passage transcellulaire

Le transport par voie transcellulaire est le passage des molécules et des cellules à travers la membrane des cellules endothéliales. Il peut s'agir d'une diffusion libre ou d'une transcytose (ou endocytose suivie d'une exocytose).

La transcytose régule le trafic sélectif de grandes molécules telles que l'albumine, le LDL et les leucocytes à travers la cellule endothéliale via la formation d'endosomes de transport suivie d'une libération de vésicules dans le cytoplasme (Komarova and Malik, 2010). On distingue la transcytose par adsorption, ou non-spécifique, qui implique des forces électrostatiques et la transcytose récepteur-dépendante (Tuma and Hubbard, 2003). La transcytose peut être médiée par la clathrine, par les cavéoles (enrichies en cavéoline-1) ou dépendante de la clathrine et des cavéoles (Stan, 2006). Elle peut être spécifique via des récepteurs ou non-spécifique (Tuma and Hubbard, 2003). La transcytose dépendante de la cavéoline-1 est impliquée notamment dans le transport de l'insuline, de l'albumine et du LDL (Simionescu et al., 2002). Quant à la transcytose dépendante de la clathrine, elle est impliquée dans le transport des gonadotrophines (Nakamura and Ascoli, 1999) et de la prolactine (Bridgewater et al., 2017).

Le passage transendothélial des leucocytes peut aussi se faire par endocytose-exocytose. En effet, l'adhésion des neutrophiles à la paroi endothéliale via ICAM-1 active une voie de

signalisation qui implique src-kinase/Cavéoline-1 et qui induit la transmigration leucocytaire par endocytose-exocytose (Millán et al., 2006).

La diffusion libre à travers la cellule endothéliale peut être passive et concerne les petites molécules lipophiles et le dioxygène, ou peut nécessiter de l'énergie et des récepteurs : on parle d'une diffusion facilitée qui concerne par exemple le glucose (Lizák et al., 2019) et les acides aminés (Casey et al., 2000).

- **Passage paracellulaire**

La voie paracellulaire est régulée par les jonctions endothéliales et sa fonction est de restreindre le passage inter-endothélial des molécules de plus de 3 nm (Komarova and Malik, 2010). Les jonctions endothéliales impliquées dans l'intégrité endothéliale sont notamment les jonctions adhérentes, via la vascular endothelial-cadherin (VE-cadhérine), et les jonctions serrées (Dejana et al., 2009). Les protéines JAM (junctional Adhesion Molecule) sont impliquées dans le passage para-endothélial des leucocytes (Weber et al., 2007). La dérégulation de ces protéines peut entraîner une hyperperméabilité qui est une étape précoce lors du processus de l'athérogenèse. Il en résulte une augmentation de l'infiltration des molécules et des cellules dans l'intima conduisant à un remodelage vasculaire avec une hypertrophie de la média et une inflammation locale qui caractérisent la dysfonction endothéliale et l'athérosclérose précoce. Ces protéines pourraient être des cibles pour corriger une hyperperméabilité et les conséquences pathologiques qui en découlent, notamment l'athérosclérose.

1.2. Les jonctions endothéliales

La zone de contact inter-endothéliale est constituée de 3 types de structures jonctionnelles dynamiques et de plusieurs protéines transmembranaires qui régulent notamment l'adhérence intercellulaire et contribuent au contrôle de la perméabilité endothéliale en situation physiologique ou pathologique, mais aussi d'autres fonctions comme la signalisation et la polarisation cellulaires. Les jonctions endothéliales ne sont pas des structures statiques, elles sont continuellement remodelées en réponse à des modifications physiopathologiques. On distingue trois types de jonctions endothéliales sur la base de leurs

caractéristiques morphologiques et fonctionnelles (Figure 3) (Huber, 1999; Wallez and Huber, 2008) :

- Les jonctions serrées ou *zonula occludens* (*tight junctions*)
- Les jonctions adhérentes ou *zonula adherens* (*adherens junctions*)
- Les jonctions communicantes ou jonctions *Gap* (*GAP junctions*)

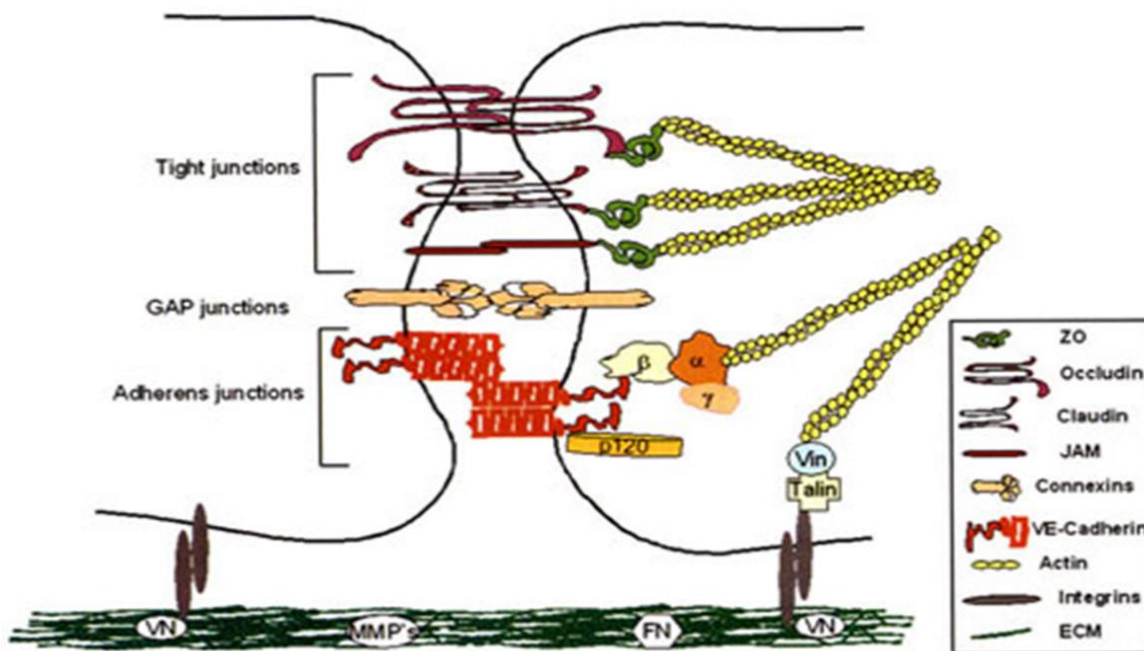


Figure 3 : Structure des jonctions endothéliales (d'après Mehta and Malik, 2006), VN= vitronectin, FN=fibronectin, MMP=matrix metalloproteinases, ECM= extracellular matrix.

1.2.1. Les jonctions serrées

Appelées aussi jonctions étanches, elles permettent de créer une barrière étanche entre deux cellules endothéliales adjacentes contrôlant le passage de molécules dans l'espace intercellulaire et le contrôle des échanges entre le sang et les tissus. En parallèle de leur rôle dans la régulation de la perméabilité endothéliale, la recherche sur des modèles animaux Knock-out ou Knock-In ont permis de mettre en évidence d'autres fonctions des protéines des jonctions serrées comme la polarisation cellulaire, la transmission des signaux cellulaires et la modulation de l'expression des gènes (Vermette et al., 2018).

Les jonctions serrées sont très variables selon l'architecture des vaisseaux sanguins. Les cellules endothéliales des grosses artères présentent des jonctions serrées bien développées. Elles sont majoritairement développées dans le cerveau formant ainsi la barrière hémato-encéphalique, où les zones intercellulaires sont totalement étanches et le transfert de molécules s'effectue notamment par la voie transcellulaire. A l'inverse, les jonctions serrées sont peu développées dans les capillaires et quasiment absentes dans les veinules post-capillaires où la perméabilité est maximale (Bauer et al., 2010; Simionescu and Simionescu, 1991; Wallez and Huber, 2008).

En raison de leur excellente étanchéité, les jonctions serrées représentent une barrière contre l'absorption des médicaments à travers l'endothélium notamment au niveau de la barrière hématoencéphalique. Pour cela des modulateurs de perméabilité qui ciblent les jonctions serrées ont été récemment développés et sont en essais cliniques afin d'améliorer le transport paracellulaire des médicaments et augmenter leur biodisponibilité (Brunner et al., 2021).

La fonction des jonctions serrées est régulée par différentes molécules qui sont principalement les claudines, les occludines et les protéines JAM.

- **Les claudines :**

La famille de protéines des claudines est constituée de plus de 25 types, ce sont des protéines transmembranaires d'un poids moléculaire allant de 21 à 34 kDa (Furuse and Tsukita, 2006). Au niveau de l'endothélium, les claudines 3, 5 et 12 sont les plus exprimées. Elles ont quatre domaines transmembranaires formant deux boucles extracellulaires qui engagent des liaisons homophiles ou hétérophiles avec les cellules adjacentes, régulant ainsi la perméabilité endothéliale. Par leurs domaines intracellulaires, les claudines sont reliées à des protéines comme les protéines Zonula occludens (ZO-1, 2 et 3), régulant ainsi la signalisation cellulaire (Vermette et al., 2018). La modulation de la perméabilité endothéliale par ciblage des claudines a été étudiée essentiellement au niveau de la barrière hématoencéphalique (Brunner et al., 2021). En effet, l'utilisation d'ARNsi contre la claudine 5 augmente la perméabilité de la barrière hématoencéphalique (Campbell et al., 2008) et réduit l'œdème cérébral chez la souris (Campbell et al., 2012). L'injection du VEGF à des lapins augmente la perméabilité endothéliale de l'aorte au LDL et ceci est associé à une diminution de l'expression de la claudine 5 (Ba et al., 2014).

- **Les occludines**

Ces protéines forment avec les claudines les constituants majeurs des jonctions serrées. Ce sont des protéines à plusieurs isoformes de 65 kDa avec 4 domaines transmembranaires, deux extrémités N et C terminales localisées dans le cytoplasme et deux boucles responsables des liaisons intercellulaires homophiles (Cummins, 2012; Feldman et al., 2005). Son expression est régulée par différentes kinases, principalement la tyrosine kinase non réceptrice c-Yes (Van Itallie and Anderson, 2014).

Les protéines ZO-1, ZO-2 et ZO-3, colocalisées avec les occludines via une liaison par un domaine PI3K, forment un complexe jonctionnel sous-membranaire lié aux filaments d'actine (Huber, 1999). Les occludines peuvent aussi interagir avec les claudines permettant ainsi un assemblage mais son rôle dans le maintien des jonctions serrées est controversé. En effet, nombreuses études rapportent que les occludines sont des composants structurels et fonctionnels essentiels aux jonctions serrées, mais il existe d'autres études qui montrent le contraire (Feldman et al., 2005). La délétion génétique de l'occludine n'affecte pas l'organisation ou la perméabilité des jonctions serrées endothéliales (Saitou et al., 2000). Cependant, la coadministration d'un ARNsi contre la claudine 5 et l'occludine a un effet synergique sur l'augmentation de la perméabilité de la barrière hématoencéphalique (Keaney et al., 2015).

Comme décrit pour les claudines, l'augmentation de la perméabilité endothéliale de l'aorte des lapins au LDL sous l'effet du VEGF est associée à une diminution de l'expression des occludines (Ba et al., 2014). Le VEGF contribue à la régulation de l'occludine en diminuant son activité adhésive via sa phosphorylation par la protéine kinase C (Harhaj et al., 2006).

- **Les protéines JAMs (Junctional Adhesion Molecules)**

La protéine JAM ou "molécule d'adhérence jonctionnelle" a été identifiée au niveau des jonctions serrées en 1995. Cette protéine de 40kDa comporte un seul domaine transmembranaire et deux motifs extracellulaires d'immunoglobuline G qui sont capables d'engager des liaisons homophiles ou hétérophiles avec les leucocytes pour contrôler leur diapédèse. Quatre types de JAMs sont exprimées dans les cellules endothéliales : JAM-A, JAM-B et JAM-C et la molécule d'adhésion sélective pour les cellules endothéliales (ESAM) (Van Itallie and Anderson, 2014).

JAM-C a été démontrée surexprimée dans l'athérosclérose où elle régule l'adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales après stimulation par les LDL oxydés (Keiper et al., 2005). JAM-A contrôle aussi la migration transendothéliale des leucocytes et le recrutement des molécules inflammatoires dans les lésions d'athérosclérose (Koenen et al., 2009; Schmitt et al., 2014). Elle subit un clivage de son domaine extracellulaire en réponse à l'inflammation et la libération dans l'environnement extracellulaire d'un fragment soluble de 33kDa proposé comme biomarqueur de l'inflammation vasculaire (Koenen et al., 2009).

1.2.2. Les jonctions communicantes ou Gap

Cette jonction endothéliale est composée de 2 hémicanaux (connexons) de deux cellules endothéliales adjacentes limitant un pore central permettant l'échange d'ions et de molécules hydrosolubles de bas poids moléculaires (<1kDa) entre cellules voisines. Chaque connexon est constitué de 6 molécules de connexine, assemblées dans le réticulum endoplasmique (figure 4A). L'hémicanal peut être homomère c'est-à-dire formé d'isoformes de connexines identiques, ou hétéromère c.à.d. formé d'isoformes de connexines distinctes (Nielsen et al., 2012). Selon les isoformes des connexines, les canaux Gap peuvent avoir une sélectivité ionique et une perméabilité différentes. Les connexines contiennent quatre domaines transmembranaires ; seules quatre connexines ont été décrites dans les cellules endothéliales : Cx37, Cx40, Cx43 et Cx45 dont le niveau d'expression varie en fonction du type de l'endothélium (Huber, 1999; Komarova et al., 2017). Ces jonctions régulent des processus physiopathologiques comme la pression artérielle via la régulation de la résistance vasculaire, le remodelage vasculaire par le contrôle de la prolifération des cellules musculaires lisses (Allagnat et al., 2017) et l'athérosclérose qui est associée à des altérations de l'expression des connexines régulant le recrutement et l'adhésion des leucocytes (figure 4B) (Chadjichristos et al., 2010; Kwak et al., 2002; Morel et al., 2014; Wong et al., 2006). Chez des patients ayant de l'athérosclérose, la connexine Cx43 a été démontrée associée à des plaques d'athérome stables (Nakase et al., 2017).

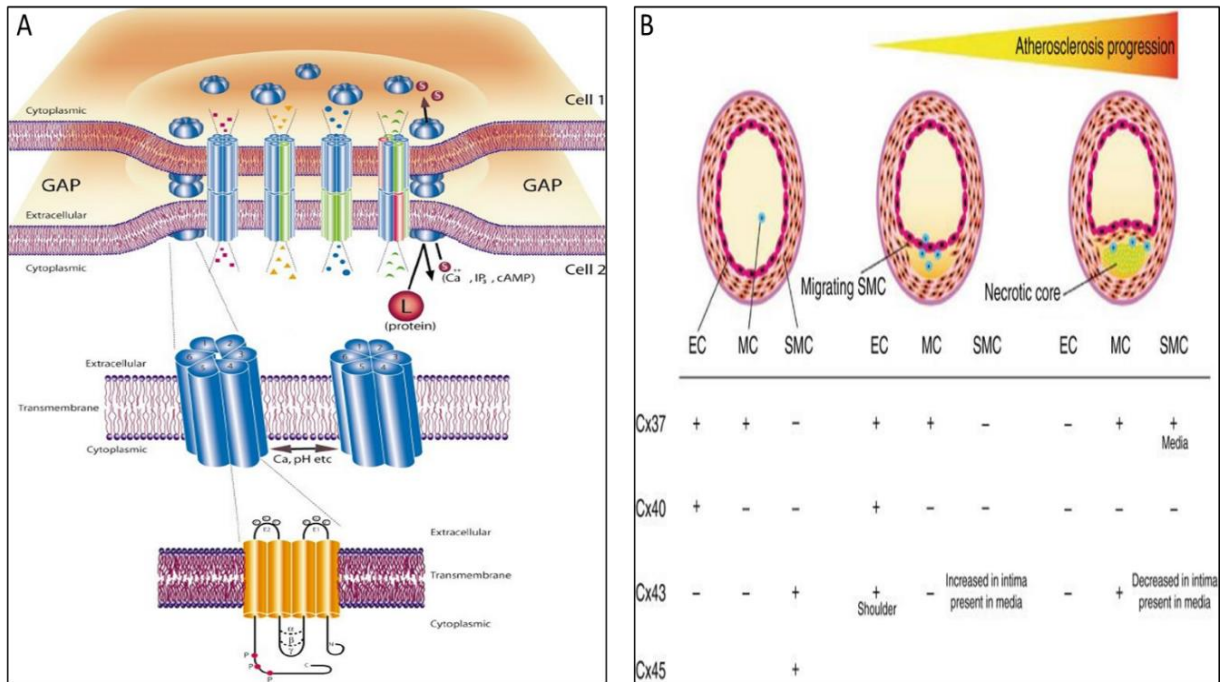


Figure 4 : **A)** Structure d'une jonction Gap, les structures bleues sont les connexons qui sont constitués de 6 molécules de connexine (D'après El-Sabban et al., 2003). **B)** Expression des connexines dans les vaisseaux normaux et en fonction du stade de l'athérosclérose (D'après Nielsen et al., 2012).

1.2.3. Les jonctions adhérentes

Ce sont des structures jonctionnelles solides d'ancrage constituées de 3 éléments : des protéines de liaison transmembranaires (les cadhérines), des protéines sous membranaires (les caténines) et des fibres d'actine (figure 5). Ces jonctions participent également de manière importante au contrôle de la perméabilité endothéliale (Huber, 1999; Rabiet et al., 1996).

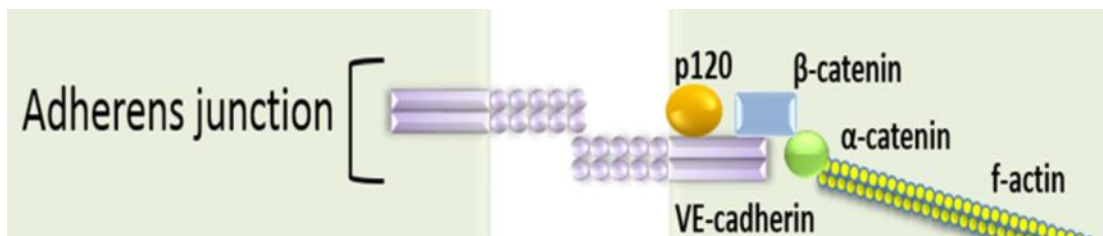


Figure 5: Structure d'une jonction adhérente interendothéliale (D'après Komarova et al., 2017).

- Les cadhérines

On distingue 4 types de cadhérines dans les cellules endothéliales : la VE-cadhérine (cadhérine 5), la VE-cadherine-2 (proto-cadhérine), la N-cadhérine et la T-cadhérine. La VE-cadhérine et la VE-cadherine-2 sont exprimées exclusivement par les cellules endothéliales et sont localisées aux jonctions adhérentes, alors que la N-cadhérine et la T-cadhérine sont présentes dans d'autres types cellulaires et ne sont pas localisées aux jonctions mais sont réparties sur l'ensemble de la surface cellulaire (Wallez and Huber, 2008).

La VE-cadhérine est la protéine majeure des jonctions adhérentes. Elle est constituée d'un domaine extracellulaire à 5 sous-unités (ectodomains) qui est responsable de la liaison homophile calcium-dépendante, un seul domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire qui interagit avec le complexe protéique intracellulaire constitué par l' α -caténine, la β -caténine et la p120-caténine permettant ainsi l'attachement aux filaments d'actine. La VE-cadhérine contribue à la régulation de la perméabilité endothéliale via les liaisons homophiles de son domaine extracellulaire, permet l'ancrage au cytosquelette et participe à la signalisation intracellulaire via le complexe protéique intracellulaire (Wallez et al., 2006).

La VE-cadhérine-2 est une "proto-cadhérine" qui ne possède pas de domaines de liaison aux caténines et par conséquent n'interagit pas avec le cytosquelette. La VE-cadhérine-2 favorise l'adhésion cellulaire via les liaisons homophiles de ses domaines extracellulaires, mais n'a pas d'influence sur la perméabilité endothéliale et la migration cellulaire transendothéliale (Telo' et al., 1998). Cependant, elle est importante à la structure et la fonction des artères. En effet, des souris déficientes en VE-cadhérine-2 présentent des altérations des fibres élastiques, une hypotension et une altération de la réponse vasodilatatrice à l'acétylcholine (Philibert et al., 2012).

La N-cadhérine assure l'interaction entre les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses ou les péricytes voisins permettant la stabilisation et la maturation des vaisseaux. En effet, la délétion de la N-cadhérine chez la souris conduit à des défauts vasculaires sévères lors de l'embryogenèse à cause d'une altération de la prolifération des cellules endothéliales et une diminution de l'expression de la VE-cadhérine (Luo and Radice, 2005).

La T-cadhérine est aussi exprimée dans les vaisseaux ; elle ne possède pas de domaine cytoplasmique et transmembranaire mais elle est ancrée dans la membrane cellulaire par le glycosylphosphatidylinositol (GPI). Cette protéine n'est pas impliquée dans l'adhésion cellulaire mais contribue à la prévention des maladies cardiovasculaires via à la formation avec l'adiponectine d'un complexe T-cadhérine/adiponectine qui favorise l'accumulation, dans l'intima et dans les plaques d'athérome, de l'adiponectine qui protège contre la dysfonction endothéliale et l'athérosclérose (Fujishima et al., 2017). La T-cadhérine peut aussi engager des liaisons avec le LDL dont la conséquence n'est pas encore connue (Clark et al., 2017).

- Les caténines

Les domaines extracellulaires des cadhérines sont responsables de l'adhésion interendothéliale. Cependant, la puissance de la jonction adhérente endothéliale est conditionnée par la force de liaison du complexe intracellulaire de caténines au cytosquelette d'actine.

L'interaction de la VE-cadhérine avec le cytosquelette se fait via l' α -caténine qui est la seule protéine du complexe intracellulaire qui a un site de liaison avec l'actine. L' α -caténine est capable aussi d'induire la polymérisation *de novo* des filaments d'actine au niveau des jonctions adhérentes via le recrutement de protéines liant l'actine telles que l' α -actinine et la vinculine (Buckley et al., 2014; Komarova et al., 2017).

La β -caténine se lie directement au domaine cytoplasmique de la VE-cadhérine et à l' α -caténine. Elle participe à la régulation de l'adhésion cellulaire et a aussi une fonction signal par la régulation de la transcription de certains gènes et l'activation des voies de signalisation cellulaires en particulier la voie de Wnt (Nelson, 2008). Le clivage de la région juxtamembranaire de la VE-cadhérine entraîne sa dissociation de la β -caténine et une désorganisation des jonctions adhérentes avec une augmentation de la perméabilité endothéliale (Miyazaki et al., 2011). La phosphorylation, activée par le VEGF, de la β -caténine sur le résidu tyrosine-142 réduit son affinité et ainsi sa liaison à la VE-cadhérine conduisant à un découplage de la VE-cadhérine des microfilaments d'actine avec une altération de l'intégrité endothéliale et augmentation de la perméabilité endothéliale (Chen et al., 2012). La β -caténine participe aussi au maintien de l'intégrité des jonctions serrées

puisque des souris β -caténine *Knock out* ont des jonctions serrées altérées par dérégulation de la claudine-5 (Tran et al., 2016).

La p120-caténine est impliquée dans la régulation de la VE-cadhérine par internalisation. La surexpression de p120-caténine bloque l'internalisation de la VE-cadhérine médiée par la clathrine ce qui augmente l'intégrité endothéliale et prévient la migration transendothéliale des leucocytes (Alcaide et al., 2012; Xiao et al., 2005). En revanche, la dissociation de la p120-caténine de la région juxtamembranaire de la VE-cadhérine, en réponse à la phosphorylation de la VE-cadhérine sur un résidu Y658 ou de la p120-caténine sur un résidu S879, surexpose la VE-cadhérine à l'endocytose (Vandenbroucke St Amant et al., 2012).

1.3. Focus sur la VE-cadhérine

Comme décrit plus haut, la VE-cadhérine est une protéine de 125kDa qui est constituée d'un domaine extracellulaire à 5 ectodomaines (EC1 à EC5), un seul domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire. C'est une protéine majeure et spécifique des jonctions endothéliales, elle contrôle l'adhésion et la perméabilité endothéliale. En effet, l'utilisation d'anticorps anti-VE-cadhérine ou l'inactivation de ses gènes perturbent les monocouches endothéliales *in vitro* et augmentent la perméabilité vasculaire aux protéines plasmatiques *in vivo* (Frye et al., 2015; Gotsch et al., 1997).

1.3.1. Le domaine extracellulaire

C'est le domaine responsable de l'interaction entre les molécules de VE-cadhérine via des liaisons homophiliques par dimérisation *trans*, c'est à dire entre deux VE-cadhérines de deux cellules endothéliales adjacentes, ou dimérisation *cis*, c'est à dire entre deux VE-cadhérines voisines de la même cellule endothéliale (Figure 6). L'interaction entre les domaines extracellulaires des protéines VE-cadhérine limite la perméabilité d'une monocouche endothéliale *in vitro* (Lampugnani et al., 1995) et le recrutement des neutrophiles dans un modèle *in vivo* d'inflammation (Gotsch et al., 1997). L'administration *in vivo* chez la souris d'anticorps ciblant le domaine extracellulaire de la VE-cadhérine peut déstabiliser les jonctions adhérentes selon l'épitope ciblé et augmenter ainsi l'infiltration des neutrophiles

(Corada et al., 2002; Gotsch et al., 1997). Ainsi, la perméabilité endothéliale est dépendante de la VE-cadhérine mais elle n'en est pas le seul acteur (Duong and Vestweber, 2020).

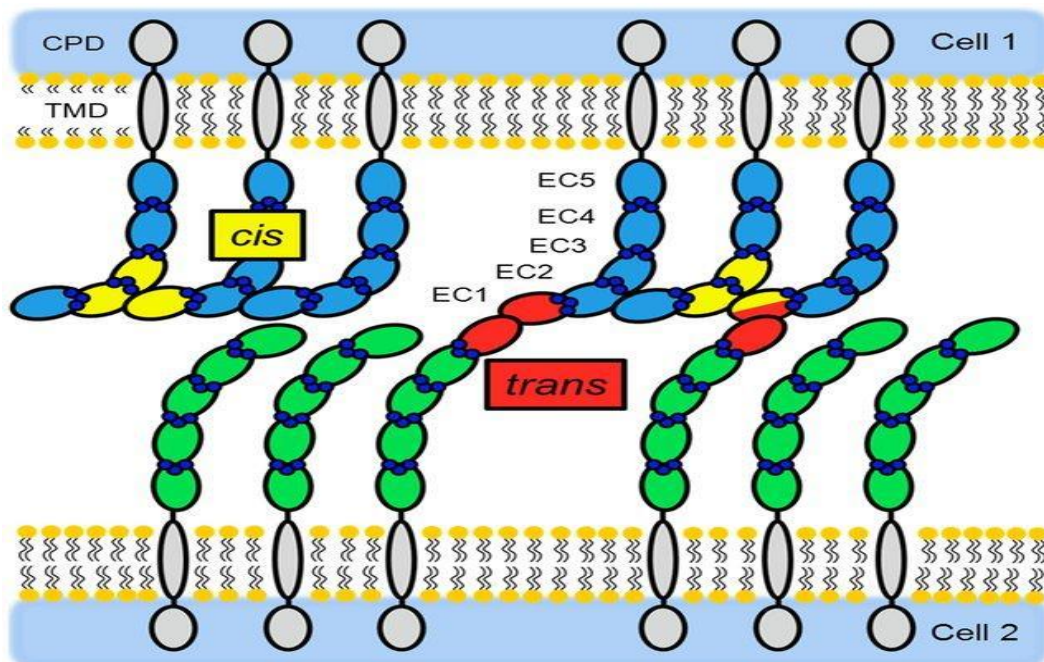


Figure 6 : Interactions inter-endothéliales via les molécules de VE-cadhérines, elles peuvent être trans, c'est-à-dire entre deux VE-cadhérines de deux cellules adjacentes ou cis, c'est à dire entre deux VE-cadhérines voisines de la même cellule endothéliale (d'après Fichtner et al., 2014).

1.3.2. Le domaine intracellulaire

La VE-cadhérine est composée d'un seul domaine transmembranaire (21 acides aminés) et d'un domaine cytoplasmique constitué d'un site de liaison proximal pour la p120 et un site de liaison distal pour la β -caténine (Wallez and Huber, 2008). Le complexe intracellulaire des jonctions adhérentes participe à la régulation de la VE-cadhérine via la stabilité de l'interaction VE-cadhérine-caténine et la réorganisation des filaments d'actine. Ce contrôle est assuré grâce à des réactions de phosphorylation-déphosphorylation par des kinases et des phosphatases régulant ainsi la stabilité et la perméabilité des jonctions endothéliales (Komarova et al., 2017). Des jonctions adhérentes stables sont caractérisées par un complexe VE-cadhérine/caténines stable avec une faible phosphorylation de la VE-cadhérine et des protéines caténines associées. La phosphorylation de la VE-cadhérine contribue à un état dynamique des jonctions adhérentes, mais n'est pas suffisante pour augmenter la

perméabilité vasculaire en l'absence d'agents inflammatoires (Orsenigo et al., 2012). En effet, le stress oxydatif ou des facteurs circulant comme le VEGF, l'histamine, la thrombine, le PAF et le TNF- α activent des kinases qui vont phosphoryler la VE-cadhérine, la β -caténine ou la p120-caténine conduisant à une altération des jonctions adhérentes et à une augmentation de la perméabilité endothéliale (Dejana et al., 2008; Khoy et al., 2017; Komarova et al., 2017; Makarenko et al., 2014; van Wetering et al., 2002).

1.3.3. Interaction de la VE-cadhérine avec les protéines adjacentes

La VE-cadhérine peut s'assembler avec PECAM-1 et les VEGFR, et former un complexe mécanosensible qui permet à l'endothélium d'activer différentes voies de signalisation (Coon et al., 2015; Komarova et al., 2017). Ces voies de signalisation induisent la réorganisation des microfilaments d'actine du cytosquelette et un changement dans la phosphorylation de la VE-cadhérine et des caténines associées (Komarova et al., 2017; Orsenigo et al., 2012). Le complexe mécanosensible VE-cadhérine/PECAM-1/ VEGFR peut aussi activer des voies de signalisation impliquées dans la vasodilatation via l'activation de eNOS et la modulation de la rigidité artérielle (Fleming et al., 2005; Komarova et al., 2017).

1.3.4. Régulation de l'expression de la VE-cadhérine

Deux mécanismes de régulation de l'expression de la VE-cadhérine sont décrits conduisant à l'augmentation de la perméabilité endothéliale : la réduction de son expression par internalisation, et le clivage de son domaine extracellulaire décrit en 1998 (Herren et al., 1998). L'implication d'un mécanisme ou de l'autre semble dépendre de plusieurs facteurs comme la voie de signalisation activée, le site de phosphorylation et la kinase impliquée.

- L'internalisation

La tyrosine Y685 de la VE-cadhérine est un substrat privilégié pour la src-kinase qui la phosphoryle en réponse à des facteurs circulant, engendrant ainsi une altération de la fonction de la VE-cadhérine (Lambeng et al., 2005; Wallez et al., 2007). En réponse à la bradykinine et l'histamine, la VE-cadhérine subit une phosphorylation et une internalisation. L'inhibition des src-kinases par le saracatinib bloque la phosphorylation de la VE-cadhérine et son internalisation, et réduit ainsi la perméabilité endothéliale induite par la bradykinine (Orsenigo et al., 2012). Les mutations Y685F et Y658F préviennent *in vitro* l'internalisation de la VE-cadhérine et la perméabilité induite par la bradykinine (Orsenigo et al., 2012).

Wessel et al. ont montré que la mutation Y685F de la VE-cadhérine *in vivo* prévient l'augmentation de la perméabilité endothéliale induite par le VEGF et l'histamine sans précision sur le mécanisme impliqué (internalisation ou clivage) (Wessel et al., 2014).

Le VEGF peut aussi induire l'internalisation de la VE-cadhérine via une voie de signalisation qui implique la β -arrestine activant la PAK (kinase activée par P21) qui phosphoryle la VE-cadhérine sur un résidu sérine S665 et augmente la perméabilité endothéliale (Gavard and Gutkind, 2006).

- **Le clivage du domaine extracellulaire**

Le clivage de la VE-cadhérine implique des protéases comme des métalloprotéases matricielles (MMPs), des désintégrines (ADAMs), des élastases, la cathepsine et la calpaïne qui libèrent le domaine extracellulaire qui devient soluble. Des études ont essayé de décrypter les mécanismes moléculaires impliqués dans le clivage de la VE-cadhérine. En effet, l'activation des voies de signalisation qui impliquent le VEGF ou le $\text{TNF}\alpha$ peut aussi perturber la barrière endothéliale via la phosphorylation de la VE-cadhérine par des Src-kinases sur un résidu tyrosine Y685 et le clivage, par des MMPs, de son domaine extracellulaire qui devient soluble dans le sang, entraînant la diminution de l'adhérence inter-endothéliale (Polena et al., 2018; Sidibé et al., 2012; Vilgrain et al., 2013). Le clivage de la VE-cadhérine peut aussi dépendre de la signalisation du calcium qui active ADAM-10 et augmente la perméabilité endothéliale sous certaines conditions (Kabacik and Raj, 2017; Schulz et al., 2008). Le domaine extracellulaire de la VE-cadhérine peut aussi être clivé par des protéases liées à la surface des neutrophiles (élastases et cathepsine G), ce qui induit la formation de lacunes interendothéliales à travers lesquelles les neutrophiles transmigrent vers la paroi vasculaire (Hermant et al., 2003).

La VE-cadhérine pourrait être clivée pendant l'endocytose par la calpaïne dans les vésicules de clathrine générant ainsi un fragment libre à environ 95kDa (Su and Kowalczyk, 2017). La régulation de la VE-cadhérine par un clivage médié par la calpaïne a été décrite dans l'athérosclérose (Miyazaki et al., 2011).

Au-delà de l'implication des protéases, le mécanisme de clivage n'est pas bien décrit. Il pourrait survenir suite à un changement de conformation de la VE-cadhérine après

l'incorporation de charges phosphate qui rendent le site de clivage exposé à l'action des protéases et rendent la VE-cadhérine plus susceptible à la protéolyse (Bouillet et al., 2014).

Enfin, d'autres résidus tyrosines peuvent être phosphorylés par des kinases mais qui ne semblent pas avoir d'effets sur la perméabilité endothéliale. En effet, la mutation Y731F de VE-cadhérine n'a aucun effet sur la perméabilité endothéliale *in vivo* mais diminue l'extravasation des neutrophiles (Wessel et al., 2014).

1.3.5. sVE-cadhérine comme biomarqueur d'altération endothéliale

L'inflammation ou le stress oxydatif, comme décrit ci-haut, peuvent altérer la structure de la VE-cadhérine et déclencher le clivage de son domaine extracellulaire qui devient soluble et détectable dans le sang. La VE-cadhérine soluble (sVE) a été étudiée dans plusieurs maladies à composante vasculaire inflammatoire comme biomarqueur de dysfonctionnement endothélial (Figure 7) (Blaise et al., 2015; Bouillet et al., 2014).

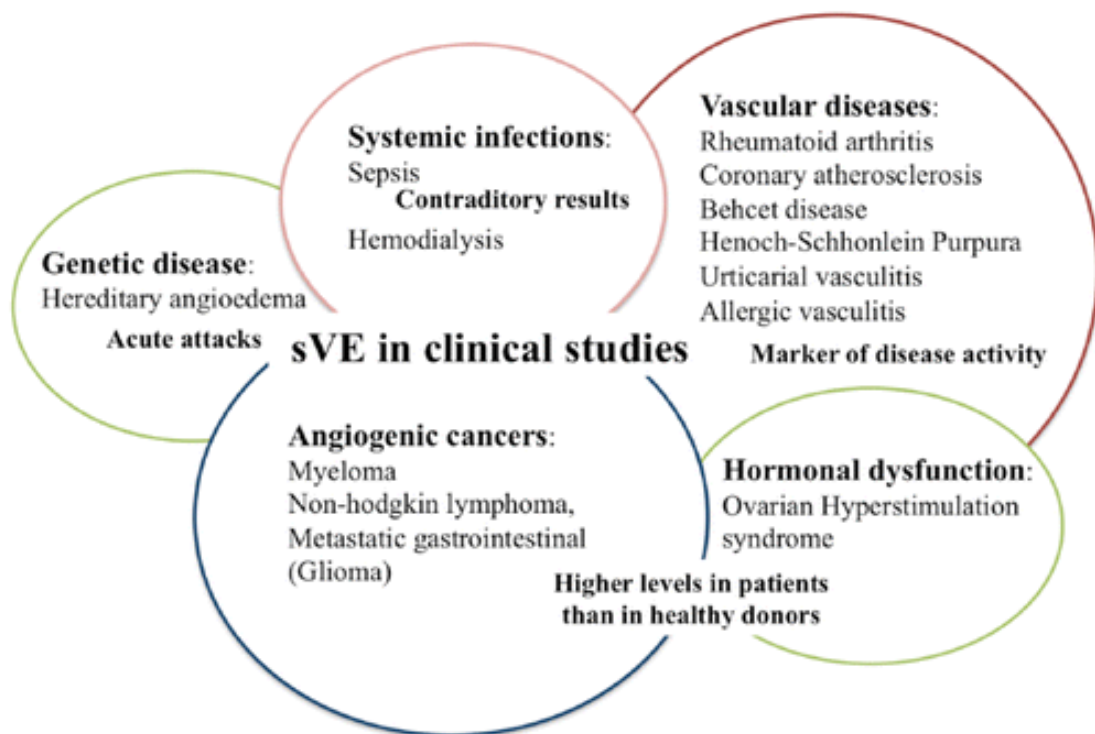


Figure 7 : Etudes cliniques qui ont dosé la sVE dans le sérum de patients atteints de différentes maladies susceptibles d'altérer l'endothélium vasculaire (d'après Blaise et al., 2015)

- **sVE dans les cancers**

Le cancer est une maladie fréquente et de haute mortalité. Selon les données de l'IARC (International Agency for Research on Cancer), l'incidence mondiale du cancer en 2020 est d'environ 19,3 millions avec près de 10 millions de décès, soit 17 % de l'ensemble des décès, constituant ainsi la deuxième cause de mortalité après les maladies cardiovasculaires (Ferlay et al., 2021). La recherche de biomarqueurs fiables et faciles à doser est utile pour améliorer le diagnostic, la prédiction du pronostic, la personnalisation des traitements et le suivi de la progression de la maladie ainsi que la réponse au traitement.

Dans cette optique, sVE a été étudiée chez des patients atteints de myélome multiple ; son taux sérique a été détecté à des niveaux élevés chez les patients non-traités et diminuait après la chimiothérapie (Wrobel et al., 2006). Chez des patients souffrant d'un carcinome rénal métastatique, le taux sérique de sVE est élevé et diminue après 4 semaines de traitement par le sunitinib (Polena et al., 2018). Ceci suggère que la sVE pourrait être un biomarqueur de diagnostic ou de réponse au traitement. Elle a été suggérée utile pour prédire le pronostic puisqu'un taux élevé de sVE est indépendamment associé à une mauvaise survie après un cancer du sein métastatique réfractaire à l'hormonothérapie (Rocheffort et al., 2017).

La sVE a été analysée dans d'autres types de cancer comme le lymphome non-hodgkinien (Eissa and Esmaeel, 2008) et les tumeurs cérébrales (Vilgrain et al., 2013) et son taux sérique été démontré comme ayant une valeur diagnostique ou pronostique.

- **sVE dans l'angioedème héréditaire**

L'angioedème héréditaire est une maladie génétique rare caractérisée par la survenue d'œdèmes sous-cutanés ou sous-muqueux transitoires et récidivants. Il est dû à un déficit en inhibiteur de protéine C1 (C1Inh) ou à une activité accrue de la kallikréine responsables d'une production accrue de bradykinine, engendrant une augmentation de la perméabilité vasculaire. Les crises d'angioedème diffèrent des crises allergiques et ne répondent qu'à des traitements ciblant la bradykinine (Zuraw and Christiansen, 2016). Pour cela des biomarqueurs spécifiques sont indispensables pour diagnostiquer de façon différentielle ces crises. L'hyperperméabilité endothéliale associée à l'angioedème héréditaire est accompagnée par une perturbation des jonctions endothéliales suite à la phosphorylation de la VE-cadhérine et la libération de sVE détectable dans le sérum des patients à des taux qui

varient en fonction des crises (Bouillet et al., 2011) et qui sont plus élevés que dans les œdèmes histaminiques (Bindke et al., 2021). Ainsi, la sVE pourrait être un nouveau biomarqueur pour identifier des crises l'angioedème héréditaire.

- **sVE dans les maladies auto-immunes**

Les maladies auto-immunes peuvent être associées à une altération de l'endothélium vasculaire qui se traduit par une vascularite et une athérosclérose prématurée et, *in fine*, des accidents vasculaires ischémiques. Chez des patients présentant une polyarthrite rhumatoïde, une maladie auto-immune fréquente, le clivage de la VE-cadhérine est induit par le TNF α et associé à une libération de sVE détectable dans le sang. La sVE sérique a été démontrée comme étant corrélée au score de l'activité de la maladie dans une cohorte de 63 patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (Banse et al., 2017; Sidibé et al., 2012). Dans les vascularites systémiques comme le purpura de Henoch-Schönlein (Chen et al., 2014), qui est la vascularite la plus fréquente de l'enfant, ou la maladie de Kawasaki (Luo et al., 2021), le taux sérique de sVE est élevé notamment dans la phase aiguë et corrèle avec la gravité de la maladie. Ces études montrent l'utilité de la sVE comme biomarqueur pour diagnostiquer des maladies auto-immunes et évaluer leurs gravités.

Au-delà de l'intérêt clinique de sVE, l'existence d'auto-anticorps anti-VE-cadhérine (AAVE) chez les patients atteints de maladies auto-immunes pourrait être utile pour le diagnostic et la prise en charge des complications vasculaires de ces patients (Bouillet et al., 2013).

- **sVE dans l'athérosclérose**

L'athérosclérose est la principale cause d'évènements ischémiques vasculaires létaux, notamment l'infarctus du myocarde et les accidents vasculaires cérébraux, qui constituent la première cause de décès dans le monde avec environ 30 % de mortalité. Elle constitue aussi une complication du syndrome d'apnées obstructives du sommeil (Lévy et al., 2009; Lui and Sau-Man, 2012).

Une seule étude clinique s'est intéressée à l'analyse de sVE chez des patients ayant de l'athérosclérose coronaire. Elle a démontré que le taux sérique de sVE est élevé et corrélé avec le score de Gensini, indicateur de la gravité de la maladie coronaire, indépendamment

du sexe, de l'âge, du statut tabagique, du profil lipidique et de la présence de comorbidités comme l'hypertension artérielle et le diabète (Soeki et al., 2004). De plus, des études précliniques ont montré que, chez des souris modèles d'athérosclérose, le taux de sVE est élevé (Miyazaki et al., 2011; Wu et al., 2018).

- **sVE dans d'autres pathologies**

La sVE a été étudiée dans d'autres maladies où son taux sérique a été mesuré à des niveaux élevés. On peut citer l'urticaire chronique spontané, caractérisé par une élévation de l'histamine (Chen et al., 2017), le choc septique, notamment compliqué par une défaillance d'organes reflétant ainsi une altération de l'endothélium (Flemming et al., 2015; Piotti et al., 2021; Yu et al., 2019b; Zhang et al., 2010), le syndrome d'hyperstimulation ovarienne (Villasante et al., 2008) et la rétinopathie diabétique proliférative (Abu El-Asrar et al., 2015).

- **Effets physiologiques de sVE**

Au-delà de son intérêt clinique, l'effet physiologique du fragment soluble sVE reste peu clair. En effet, une seule étude a démontré que des surnageants cellulaires contenant de la sVE ou de la sVE recombinante inhibent la liaison homophile des protéines de VE-cadhérine totale, altérant la barrière endothéliale et étant donc responsable d'une augmentation de la perméabilité endothéliale (Flemming et al., 2015).

Des surfaces en titane fonctionnalisées avec la sVE recombinante améliorent l'adhésion cellulaire, la prolifération et l'angiogénèse dans une culture de cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (HUVEC). Cette stratégie pourrait avoir un intérêt dans l'amélioration de la cicatrisation osseuse en orthopédie (Seo et al., 2020).

La VE-cadhérine totale, via les interactions homophiles *trans* des domaines extracellulaires, active des voies de signalisation Rac-dépendante (Birukova et al., 2012) ou module l'expression de certains gènes impliqués notamment dans la régulation de la barrière endothéliale (Morini et al., 2018). La sVE, en se liant à la VE-cadhérine totale (Flemming et al., 2015), pourrait ainsi perturber les interactions homophiles de leurs domaines extracellulaires et par conséquent les effets de signalisation qui en découlent.

2. Physiopathologie de l'athérosclérose

L'altération des jonctions endothéliales pourrait être à l'origine d'une dysfonction endothéliale et des complications vasculaires qui en découlent comme l'athérosclérose (Gimbrone and García-Cardena, 2016; Sitia et al., 2010). En effet, l'athérosclérose est une maladie inflammatoire chronique qui touche l'intima des artères de moyen et de gros calibres. Elle est caractérisée par le dépôt d'une plaque essentiellement composée de lipides et elle est la résultante d'une interaction entre les cellules endothéliales, les cellules inflammatoires et les lipoprotéines enrichies en cholestérol. Cette inflammation entraîne un remodelage vasculaire qui implique les cellules musculaires lisses et de la matrice extracellulaire (Kobiyama and Ley, 2018; Léoni and Daubrosse, 2001).

Le LDL-cholestérol présent en excès dans le sang passe à travers la monocouche des cellules endothéliales et s'accumule dans la couche sous-endothéliale de l'intima préférentiellement à des endroits où les forces de cisaillement dues à l'écoulement du sang (shear-stress) sont faibles ou perturbées, où il forme des stries lipidiques qui constituent les premières lésions. Ces lésions deviennent inflammatoires du fait de l'oxydation du LDL-cholestérol et activent le recrutement de monocytes qui traversent la barrière endothéliale et, en tant que macrophages, phagocytent le LDL-cholestérol oxydé. Ces macrophages forment des cellules spumeuses, emplies de cholestérol, tout en s'accumulant dans la plaque d'athérome, qui se développe progressivement en volume. A cette étape, les cellules musculaires lisses de la média migrent vers la plaque où elles prolifèrent pour former une chape fibreuse riche en collagène afin d'isoler la plaque inflammatoire et la stabiliser. Ce phénomène réduit le calibre artériel par la formation progressive de plaques d'athérome qui sont généralement stables. Dans certaines conditions, notamment une inflammation trop importante des plaques, les macrophages produisent des protéases qui fragmentent le collagène de la chape fibreuse. Ceci fragilise les plaques, soumises à l'action mécanique du flux sanguin, et conduit à des lésions qui se compliquent par une rupture de la plaque et la production d'un thrombus qui va obstruer les petits vaisseaux entraînant la survenue d'événements ischémiques, comme l'infarctus du myocarde ou les accidents vasculaires cérébraux (Figure 8) (Kobiyama and Ley, 2018; Léoni and Daubrosse, 2001).

Une augmentation de la perméabilité endothéliale, survenue dans certaines conditions notamment inflammatoires, pourrait faciliter l'infiltration du LDL-cholestérol et des monocytes à travers l'endothélium (Mundi et al., 2018).

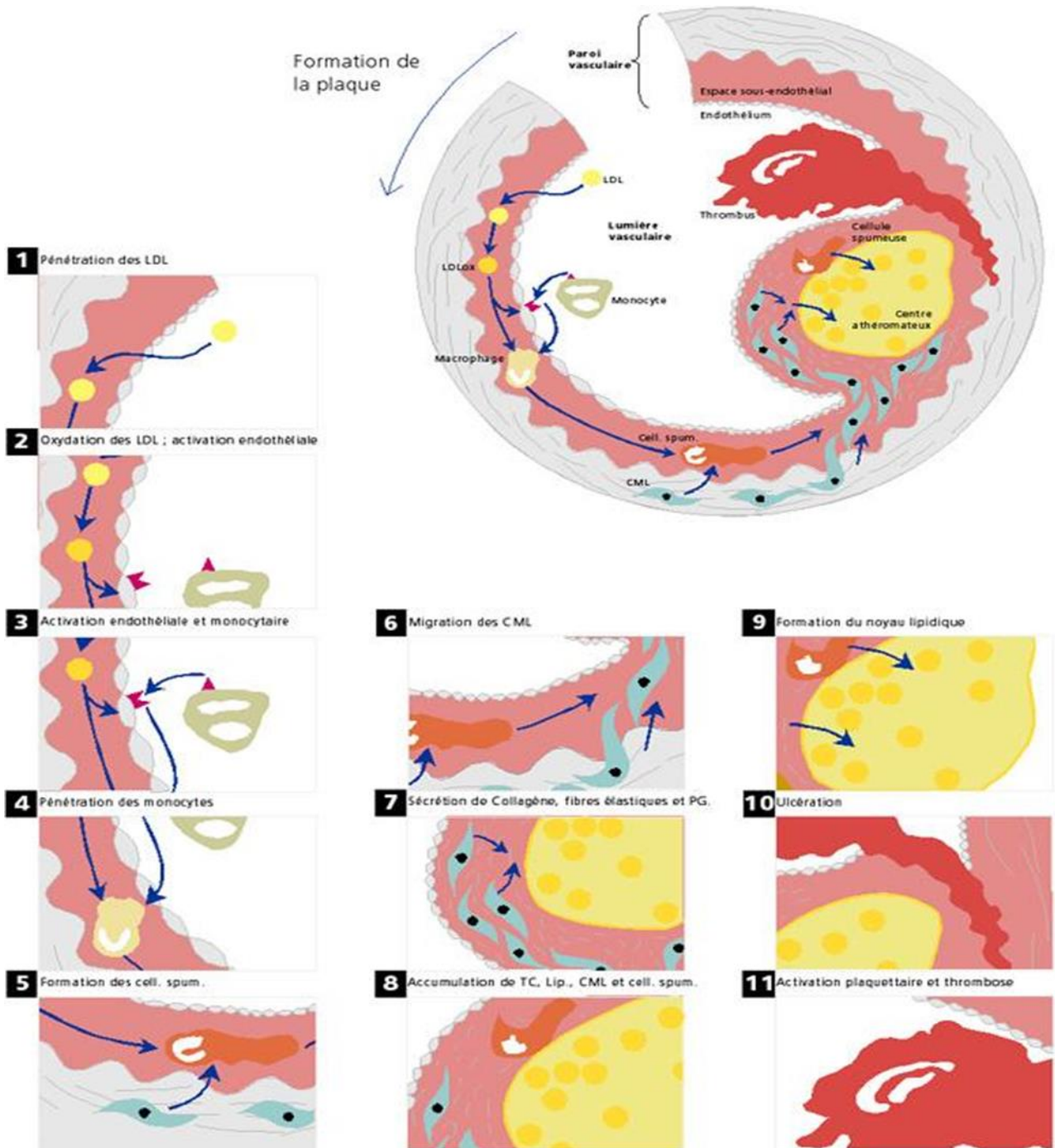


Figure 8 : Les étapes de formation d'une plaque d'athérome (CS : cellules spumeuses ; CML : cellules musculaires lisses ; LDL : Low Density Lipoprotein ; LDLox : LDL oxydée ; Lip. : lipides ; PG : protéoglycane ; TC : tissu conjonctif) (D'après Léoni and Daubrosse, 2001).

3. Le syndrome d'apnées obstructives du sommeil

3.1. Epidémiologie

Le syndrome d'apnées obstructives du sommeil (SAOS) est un trouble respiratoire fréquent qui constitue un problème majeur de santé publique largement sous-estimé. En effet, la maladie peut être asymptomatique et par conséquent non-diagnostiquée et non-traitée (Fuhrman et al., 2012; Kapur et al., 2002).

Une analyse récente basée sur la littérature estime que mondialement près d'un milliard de personnes adultes âgées de 30 à 69 ans souffrent de SAOS. Près de la moitié de ces personnes ont un SAOS modéré à sévère pour lesquels un traitement est recommandé (Benjafield et al., 2019).

Les pays les plus touchés selon le nombre de personnes souffrant d'un SAOS sont la Chine, suivi par les États-Unis, le Brésil et l'Inde. La France vient en 9^{ème} position mondialement avec 24 millions de patients à SAOS léger à sévère, dont la moitié modéré à sévère (Figure 9). La prévalence de SAOS léger chez les personnes âgées entre 30 et 69 ans dépasse 70% et celle de SAOS modéré dépasse 30 % (Benjafield et al., 2019).

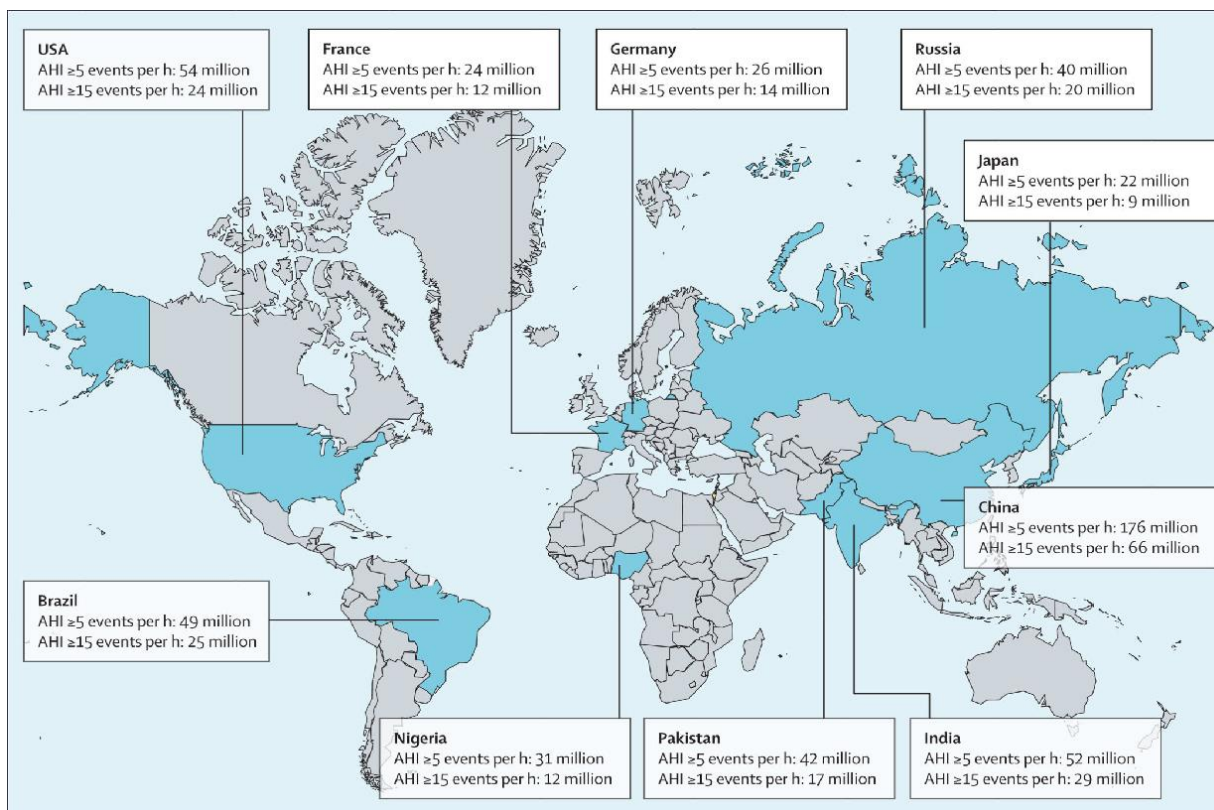


Figure 9 : Prévalence estimée du syndrome d'apnées obstructives du sommeil dans le monde (d'après Benjafield et al., 2019).

Le facteur de risque le plus important de survenue de SAOS est l'obésité, identifiée par l'IMC, le tour de taille et le tour de cou. D'autres facteurs de risque sont identifiés comme l'âge (plus de 65 ans), le sexe masculin, la ménopause, des anomalies craniofaciales, l'anatomie des voies respiratoires supérieures, le tabagisme, l'alcool et certaines prédispositions génétiques (Lee et al., 2008).

Le coût économique direct (associés aux soins) et indirect (impact sociétal et professionnel) est élevé. En 2015, le coût du diagnostic et du traitement de l'apnée obstructive du sommeil aux États-Unis était d'environ 12,4 milliards de dollars (Watson, 2016). En France, les dispositifs médicaux de PPC (Pression Positive Continue) sont remboursés par l'Assurance maladie. Selon le rapport d'évaluation clinique et économique des dispositifs médicaux et prestations associées pour prise en charge du SAOS publié par HAS en Juillet 2014, la prestation de service à domicile pour l'assistance respiratoire a atteint en 2012 le milliard d'euros de remboursement, et les montants remboursés pour la PPC ont représenté 39 % de

ces dépenses, soit 8 % du montant total remboursé sur la liste des produits et prestations remboursables (HAS, 2014).

3.2. Définitions et aspects cliniques

Le SAOS est une affection relativement récente qui a été définie par Guilleminault et al. en 1976 (Guilleminault et al., 1976). Il a été longtemps considéré comme une affection rare et bénigne dont les principaux symptômes sont fatigue et ronflement. Ce n'est qu'au début des années 1980 que les moyens d'investigation ont été développés et les définitions consensuelles de ce syndrome ont été établies (Odile, 2017).

Le SAOS est caractérisé par la survenue, pendant le sommeil, de pauses respiratoires fréquentes et répétées. Ces pauses provoquent des efforts respiratoires qui occasionnent des micro-éveils pour permettre la réouverture des voies respiratoires associée à un ronflement. Ces petits éveils sont à l'origine d'une fragmentation du sommeil et une dégradation de la qualité de vie des patients avec une somnolence excessive qui dure toute la journée, des difficultés à se concentrer, une fatigue chronique, des troubles cognitifs, des risques d'accident augmentés, etc. Le diagnostic du SAOS est établi à l'aide d'une polysomnographie nocturne (figure 10) qui montre en cas de SAOS des apnées obstructives associées à une réduction de la saturation en oxygène. Ces apnées sont alternées par des épisodes de microéveils caractérisés par des efforts respiratoires, des ronflements, une augmentation de l'activité cérébrale et de la contraction musculaire, une augmentation de débit cardiaque et des pics tensionnels. L'alternance des phases d'hypoxie dues aux pauses respiratoires et des phases de ré-oxygénation dues aux micro-éveils, c'est-à-dire une hypoxie intermittente, définit la composante principale et la plus redoutable du SAOS. Pour étudier les conséquences physiopathologiques du SAOS, le modèle expérimental le plus utilisé consiste à mimer l'hypoxie intermittente chez des animaux.

Un élément essentiel d'objectivation de l'importance des apnées est l'index d'apnée-hypopnée (AHI), correspondant au nombre de désaturations en oxygène par heure pendant le sommeil.

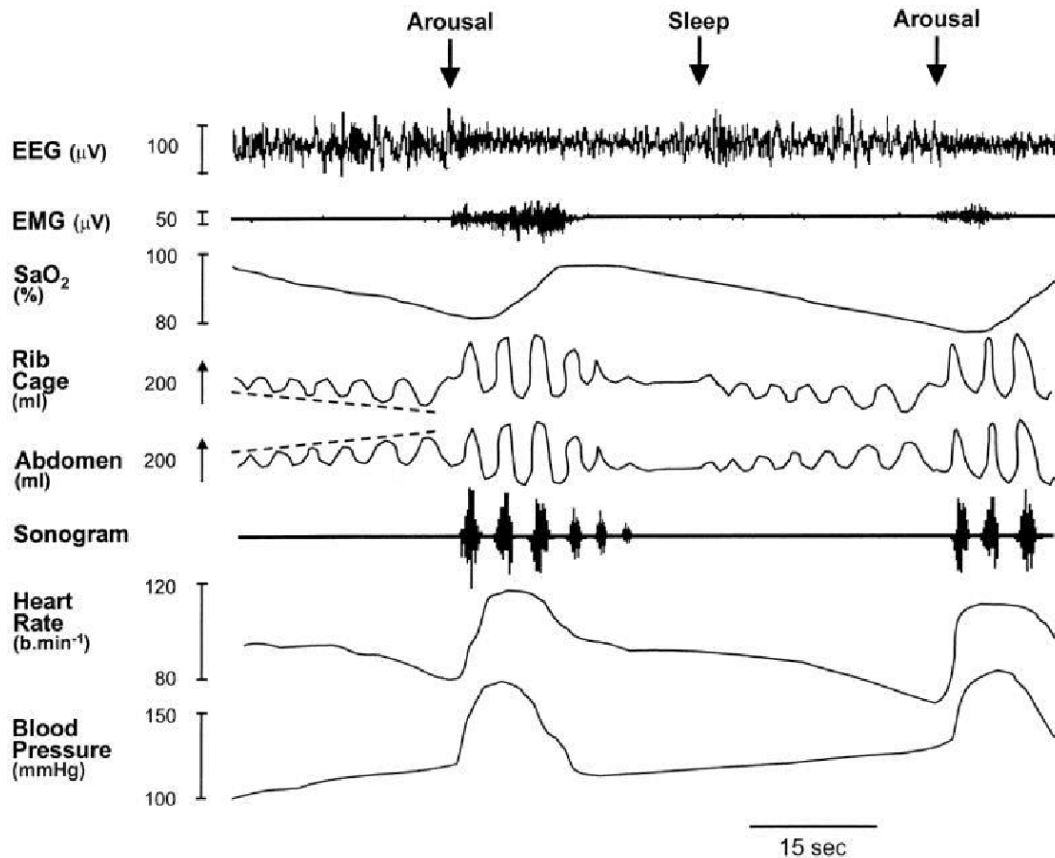


Figure 10 : Un polysomnogramme montrant les modifications des différents paramètres pendant le sommeil dans le syndrome d'apnées obstructives du sommeil (d'après Thompson et al., 2001).

La société de pneumologie de langue française (SPLF, 2010) définit le SAOS par :

- Un index d'apnées hypopnées AHI ≥ 15 désaturations/h de sommeil, ou
- Un AHI ≥ 5 + somnolence diurne excessive non expliquée par d'autres facteurs, ou
- Un AHI ≥ 5 + deux, au moins, des critères suivants non expliqués par d'autres facteurs : ronflements sévères et quotidiens, sensations d'étouffement ou de suffocation pendant le sommeil, sommeil non-réparateur, fatigue diurne, difficultés de concentration, nycturie.

La détermination de la sévérité du SAOS est basée sur l'AHI et la sévérité de la somnolence diurne (Tableau 1) (SPLF, 2010).

Tableau 1 : Définition de la sévérité du SAOS en fonction de l’AHI et des symptômes associés (SPLF, 2010).

Niveau de sévérité	Composante
	Index d’apnées hypopnées
Léger	entre 5 et 15 événements par heure
Modéré	entre 15 et 30 événements par heure
Sévère	30 et plus événements par heure
	Somnolence diurne
Léger	somnolence indésirable ou épisodes de sommeil involontaire ayant peu de répercussion sur la vie sociale ou professionnelle et apparaissant pendant des activités nécessitant peu d’ attention (regarder la télévision, lire, être passager d’une voiture)
Modérée	somnolence indésirable ou épisodes de sommeil involontaire ayant une répercussion modérée sur la vie sociale ou professionnelle et apparaissant pendant des activités nécessitant plus d’ attention (concert, réunion)
Sévère	somnolence indésirable ou épisodes de sommeil involontaire perturbant de façon importante la vie sociale ou professionnelle et apparaissant lors d’activités de la vie quotidienne (manger, tenir une conversation, marcher, conduire)

3.3. Traitement par Pression Positive Continue (PPC)

Avant l’année 1981, le traitement recommandé était la trachéotomie. En Australie un patient a refusé d’être traité par cette méthode, ce qui a amené le Dr. Colin Sullivan en 1981 à concevoir un dispositif respiratoire de traitement par application d’air à une pression positive continue (PPC), le premier traitement non-invasif du SAOS qui reste utilisé comme traitement standard jusqu’à aujourd’hui (figure 11). Le premier modèle a été testé volontairement sur ce patient et reposait sur un moteur d’aspirateur, des tubes plastiques et un masque de plongée empêchant toute fuite d’air (Odile, 2017).



Figure 11 : A) premier modèle commercial de PPC des années 1981. B) un mini-PPC de voyage pesant 300 g, soit 5 à 6 fois moins que le premier modèle commercial.

La PPC est recommandée chez tous les patients souffrant de somnolence excessive, de qualité de vie dégradée liée au manque de sommeil et d'hypertension comorbide, qui sont plus susceptibles d'avoir un indice d'apnée-hypopnée (AHI) au-delà de 15. L'effet bénéfique de la PPC sur les symptômes et la qualité de vie est obtenu après seulement quelques jours de thérapie (Pépin et al., 1999) et dépend de la compliance au traitement (Weaver et al., 2007). Une bonne observance à la PPC est définie par une utilisation supérieure à 4 heures/jour pendant au moins 5 jours/semaine (Kribbs et al., 1993).

3.4. Les complications cardiovasculaires du SAOS et impact de la PPC

Le SAOS est un facteur de risque indépendant des maladies cardiovasculaires et métaboliques, qui touchent jusqu'à 50 % des patients SAOS (Destors et al., 2017; Lévy et al., 2015). En effet, le SAOS est associé à une prévalence élevée d'hypertension, notamment l'hypertension résistante (Carnethon and Johnson, 2019; Lévy et al., 2015), de diabète (Manin et al., 2015; Schober et al., 2011), de syndromes coronariens, d'athérosclérose et des conséquences qui en découlent comme l'infarctus de myocarde et les accidents vasculaires

cérébraux (Javaheri et al., 2017). Une méta-analyse récente qui concernait 16 études avec 24308 personnes saines ou ayant différents risques cardiovasculaires y compris SAOS et suivies sur une période de 2.9 à 18 années, a montré une association significative entre le SAOS avec des événements cardiaques majeurs avec un risque relatif de 2.04 pour le SAOS sévère et 1.16 pour le SAOS modéré ; aucune association n'a été trouvée avec le SAOS léger (Xie et al., 2017). Le risque relatif d'AVC dans le SAOS sévère rapporté par cette méta-analyse est de 2.15 (Xie et al., 2017). Ceci explique le taux élevé de mortalité cardiovasculaire dans SAOS, notamment sévère, avec un risque relatif de 2.96 (Xie et al., 2017).

Des études cliniques et des méta-analyses ont montré que le risque d'hypertension chez les patients SAOS est de 48% et l'odds ratio augmente de plus de 13% pour chaque 10% de désaturation nocturne (Lavie et al., 2000). La prévalence d'hypertension artérielle est associée à la sévérité du SAOS indépendamment de l'âge, du genre et de l'IMC, avec 67% chez des patients avec un SAOS sévère (AHI>30) contre 59% chez des patients avec un SAOS léger (AHI entre 5 et 15) (Nieto et al., 2000; Salman et al., 2020).

Des méta-analyses ont mis en évidence l'altération de la fonction endothéliale mesurée par la dilatation médiée par le flux (flow-mediated dilatation = FMD) ou l'index de réactivité hyperhémique (Reactive hyperemia index = RHI) chez des patients SAOS ainsi qu'une augmentation de l'épaisseur intima-média des carotides. Cette dysfonction endothéliale est corrélée avec la sévérité du SAOS indépendamment de l'âge, du genre, de l'IMC et des autres comorbidités cardiovasculaires (Bironneau et al., 2020; Farooqui et al., 2017; Wang et al., 2017).

L'impact de la PPC sur l'amélioration des paramètres cardiovasculaires n'est pas clair notamment sur la correction et la prévention des événements cardiovasculaires à long terme, et cette amélioration semble dépendre de l'observance au traitement par PPC (Lévy et al., 2015). En effet, des méta-analyses et des études non-contrôlées et prospectives suggèrent un effet bénéfique sur la pression artérielle (Pépin et al., 2014) et sur le nombre d'événements cardiovasculaires (Marin et al., 2005). Cependant, cet effet n'a pas été établi dans des essais cliniques contrôlés randomisés (Drager et al., 2017). L'essai clinique SAVE (Sleep Apnea Cardiovascular Endpoints), le plus grand essai clinique randomisé évaluant l'effet de la PPC

sur les événements cardiovasculaires liés au SAOS, a confirmé l'amélioration de la qualité de vie des patients par la PPC avec réduction de l'AHI d'environ 90 % mais n'a observé aucun impact sur les événements cardiovasculaires secondaires (Antic et al., 2015; McEvoy et al., 2016).

L'effet de la PPC sur les complications cardiovasculaires du SAOS reste controversé, d'où la nécessité d'étudier les mécanismes physiopathologiques de ces complications pour identifier des cibles pour des thérapeutiques complémentaires à la PPC.

Parmi les complications du SAOS, nous nous sommes particulièrement intéressés à l'étude des mécanismes physiopathologiques menant à l'athérosclérose.

3.5. L'athérosclérose et le SAOS

3.5.1. Données cliniques et précliniques

Le SAOS est un facteur de risque indépendant d'athérosclérose puisque une association a été trouvée entre le SAOS et l'épaisseur intima-média, la présence de lésions proathérosclérotiques, la taille des plaques d'athérome et la rigidité artérielle indépendamment de la présence d'autres facteurs cardiovasculaires (Baguet et al., 2005; Drager et al., 2005; Theorell-Haglöw et al., 2019). Parmi les composantes du SAOS, l'hypoxie intermittente est le paramètre connu pour entraîner le plus de complications cardiovasculaires. L'impact du SAOS sur l'athérosclérose est confirmé sur des modèles animaux d'hypoxie intermittente par des études qui ont démontré un remodelage vasculaire avec une augmentation de l'épaisseur intima-média, une infiltration des leucocytes, une inflammation et un stress oxydatif chez des souris de type génétique sauvage (Arnaud et al., 2011a, 2018; Poulain et al., 2015) et des plaques d'athérome chez des souris génétiquement susceptibles à l'athérosclérose APO E^{-/-} (Arnaud et al., 2011b; Drager et al., 2013; Gautier-Veyret et al., 2018). Des méta-analyses se sont intéressées à l'impact de la PPC sur l'athérosclérose. Elles ont montré, dans des études cliniques randomisées, un impact positif de la PPC sur les paramètres vasculaires proathérogènes tels que la dysfonction endothéliale, la rigidité artérielle, l'épaisseur de l'intima-média, les marqueurs inflammatoires et la FMD

(Cammaroto et al., 2019; Drager et al., 2007; Ning et al., 2019; Schwarz et al., 2015; Vlachantoni et al., 2013; Wang et al., 2015).

3.5.2. Mécanismes physiopathologiques sous-jacents

La survenue de l'athérosclérose, comme celle des autres complications cardiovasculaires, est favorisée en réponse à trois principaux mécanismes induits par l'hypoxie intermittente : l'activation du système nerveux sympathique, l'inflammation et le stress oxydatif qui conduisent à une altération de l'endothélium vasculaire et à une dysfonction endothéliale (Figure 12).

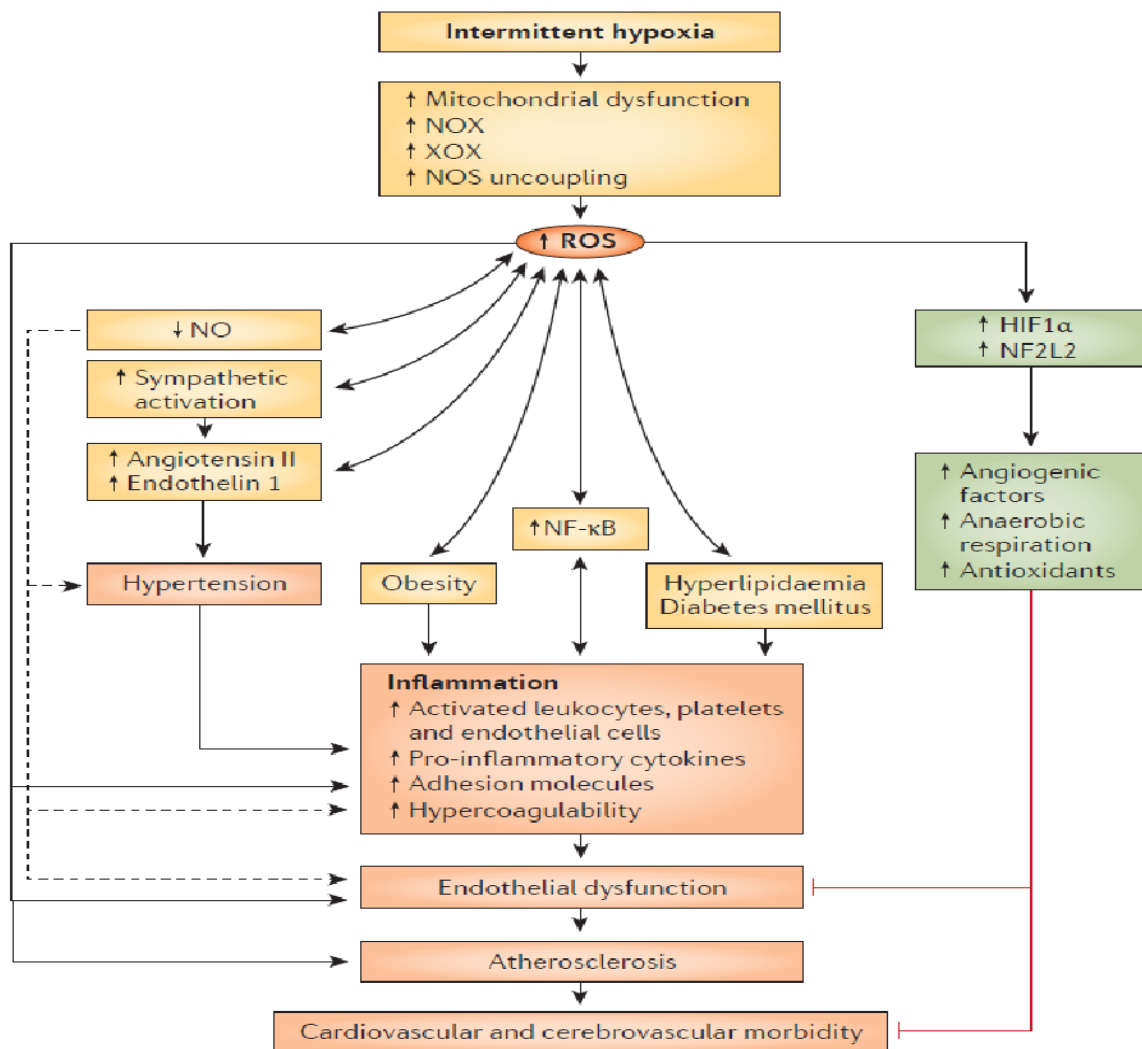


Figure 12 : Mécanismes impliqués dans la dysfonction endothéliale et l'athérosclérose induite par l'hypoxie intermittente. (D'après Lévy et al., 2015).

En effet, l'hypoxie intermittente et l'hypercapnie chez les patients SAOS induisent l'activation du système nerveux sympathique (Tamisier et al., 2015). Ceci a été confirmé par l'observation d'une hyperactivité sympathique chez des volontaires sains exposés à l'hypoxie intermittente pendant 2 semaines (Tamisier et al., 2011). L'activation du système nerveux sympathique va entraîner des pics tensionnels répétés nocturnes provoquant à long terme des modifications structurelles et fonctionnelles des vaisseaux, une activation du système rénine angiotensine aldostérone, une réduction du taux de NO, une augmentation du taux d'endothéline et de l'expression ses récepteurs type A, etc., promouvant ainsi une hypertension artérielle permanente (Lévy et al., 2015).

D'autre part, l'hypoxie intermittente occasionne un dysfonctionnement mitochondrial, une activation de la NADPH oxydase (NOX) et de la xanthine oxydase (XO) ainsi qu'un découplage de la NO synthase (NOS), qui génère des espèces réactives d'oxygène (ROS) plutôt que du NO avec une altération de la fonction endothéliale (Hoyos et al., 2015). Chez des patients SAOS, le taux de NO circulant a été démontré inférieur et le taux d'endothéline-1 supérieur à celui des témoins sains (Jordan et al., 2005; Lavie et al., 2003). En outre, une diminution de l'expression de la eNOS, une altération de la capacité de réparation et une augmentation de l'apoptose ont été démontrées dans des cellules endothéliales dérivées de patients SAOS, ou traitées par du sérum provenant de patients SAOS (Briançon-Marjollet et al., 2014; Jelic et al., 2009).

Ce stress oxydatif initie une cascade de processus inflammatoires impliquant les facteurs de transcription NF-kB et HIF-1 qui vont augmenter l'expression des gènes codant pour les molécules inflammatoires comme les cytokines, les facteurs de croissance et les molécules d'adhésion cellulaire (ICAM-1, VCAM-1, E-sélectines) (Lévy et al., 2015; Song et al., 2018). Ceci conduit à l'activation des monocytes et des neutrophiles qui produisent des ROS, entrants ainsi dans le cercle vicieux stress oxydatif-inflammation (Lui and Sau-Man, 2012). Chez les patients atteints de SAOS, une activation des leucocytes, des plaquettes et des monocytes ainsi qu'une libération de cytokines inflammatoires telles que le TNF α , l'IL-8 et IL-10 ont été observées (Dyugovskaya et al., 2002, 2003; Jelic and Le Jemtel, 2008; Sanner et al., 2000) et seraient responsables de l'initiation de l'athérosclérose. Au niveau moléculaire, des études ont démontré que l'hypoxie intermittente active des voies de

signalisation qui sont impliquées dans le processus d'athérogenèse, comme la voie de la cystéinyl-leucotriène (Gautier-Veyret et al., 2018) et de la leucotriène B4 via son récepteur BLT1 (Li et al., 2011). En effet, les leucotriènes sont de puissants chimio-attractants qui facilitent le recrutement des monocytes et leur infiltration dans la paroi artérielle et leur transformation en cellules spumeuses, qui sont des étapes critiques dans le développement de l'athérosclérose (Subbarao et al., 2004). La voie de signalisation COX-1/thromboxane pourrait aussi être impliquée dans l'athérosclérose induite par l'hypoxie intermittente via l'activation de la thromboxane synthase (Gautier-Veyret et al., 2013).

En outre, l'hypoxie intermittente expose à un risque de développer des dyslipidémies avec une augmentation des taux de cholestérol total, de triglycérides et de phospholipides sériques et à une inhibition des lipoprotéines lipases conduisant à une augmentation des chylomicrons plasmatiques et du LDL-Cholestérol (Drager et al., 2011; Lévy et al., 2009). En effet, le facteur HIF-1 active l'angiopoïétine-4 qui conduit à l'inactivation de la lipoprotéine lipase avec augmentation des lipoprotéines et des lipides dans le sang (Drager et al., 2013).

Les patients SAOS sont sensibles à la peroxydation lipidique à cause du stress oxydatif généré par l'hypoxie intermittente et sont exposés notamment à une oxydation accrue des lipoprotéines à faible densité (Barceló et al., 2000; Lavie et al., 2004), favorisant ainsi le processus d'athérogenèse.

4. Hypothèse et objectifs de la thèse

Ainsi, l'hypoxie intermittente perturbe la physiologie cardiovasculaire et métabolique et conduit à l'altération structurelle et fonctionnelle de l'endothélium vasculaire à l'origine de lésions endothéliales pro-athérosclérotiques (Gimbrone and García-Cardena, 2016) et d'hypertension artérielle (Lévy et al., 2015), d'infarctus de myocarde (Xie et al., 2017) et d'accidents vasculaires cérébraux (Xie et al., 2017). L'altération de la fonction et de la structure de l'endothélium vasculaire a été bien étudiée et établie chez des patients SAOS et dans des modèles expérimentaux *in vivo* et *in vitro* d'hypoxie intermittente décrits plus haut. Cependant, la régulation de la perméabilité endothéliale, qui est une étape clé et précoce dans le contrôle de l'athérogenèse, est peu étudiée dans le SAOS. En effet, les mécanismes cellulaires et moléculaires sous-jacents à la régulation de la perméabilité endothéliale

pendant le SAOS ne sont pas décrits chez les patients et ne sont que peu étudiés dans les modèles expérimentaux du SAOS tels que les rongeurs (Arnaud et al., 2018) ou les cultures cellulaires (Khalyfa et al., 2018; Makarenko et al., 2014) sous hypoxie intermittente. Il est donc intéressant d'investiguer, au niveau cellulaire et moléculaire, les perturbations structurelles de l'endothélium vasculaire en réponse à l'hypoxie intermittente.

Curieusement, les voies de signalisation menant au clivage de la VE-Cadhérine, telles que le VEGF ou le TNF α , sont également activées par l'hypoxie intermittente (Lévy et al., 2015). Cependant, rien n'est connu aujourd'hui sur ce clivage et ses conséquences chez les patients SAOS. Il est donc important de comprendre les mécanismes moléculaires de la dysfonction endothéliale dont la VE-cadhérine peut être à l'origine, afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques anti-athérogènes pour permettre une meilleure prise en charge des patients SAOS.

Notre hypothèse est que l'hypoxie intermittente induite par le SAOS provoque un clivage de la VE-Cadhérine, lui-même à l'origine d'une augmentation de la perméabilité endothéliale et des complications cardiovasculaires qui en découlent, notamment l'athérosclérose. Nous supposons que le stress oxydant active le facteur de transcription HIF-1, qui à son tour augmente l'expression de son gène cible le VEGF (Lévy et al., 2015) ; le VEGF se lie à son récepteur qui s'autophosphoryle et active la Src-kinase qui provoque la phosphorylation de VE-cadhérine et le clivage de son domaine extracellulaire (Polena et al., 2018; Sidibé et al., 2012) (Figure 13).

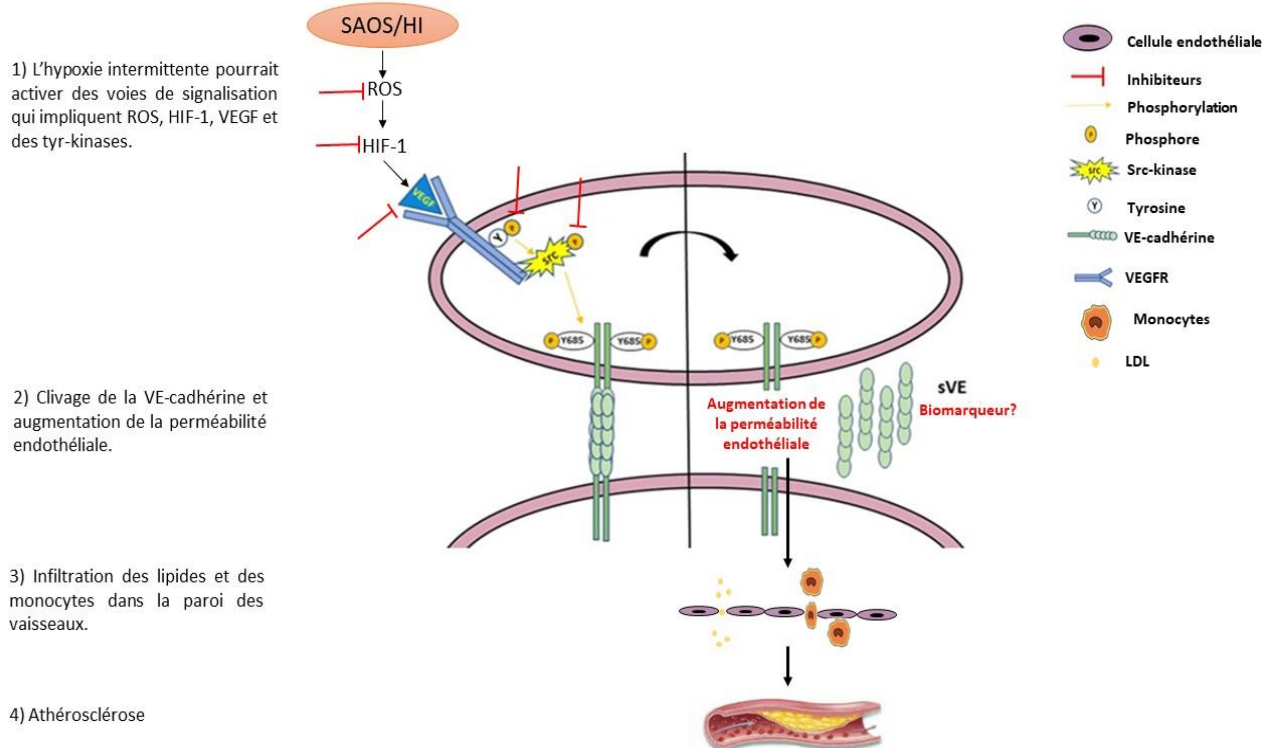


Figure 13 : Hypothèse de travail. 1) Dans le SAOS, l'hypoxie intermittente pourrait activer des voies de signalisation qui pourraient activer le clivage de la VE-cadhérine par une cascade de phosphorylation sur des résidus tyrosine. 2) La phosphorylation du domaine intracellulaire de la VE-cadhérine déclencherait le clivage de son domaine extracellulaire à l'origine d'une augmentation de la perméabilité endothéliale. 3) Infiltration des lipides et des monocytes dans l'intima facilitée par la perméabilité endothéliale. 4) Développement de l'athérosclérose qui pourrait être prévenue par inhibition du clivage de la VE-cadhérine.

Les objectifs de la thèse sont donc :

- d'étudier et comparer les taux de sVE dans les sérums de patients SAOS avant et après traitement par pression positive continue (PPC) ainsi que dans 3 modèles expérimentaux d'hypoxie intermittente (volontaires sains exposés à 14 nuits d'hypoxie intermittente, *in vivo* chez des souris exposées à l'hypoxie intermittente et *in vitro* dans les surnageants de cellules endothéliales aortiques humaines exposées à l'hypoxie intermittente),
- de décrypter, en utilisant un modèle *in vitro* d'hypoxie intermittente, les mécanismes moléculaires impliqués dans le clivage de la VE-cadhérine et dans la perméabilité endothéliale,

- d'évaluer *in vivo*, en utilisant un modèle murin d'hypoxie intermittente, l'impact du clivage de la VE-cadhérine sur la perméabilité endothéliale et ses conséquences sur les mécanismes pro-athérogéniques,
- d'évaluer, à travers un modèle murin d'hypoxie intermittente, le potentiel thérapeutique d'une stratégie anti-athérogène ciblant les voies impliquées dans le clivage de VE-Cadhérine.

II. Approche expérimentale

1. Modèles expérimentaux d'hypoxie intermittente

L'hypoxie intermittente est une composante majeure du syndrome d'apnées obstructives du sommeil qui affecte plusieurs tissus et organes. Le laboratoire HP2 est spécialisé dans l'étude des complications cardiovasculaires et métaboliques de l'hypoxie intermittente. Pour cela la plateforme HypE, labellisée IBiSA, a été développée par notre laboratoire pour mimer l'hypoxie intermittente *in vitro* sur des cellules en culture et, *in vivo*, chez des rongeurs et l'humain (<https://hp2.univ-grenoble-alpes.fr/plateforme-d-hypoxie-hype>) .

1.1. Dispositif d'hypoxie intermittente *in vitro*

La première version fonctionnelle du dispositif d'hypoxie intermittente cellulaire a été mise en place par l'équipe du Dr. Briançon-Marjollet en 2016 (Minoves et al., 2017). Il s'agit d'utiliser des boîtes ou plaques de culture cellulaire à fond perméable aux gaz sur des supports reliés à des sources de gaz. Des mélangeurs de gaz permettent de générer un gaz hypoxique (air + diazote en pourcentages variables) ou normoxique (air), en présence des 5% de CO₂ classiques permettant de tamponner les milieux de culture, avec un débit d'environ 200 ml/min. Ce mélange de gaz est distribué dans les supports des plaques de culture dont le fond est perméable aux gaz. Les cellulesensemencées dans ces plaques sont ainsi mises en contact direct avec le gaz à la teneur en oxygène souhaitée (Figure 14). Nous alternons ainsi une phase de normoxie à 16 % d'O₂ (pO₂=125mmHg dans le milieu de culture) pendant 5 minutes suivie d'une phase d'hypoxie à 2 % d'O₂ (pO₂=25mmHg dans le milieu de culture) pendant 5 minutes. Cependant, lorsque des inserts sont utilisés dans les plaques de culture (transwells), la pression partielle de l'oxygène (pO₂) dans les transwells varient entre 110mmHg pendant 5 minutes et 50mmHg pendant 5 minutes (Figure 14). En effet, dans les transwells la double membrane (membrane de la boîte + membrane de l'insert) et la hauteur de la membrane de l'insert par rapport au fond de la plaque d'exposition limitent la diffusion des gaz. Cependant, cette différence de pression en O₂ entre les transwells et les boîtes à fond perméable n'influence pas le clivage de la VE-cadhérine, ceci a été vérifié par dosage de sVE dans des surnageants de cellules endothéliales exposées à des cycles hypoxiques à 50mmHg (transwells) ou à 25mmHg (boîtes à fond perméable) (Figure 14 B-C).

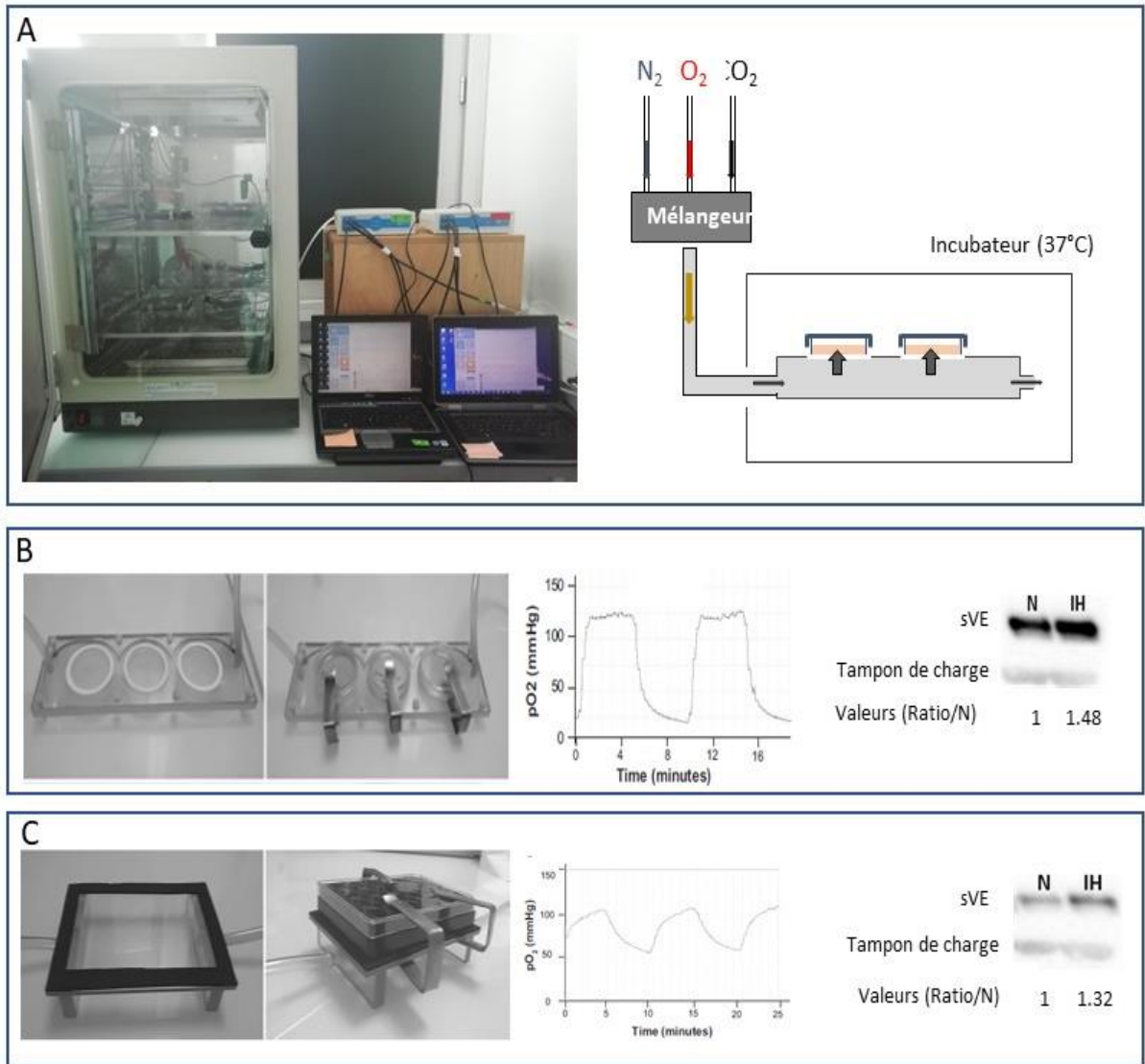


Figure 14 : Dispositif d'exposition cellulaire à l'hypoxie intermittente. **A)** Aspect et principe du dispositif. **B)** Supports utilisés lors de l'exposition dans des boîtes à fond perméable, cycles correspondants et clivage de VE-cadhérine résultant. **C)** Supports utilisés lors de l'exposition dans des transwells, cycles correspondants et clivage de VE-cadhérine résultant.

Ce dispositif est utile pour l'étude des voies de signalisation moléculaires impactées par l'hypoxie intermittente. Il permet la réalisation de cycles rapides et amples, proches de la physiopathologie du SAOS, avec une faible consommation de gaz.

1.2. Dispositif d'hypoxie intermittente *in vivo* pour rongeurs

Un dispositif d'exposition des rongeurs (souris et rats) a été mis en place dans le laboratoire HP2 et largement utilisé depuis une dizaine d'années (Dematteis et al., 2009). Il s'agit de relier les cages dans lesquelles se trouvent les animaux à des sources de gaz normoxique (air) ou hypoxique (air + diazote), le niveau d'hypoxie étant contrôlé de façon continue. Ainsi, pendant 8 heures par jour, la fraction inspirée en oxygène (F_{iO_2}) varie entre 5% pendant 30 secondes (phase hypoxique) et 21% pendant 30 secondes (phase normoxique), générant une hypoxie intermittente durant la période de sommeil des rongeurs. Les animaux respirent en normoxie pendant les 16 heures complémentaires du cycle journalier de 24h. La saturation artérielle en O_2 descend à environ 60% pendant les périodes d'hypoxie, mimant un syndrome d'apnées du sommeil sévère chez l'homme. Le dispositif est composé de 3 modules : 2 modules permettent d'exposer des souris et 1 module pour l'exposition des rats. Chaque module est composé de 5 cages d'hypoxie intermittente et 5 cages de normoxie qui permettent d'exposer les animaux normoxiques et hypoxiques aux mêmes stress dûs aux bruits des compresseurs et aux bruits des flux d'air générés par l'injection de gaz dans les cages (figure 15).

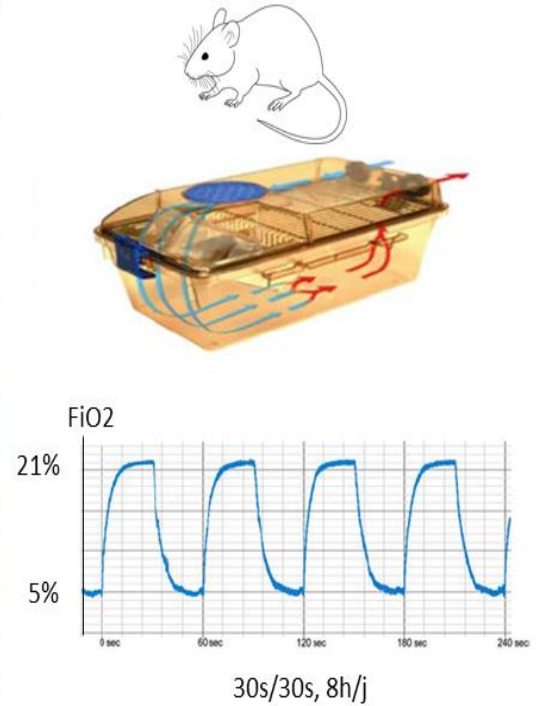


Figure 15: Dispositif d'exposition des rongeurs à l'hypoxie intermittente.

Ce modèle a l'avantage d'être non-invasif et moins stressant pour les rongeurs que les autres modèles d'hypoxie intermittente *in vivo* fondés sur la trachéotomie ou l'utilisation d'un ballon gonflable dans la trachée ou d'un masque nasal (Dematteis et al., 2009; Hunyor and Cook, 2018), et permet d'exposer les animaux pour de longues périodes. Cependant, il ne permet de mimer qu'une seule composante du syndrome d'apnées du sommeil qui est l'hypoxie intermittente.

1.3. Dispositif d'hypoxie intermittente chez l'humain

Le modèle d'hypoxie intermittente chez l'homme développé dans notre laboratoire par Dr. Renaud Tamisier consiste à utiliser des tentes d'altitude installées dans des chambres à lits standards à l'hôpital. L'atmosphère de la tente hypoxique est alimentée, à l'aide d'un extracteur d'oxygène, par un gaz avec une FiO₂ à 13% baissant la saturation artérielle en O₂ des sujets à 85%. Les phases cycliques de réoxygénation sont créées à l'aide de canules nasales qui délivrent un bolus d'O₂ de 15 secondes à un débit de 1.5-2 litre/min toutes les 120 secondes pour faire remonter la saturation en O₂ à 95%. Ce protocole a permis de mimer

un syndrome d'apnées du sommeil à 30 événements hypoxiques par heure. Le niveau d'oxygène a été suivi de façon continue pour chaque sujet et réglé à l'aide d'une vanne et d'un débitmètre (Tamisier et al., 2009) (Figure 16). L'accumulation de CO₂ a été surveillée lors des premières nuits de l'exposition et a été confirmée comme étant minimale. Au cours de la durée d'exposition, trois polysomnographies nocturnes complètes ont été réalisées (lors de la deuxième nuit d'exposition à l'air normoxique, la première et la dernière nuit d'exposition à l'hypoxie intermittente) (Tamisier et al., 2009).

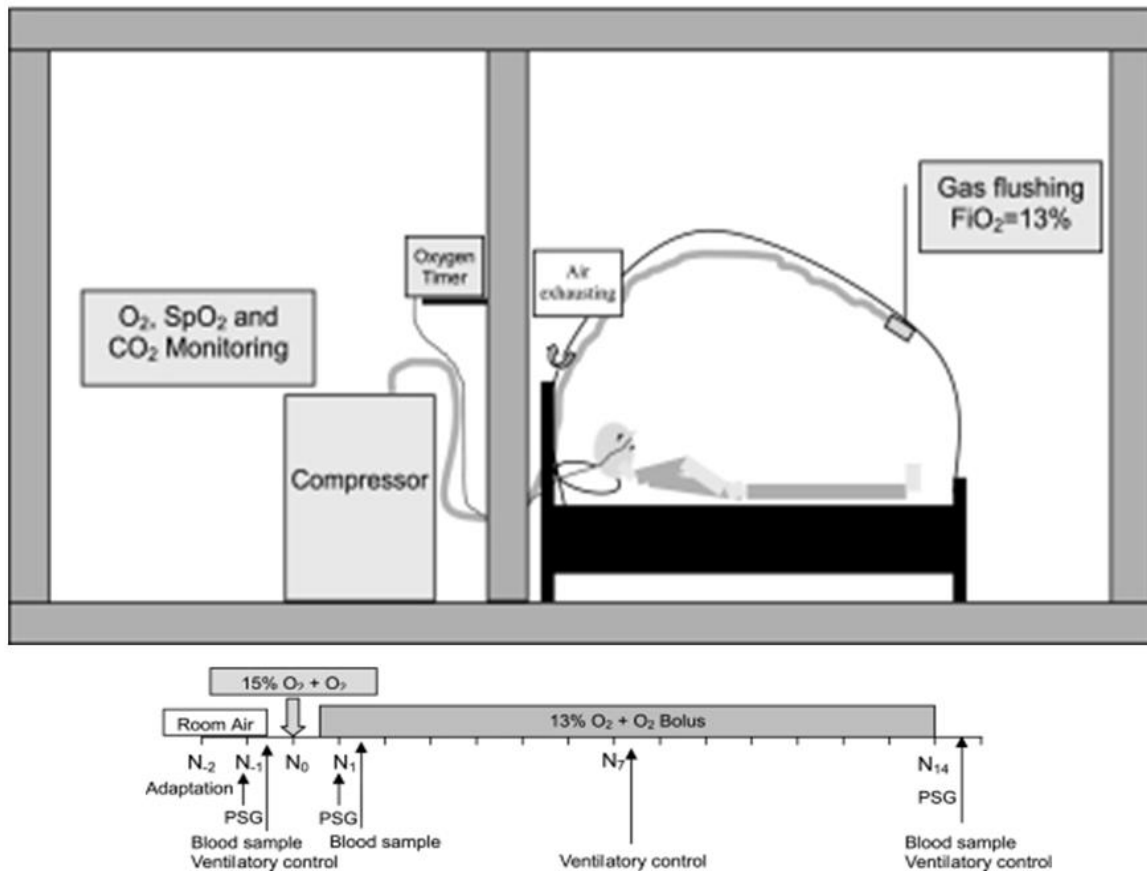


Figure 16 : Le modèle d'hypoxie intermittente de l'humain et protocole de l'étude pour chaque sujet (Tamisier et al., 2009).

Ce modèle a permis de reproduire l'hypoxie intermittente qui est la composante majeure du syndrome d'apnées obstructives du sommeil. Les désaturations sont comparables à celles qui se produisent cliniquement chez les patients SAOS. Cependant, ce modèle ne permet pas de reproduire l'hypercapnie et par conséquent les événements respiratoires du SAOS

puisque les désaturations ne sont pas asphyxiques et par conséquent ne sont pas accompagnées par des variations de la pression des voies aériennes supérieures, comme le sont les obstructions des voies aériennes supérieures chez les patients SAOS (Tamisier et al., 2009).

Dans le cadre de ma thèse, j'ai utilisé des échantillons de sérum de sujets provenant d'un essai clinique randomisé croisé en double aveugle ([ClinicalTrials.gov, Identifier: NCT02058823](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02058823)) utilisant ce dispositif. Cet essai a concerné 12 volontaires sains non obèses. L'exposition a été réalisée sur deux périodes de 14 nuits consécutives séparées d'une période de récupération (wash-out) de 6 semaines au moins. Durant l'une des périodes, les sujets ont été soumis, pendant 8-9h/nuit, à des cycles d'hypoxie intermittente de 2 minutes avec une phase hypoxique à 13% de FiO₂ et une phase normoxique à 21% d'oxygène. Durant l'autre période les sujets ont été soumis à une respiration d'air normoxique aussi bien au niveau de l'atmosphère de la tente qu'au niveau de l'injection intranasale (hypoxie intermittente placebo).

2. Etudes réalisées

Etude 1 : Caractérisation des mécanismes moléculaires du clivage de la VE-cadhérine *in vitro* et recherche de sVE sérique chez l'humain

1. Objectifs

Les objectifs de cette étude sont :

- d'étudier le taux sérique de sVE chez des patients SAOS avant et après le traitement par pression positive continue (PPC) ainsi que chez des volontaires sains exposés à 14 nuits d'hypoxie intermittente,
- de caractériser les mécanismes moléculaires impliqués dans le clivage de la VE-cadhérine et la perméabilité endothéliale induits par l'hypoxie intermittente en utilisant le modèle *in vitro*.

2. Matériel et méthodes

2.1. Recherche de sVE sérique chez l'Homme

Nous avons analysé le taux sérique de sVE dans deux études :

- la première est un essai clinique croisé randomisé en double aveugle ([ClinicalTrials.gov : NCT02058823](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02058823)) qui concernait 7 volontaires sains exposés à l'hypoxie intermittente comme décrit précédemment dans la partie 1.3. de l'approche expérimentale, la sVE a été dosée avant et après exposition à l'hypoxie intermittente ou à l'air intermittent (Figure 17).

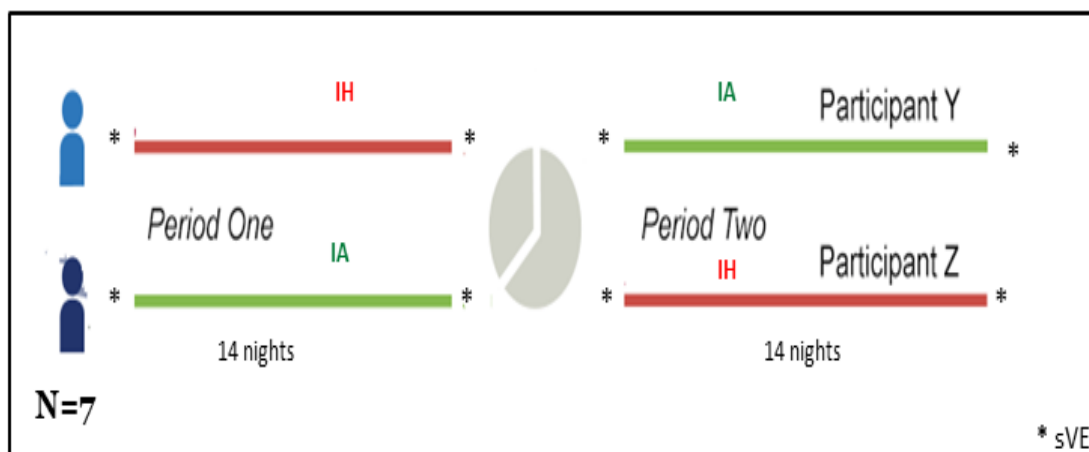


Figure 17 : protocole d'exposition des volontaires sains à l'air intermittent (IA) ou à l'hypoxie intermittente (IH).

- la deuxième est une étude cas-témoin ([ClinicalTrials.gov : NCT00764218](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT00764218)) qui concernait une cohorte de 43 patients "infraSAS" atteints de SAOS sans aucune comorbidité cardiovasculaire et sous traitement PPC et 31 sujets témoins sains sans SAOS et sans comorbidités cardiovasculaires. La sVE a été dosée avant et après 6 mois de traitement par PPC chez les patients ou avant et après 6 mois de suivi sans aucune intervention thérapeutique chez les sujets témoins.

La sVE a été dosée de façon semi-quantitative par Western blot dans les sérums dilués à 1/50^{ème} dans du PBS en utilisant un anticorps primaire monoclonal murin anti-VE-cadhérine humaine (clone BV9), qui reconnaît le domaine extracellulaire de la VE-cadhérine (protocole détaillé dans l'article publié).

2.2. Caractérisation *in vitro* des mécanismes moléculaires impliqués dans le clivage de la VE-cadhérine induit par l'hypoxie intermittente

Nous avons utilisé des cellules endothéliales aortiques humaines (HAEC) d'origine commerciale, qui ont été soumises à des cycles d'hypoxie intermittente pendant 6 heures à l'aide du dispositif décrit dans la partie 1.1 de l'approche expérimentale.

Dans un premier temps, nous avons mesuré la perméabilité endothéliale par la méthode TEER (trans-endothelial electrical resistance) qui consiste à mesurer l'impédance électrique de l'insert ensemencé par une monocouche de cellules endothéliales à l'aide de deux électrodes, l'une dans le compartiment supérieur et l'autre plus longue dans le compartiment inférieur du transwell (figure 18), et par la méthode de mesure du passage de FITC-dextran à travers la monocouche de cellules endothéliales en utilisant également des transwells (protocole détaillé en annexe 4).

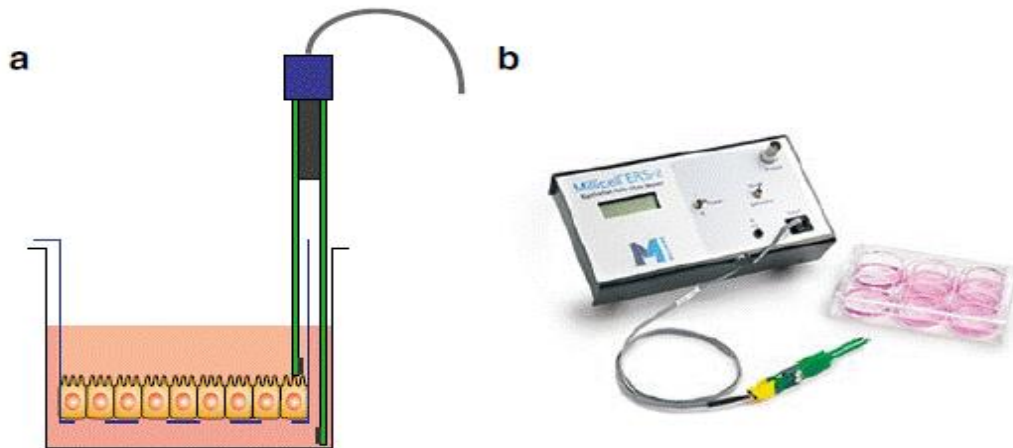


Figure 18: a) Les deux électrodes de l'appareil à TEER placées de part et d'autre de la monocouche cellulaire pour mesurer sa résistance électrique. b) Les deux électrodes sont reliées à un voltmètre qui affiche une valeur de résistance en Ω/cm^2 (Ebrary).

Dans un deuxième temps, nous avons dosé la sVE dans les surnageants concentrés des cellules endothéliales exposées à l'hypoxie intermittente. Le dosage semi-quantitatif a été réalisé par Western blot en utilisant un anticorps primaire monoclonal murin anti-VE-cadhérine humaine (clone BV9) dirigé contre le domaine extracellulaire de la VE-cadhérine (protocole détaillé dans l'article publié).

Des inhibiteurs des médiateurs supposés impliqués dans le clivage de la VE-cadhérine ont été utilisés sur les cultures d'HAEC pour décrypter les mécanismes moléculaires sous-jacents en mesurant comme décrit ci-haut la perméabilité endothéliale et le taux de sVE dans les surnageants de cellules. Nous avons utilisé le DMSO comme témoin (0,1%), la génistéine comme un inhibiteur des tyrosine kinases à large spectre (30 μ M), le PP2 comme un inhibiteur spécifique de Src-kinases (10 μ M), le saracatinib (=AZD0530) comme un inhibiteur spécifique des Src-kinases (1 μ M), le 2-méthoxyestradiol qui est un inhibiteur de HIF-1 dépourvu d'effet œstrogénique (1 μ M), l'acriflavine qui est un inhibiteur de HIF-1 plus spécifique que le 2-ME (1 μ M), le pazopanib qui est un inhibiteur des tyrosine kinases des récepteurs du VEGF (5 μ g/mL), un anticorps bloquant anti-hVEGF (0,5 μ g/mL), et enfin le Tempol comme antioxydant (100 μ M). La toxicité de toutes ces molécules a été vérifiée préalablement sur une culture de cellules endothéliales.

2.3. Principaux résultats

Le taux sérique de sVE était significativement augmenté de 19% dans les sérums des volontaires sains après exposition à l'hypoxie intermittente et reste stable après exposition à l'air. Le taux sérique de sVE était également plus élevé chez les patients SAOS avant le traitement par PPC que chez les sujets témoins [médiane = 0.90 (0.57–1.06) vs 0.52 (0.43–0.92)]. L'analyse univariée a montré une corrélation positive significative entre le taux sérique de sVE et la sévérité de SAOS évaluée par l'indice AHI ($p=0.041$), ainsi qu'entre les taux sériques de sVE et de VEGF ($p=0.04$). La PPC a diminué le taux sérique de sVE après 6 mois de traitement chez les patients SAOS, notamment chez ceux qui sont les plus observants (utilisation supérieure à 6 heures/nuit).

Dans le modèle *in vitro* de HAEC en culture, l'hypoxie intermittente a augmenté le clivage de la VE-cadhérine de 39%, ainsi que la perméabilité endothéliale : +37,5% par la méthode TEER et +19,5% par la méthode de passage de dextran. Ces effets ont été prévenus par les inhibiteurs utilisés.

Ces résultats ont fait l'objet d'un article publié dans l'European Respiratory Journal (ERJ) en 2021 (résumé graphique ci-dessous en figure 19) inséré dans les pages suivantes : **Harki O, Tamisier R, Pépin JL, Bailly S, Mahmani A, Gonthier B, Salomon A, Vilgrain I, Faury G, Briançon-Marjollet A.** *VE-Cadherin cleavage in sleep apnoea: new insights into intermittent hypoxia-related endothelial permeability.* *Eur Respir J.* 2021 ; 58:2004518. doi: 10.1183/13993003.04518-2020.

Cet article a aussi fait l'objet d'un commentaire publié par ERJ : **Li SQ, Lin YN, Li QY.** *Soluble VE-cadherin: not just a marker of endothelial permeability.* *Eur Respir J.* 2021;58:2102241. doi: 10.1183/13993003.02241-2021 (voir annexe 3) et d'une réponse de notre part dans le même journal : **Harki O, Faury G, Vilgrain I, Pépin JL, Briançon-Marjollet A.** *Response to ERJ-02241-2021, Li et al., Soluble VE-cadherin : not just a marker of endothelial permeability.* *Eur Respir J.* 2021 ; 58:2102629. doi: 10.1183/13993003.02629-2021., insérée aussi dans les pages suivantes.

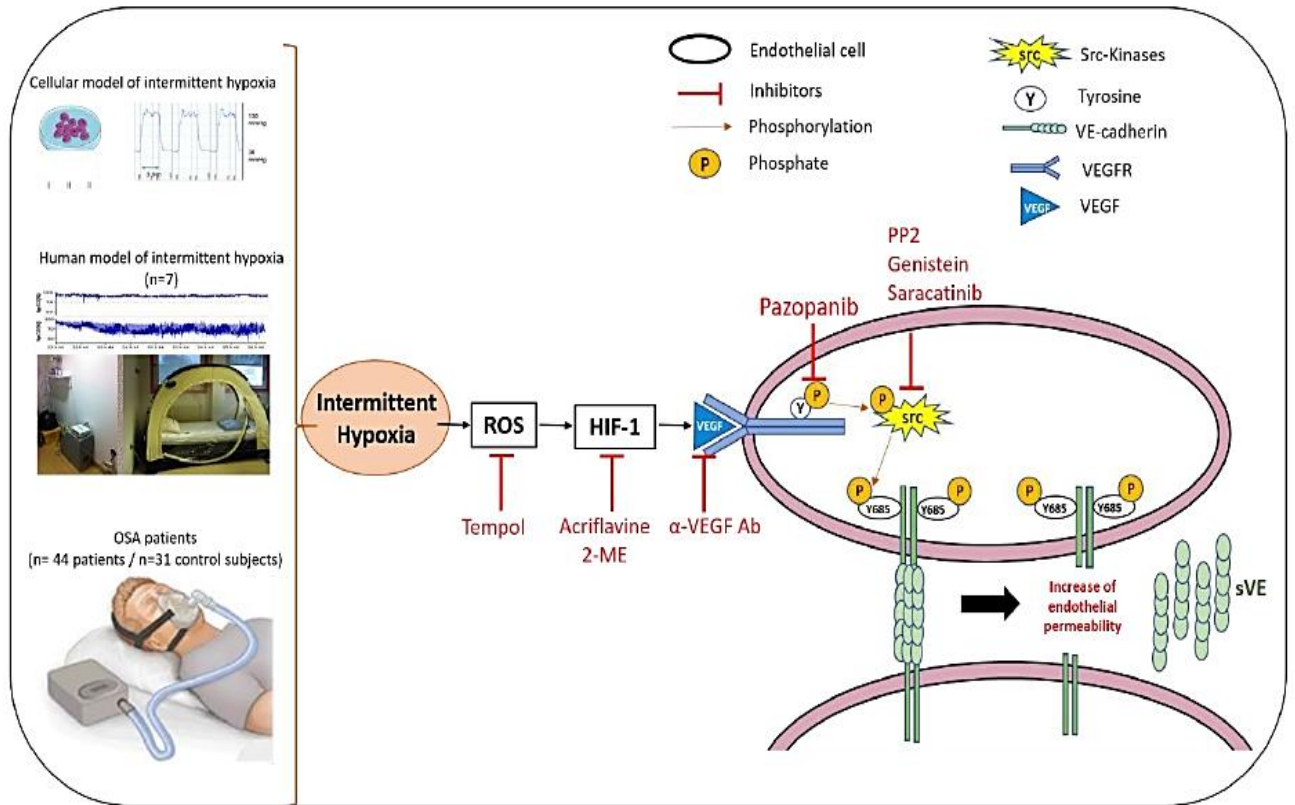


Figure 19 : Résumé visuel de l'article

2.4. L'article publié dans ERJ



VE-cadherin cleavage in sleep apnoea: new insights into intermittent hypoxia-related endothelial permeability

Olfa Harki¹, Renaud Tamisier ¹, Jean-Louis Pépin¹, Sébastien Bailly ¹, Anissa Mahmani¹,
Brigitte Gonthier¹, Aude Salomon², Isabelle Vilgrain², Gilles Fauray¹ and Anne Briançon-Marjollet ¹

¹Université Grenoble Alpes, INSERM, CHU Grenoble Alpes, Laboratoire HP2, Grenoble, France. ²Université Grenoble Alpes, INSERM U1036, CEA, Grenoble, France.

Corresponding author: Anne Briançon-Marjollet (anne.briancon@univ-grenoble-alpes.fr)



Shareable abstract (@ERSpublications)

This study demonstrates for the first time that VE-cadherin is cleaved in sleep apnoea patients, in volunteers exposed to 14 nights of intermittent hypoxia and in endothelial cells exposed to *in vitro* intermittent hypoxia, leading to increased endothelial permeability <https://bit.ly/3sAy5sc>

Cite this article as: Harki O, Tamisier R, Pépin J-L, *et al.* VE-cadherin cleavage in sleep apnoea: new insights into intermittent hypoxia-related endothelial permeability. *Eur Respir J* 2021; 58: 2004518 [DOI: 10.1183/13993003.04518-2020].

Copyright ©The authors 2021. For reproduction rights and permissions contact permissions@ersnet.org

This article has supplementary material available from erj.ersjournals.com

This article has an editorial commentary: <https://doi.org/10.1183/13993003.01169-2021>

Received: 14 Dec 2020
Accepted: 24 Feb 2021

Abstract

Background Obstructive sleep apnoea (OSA) causes intermittent hypoxia that in turn induces endothelial dysfunction and atherosclerosis progression. We hypothesised that VE-cadherin cleavage, detected by its released extracellular fragment solubilised in the blood (sVE), may be an early indicator of emergent abnormal endothelial permeability. Our aim was to assess VE-cadherin cleavage in OSA patients and in *in vivo* and *in vitro* intermittent hypoxia models to decipher the cellular mechanisms and consequences.

Methods Sera from seven healthy volunteers exposed to 14 nights of intermittent hypoxia, 43 OSA patients and 31 healthy control subjects were analysed for their sVE content. Human aortic endothelial cells (HAECs) were exposed to 6 h of intermittent hypoxia *in vitro*, with or without an antioxidant or inhibitors of hypoxia-inducible factor (HIF)-1, tyrosine kinases or vascular endothelial growth factor (VEGF) pathways. VE-cadherin cleavage and phosphorylation were evaluated, and endothelial permeability was assessed by measuring transendothelial electrical resistance (TEER) and fluorescein isothiocyanate (FITC)-dextran flux.

Results sVE was significantly elevated in sera from healthy volunteers submitted to intermittent hypoxia and OSA patients before treatment, but conversely decreased in OSA patients after 6 months of continuous positive airway pressure treatment. OSA was the main factor accounting for sVE variations in a multivariate analysis. In *in vitro* experiments, cleavage and expression of VE-cadherin increased upon HAEC exposure to intermittent hypoxia. TEER decreased and FITC-dextran flux increased. These effects were reversed by all of the pharmacological inhibitors tested.

Conclusions We suggest that in OSA, intermittent hypoxia increases endothelial permeability in OSA by inducing VE-cadherin cleavage through reactive oxygen species production, and activation of HIF-1, VEGF and tyrosine kinase pathways.

Introduction

Obstructive sleep apnoea (OSA) is one of the most frequent chronic diseases, affecting up to nearly 1 billion individuals worldwide [1], and is characterised by the repetitive occurrence of apnoeas and hypopnoeas during sleep [2]. With the key feature of repeated episodes of hypoxia-reoxygenation, the main intermediary mechanism for the deleterious consequences of OSA is intermittent hypoxia.

OSA is associated with elevated cardiovascular morbidity and mortality due to an increased risk of hypertension, atherosclerosis, coronary heart disease and cerebrovascular disease [2]. Intermittent hypoxia is recognised as the key intermediary mechanism leading to cardiovascular morbidity and mortality. Indeed, intermittent hypoxia induces various processes such as oxidative stress, activation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1, low-grade chronic inflammation and sympathetic activation, which in

turn are responsible for endothelial dysfunction, hypertension and atherosclerosis [2–4]. Importantly, the link between OSA/intermittent hypoxia and the structural and functional impairment of the vascular endothelium has been addressed both in patients and in animal models, in which elevated oxidative stress, higher production of inflammatory cytokines and pro-atherogenic adhesion molecules have been reported [3–7]. However, although the regulation of endothelial permeability is of major importance in the initiation and development of early atherogenesis, this aspect has been sparsely studied in OSA so far. Cellular and molecular mechanisms underlying the regulation of endothelial permeability in OSA have been investigated in a limited number of studies both in OSA patients and experimental models such as rodents [8] or cell culture [9, 10] exposed to intermittent hypoxia.

Endothelial barrier permeability is controlled by adherens junctions in which VE-cadherin, through its capability for homophilic adhesion, plays a pivotal role [11]. Targeting VE-cadherin *in vitro* using specific antibodies directed against epitopes in its extracellular domain impedes the formation of adherens junctions and increases endothelial permeability [12]. Two mechanisms explaining the reduction in VE-cadherin's homophilic adhesion have been described and are known to increase endothelial permeability: the first is the internalisation of the whole molecule [13] and the second, more recently described, is the cleavage of its extracellular domain by proteases such as matrix metalloproteinases. This cleavage releases a 90-kDa soluble fragment (sVE) detectable in blood [14, 15] and elevated serum levels of sVE have been documented in several human disorders characterised by endothelial dysfunction, such as atherosclerosis, systemic vasculitis and cancer metastasis [16, 17].

The phosphorylation of the cytoplasmic domain of VE-cadherin at a specific tyrosine site (Y685) by the tyrosine kinase Src is an early event of major importance in the mechanism of VE-cadherin cleavage and regulation of endothelial permeability [15, 18–20]. These phosphorylation processes are induced by cytokines such as vascular endothelial growth factor (VEGF) [18] and tumour necrosis factor (TNF)- α [15].

To the best of our knowledge, VE-cadherin regulation in OSA has never been studied. Several signalling pathways involved in VE-cadherin cleavage are activated in individuals with OSA or in intermittent hypoxia models, in which elevated VEGF [6, 21, 22] and TNF- α [23] levels are found. Thus, we hypothesised that intermittent hypoxia could activate signalling pathways leading to VE-cadherin cleavage and thereby increase endothelial permeability. These intermittent hypoxia-induced pathways could include generation of oxidative stress, activation of HIF-1 by reactive oxygen species (ROS) [2, 24], expression of VEGF as a target gene of HIF-1 [25, 26], and activation of Src kinases by VEGF signalling [18] and/or directly by ROS [27].

Our objectives were 1) to study sVE levels in OSA patient's sera before and after treatment with continuous positive airway pressure (CPAP) as well as in healthy volunteers exposed to 14 nights of intermittent hypoxia, and 2) to dissect *in vitro* the molecular mechanisms involved in VE-cadherin cleavage and increased permeability in an endothelial cellular model of intermittent hypoxia.

A visual overview of the study can be found in the supplementary material.

Methods

Study populations

Healthy volunteers exposed to 14 nights of intermittent hypoxia

We used sera from a double-blind randomised crossover study (ClinicalTrials.gov: NCT02058823) in which 12 healthy volunteers were exposed to intermittent hypoxia (inspiratory oxygen fraction ($F_{I_{O_2}}$) cycling between 0.21 and 0.13; 120 s hypoxia–reoxygenation cycles), 8–9 h per night, for 14 nights, or to intermittent air ($F_{I_{O_2}}$ 0.21) with similar airflow as a control [28]. Among them, seven volunteers completed the two arms of the crossover trial. Blood samples were collected from these seven fasted volunteers in the morning, before and after 2 weeks of overnight exposure to intermittent air or to intermittent hypoxia, and stored at -80°C . More details can be found in the supplementary material.

OSA patients before and after CPAP treatment

Biological samples from a case-controlled study that included 43 OSA patients without any known cardiovascular comorbidity and 31 control subjects without OSA or cardiovascular disease (ClinicalTrials.gov: NCT00764218) were analysed [29]. Serum samples were taken fasted in the morning after overnight polysomnography performed before and after 6 months of CPAP treatment, or at 6 months follow-up without intervention in control subjects. Sera were stored at -80°C until use. VEGF was measured in sera by ELISA (Quantikine; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) [6].

Ethics

For both studies, ethical approval was obtained from our Institutional Review Board (Comité de Protection des Personnes Sud-Est V, Grenoble, France) and all subjects or patients gave written informed consent. Protocols conformed to the principles of the Declaration of Helsinki.

Cell culture

Cells

Cryopreserved primary human aortic endothelial cells (HAECs) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) were used before passage 8. Cells were seeded at a density of 1.6×10^4 cells·cm⁻² in M200 medium supplemented with Large Vessel Endothelial Supplement (LVES; Thermo Fisher Scientific) and penicillin/streptomycin according to the supplier's recommendations, using a conventional incubator for cell culture (37°C/5% CO₂). Cell culture reagents were purchased from Gibco Thermo Fisher Scientific (Illkirch, France).

Intermittent hypoxia exposure

Cells were exposed to fast intermittent hypoxia cycles using a recently developed device that mimics the hypoxia–reoxygenation cycles of OSA patients, as previously described [24]. An intermittent hypoxia cycle includes a 5-min normoxia phase (16% O₂) followed by a 5-min hypoxia phase (2% O₂). More details can be found in the supplementary material.

Chemicals and inhibitors

Details can be found in the supplementary material.

Measurement of transendothelial electrical resistance

Confluent HAECs seeded in transwell inserts (supplementary material) were placed in M200 without LVES, treated with dimethyl sulfoxide (DMSO) or inhibitors and exposed to intermittent hypoxia or normoxia for 6 h. Endothelial permeability was assessed by measuring transendothelial electrical resistance (TEER) at 0 and 6 h of exposure using an EVOM resistance meter (World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA). Three values of TEER were recorded per insert and a blank insert (devoid of cells) was used to subtract the blank TEER value. Data are expressed as percentage of the TEER value of inserts containing confluent normoxic cells.

Measurement of fluorescein isothiocyanate–dextran flux

Confluent HAECs seeded in transwell inserts (supplementary material) were placed in M200 without LVES and exposed to intermittent hypoxia or normoxia. After 4 h of exposure, 40-kDa fluorescein isothiocyanate (FITC)–dextran (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) was added at 200 µg·mL⁻¹ to the upper chamber of the transwell. The cells were then placed in the intermittent hypoxia device for another 2 h. The quantification of FITC–dextran flux through the endothelial monolayer was monitored by measuring the fluorescence in the lower chamber underneath the culture. Data are expressed as percentage of fluorescence of normoxic inserts.

Immunofluorescence

Cells (previously fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 10 min) were permeabilised and stained with mouse monoclonal anti-VE-cadherin primary antibody directed against the extracellular domain (BV9 clone; Merck Millipore, Darmstadt, Germany) followed by Alexa Fluor 488 anti-mouse secondary antibody (Thermo Fisher Scientific). Actin was stained with phalloidin and cell nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole. Cells were examined by fluorescence microscopy (Axio Imager; Zeiss, Oberkochen, Germany) and fluorescence in the membrane area was quantified using ImageJ software (Fiji; imagej.net/Fiji) by subtracting cytoplasmic and nuclear staining from whole-cell staining.

VE-cadherin phosphorylation detection

Cells were placed in M200 without LVES for 1 h, then treated with the inhibitors and exposed to intermittent hypoxia or normoxia for 6 h. After exposure, cells were scrapped on ice using PBS and centrifuged at 250×g, at 4°C for 5 min. The presence of phosphorylated VE-cadherin in cell extracts was assessed by Western blotting with a rabbit anti-phospho-Y685-VE-cadherin antibody (1 µg·mL⁻¹). More details are available in the supplementary material.

sVE detection

Participant's sera and concentrated HAEC supernatants were analysed for sVE content. Sera were diluted 1:50 in PBS supplemented with 0.5% Triton. HAEC supernatants were collected after intermittent hypoxia exposure and concentrated using Amicon Ultra-4 centrifugal filter columns with 30-kDa molecular weight

cut-off (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany). The presence of sVE was assessed by Western blotting with a mouse monoclonal anti-VE-cadherin primary antibody (BV9 clone; $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Investigators were blinded to the source of sera. More details about the Western blot protocol are available in the supplementary material.

Statistical analysis

Unpaired comparisons between two groups were made using the t-test or Mann–Whitney test and paired comparisons were performed using the Wilcoxon signed-rank test. Comparisons between several groups were performed by two-way ANOVA followed by the *post hoc* Tukey test. The choice of parametric or nonparametric tests depended on the normal distribution of values and on the equality of variances. Repeated measures ANOVA was performed when applicable (*i.e.* for subjects at baseline and month 6). A univariable linear model was used to identify factors associated with sVE. Since sVE was not normally distributed, a logarithmic transformation was performed. Variables with $p < 0.2$ in the univariable analysis were considered in the multivariable linear regression, in which we adjusted for confounding parameters (age, sex, heart rate, arterial pressure, waist/hip ratio, cholesterol, glycaemia and creatinine). Finally, to assess the evolution of serum sVE under CPAP, a multivariate mixed linear regression with a random effect on patient was performed, adjusting on age, sex, CPAP adherence and duration between sVE measurements.

In cell culture experiments, to take into account the fact that several wells were usually used in a single independent experiment, the experiment was included as a random factor in a linear mixed model, where fixed effects were intermittent hypoxia and pharmacological treatment exposure. We verified that there was no significant impact of experiment on the effect of intermittent hypoxia or pharmacological treatment exposure.

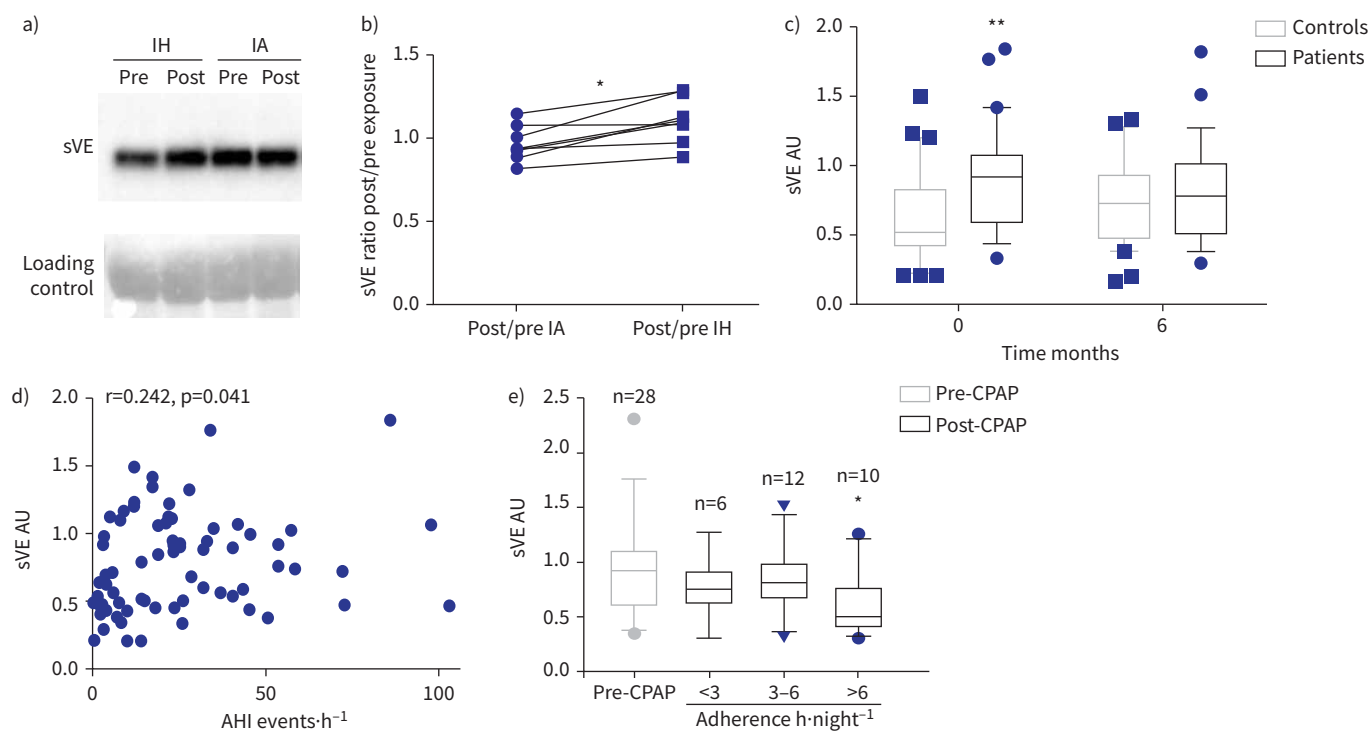


FIGURE 1 Circulating soluble VE (sVE) was increased in sera from healthy volunteers (controls) subjected to intermittent hypoxia (IH) and obstructive sleep apnoea (OSA) patients. IA: intermittent air; AHI: apnoea-hypopnoea index; CPAP: continuous positive airway pressure. a) Western blot showing a representative example of sVE (90 kDa) in the serum of a healthy volunteer before and after 14 nights of exposure to IH or IA. b) Ratio of sVE post/pre IH or IA exposure calculated after quantification of Western blots for seven individuals. *: $p = 0.015$ versus IA; Wilcoxon test. c) sVE was significantly higher in patients than in control subjects at baseline (month 0) (**: $p = 0.0058$; repeated measures two-way ANOVA) but not after 6 months of CPAP treatment ($p = 0.78$). 30 subjects for each column, because only subjects for which both month 0 and month 6 samples were available were included in this paired analysis. d) Spearman correlation between AHI and sVE at baseline. 72 subjects. e) Patients with high adherence to CPAP therapy ($>6 \text{ h}\cdot\text{night}^{-1}$) significantly decreased their serum level of sVE after 6 months (*: $p = 0.034$ versus sVE level before CPAP treatment) unlike less adherent patients ($<6 \text{ h}\cdot\text{night}^{-1}$; $p > 0.99$ versus sVE level before CPAP treatment); Kruskal–Wallis test. Tukey plots indicate median and interquartile range.

TABLE 1 Univariate analysis for factors contributing to soluble VE variations at baseline

Variables	Items, classes	Estimator±SE	p-value
Group	OSA patients	0.413±0.12	0.001 ^{#,*}
Age years	47–<53.5	0.335±0.18	0.18 [#]
	53.5–<61.75	0.126±0.18	
	≥61.75	–0.014±0.18	
Sex	Male	0.481±0.15	0.002 ^{#,*}
BMI kg·m ^{–2}	23.2–<24.9	–0.215±0.19	0.46
	24.9–<27.3	0.038±0.18	
	≥27.3	0.065±0.02	
Neck circumference cm		0.056±0.18	0.01 ^{#,*}
Waist/hip ratio		1.98±0.88	0.03 ^{#,*}
Tobacco status	Current or ex-smoker	0.068±0.13	0.60
Alcohol consumption	No alcohol	–0.174±0.15	0.25
AHI events·h ^{–1}	6.5–<21	0.19±0.17	0.04 ^{#,*}
	21–<35.2	0.46±0.17	
	≥35.2	0.39±0.17	
Epworth score	5–<9	–0.114±0.19	0.63
	9–<13	–0.175±0.19	
	≥13	0.034±0.19	
Mean nocturnal S _{aO₂} %	93–<94	0.16±0.15	0.46
	94–<95	0.31±0.21	
	≥95	0.07±0.18	
Minimum nocturnal S _{aO₂} %	94–<95	–0.021±0.009	0.03 ^{#,*}
	≥95		
Time spent S _{aO₂} <90% % TST	0–<2	0.08±0.16	0.62
	≥2		
24-h SBP mmHg		0.021±0.005	0.0002 ^{#,*}
24-h DBP mmHg		0.026±0.006	0.0002 ^{#,*}
Heart rate beats·min ^{–1}	64–<69	0.371±0.19	0.09 [#]
	69–<76	0.217±0.18	
	≥76	0.449±0.18	
VEGF pg·mL ^{–1}		0.001±0.0002	0.04 ^{#,*}
Ultrasensitive CRP mg·L ^{–1}	0.5–<1.05	0.035±0.20	0.94
	1.05–<1.9	0.086±0.22	
	≥1.9	–0.03±0.21	
Total cholesterol g·L ^{–1}	1.8–<2	–0.180±0.18	0.13 [#]
	2–<2.3	–0.082±0.19	
	≥2.3	0.221±0.18	
Triglycerides g·L ^{–1}	0.7–<1	0.074±0.18	0.81
	1–<1.4	0.162±0.19	
	≥1.4	0.151±0.18	
Glycaemia mmol·L ^{–1}		0.295±0.13	0.03 ^{#,*}
Creatinine μmol·L ^{–1}		0.0008±0.003	0.04 ^{#,*}
Insulin μU·mL ^{–1}	3–<3.85	0.074±0.18	0.82
	3.85–<5.5	0.162±0.19	
	≥5.5	0.151±0.18	

OSA: obstructive sleep apnoea; BMI: body mass index; AHI: apnoea–hypopnoea index; S_{aO₂}: arterial oxygen saturation; TST: total sleep time; SBP: systolic blood pressure; DBP: diastolic blood pressure; VEGF: vascular endothelial growth factor; CRP: C-reactive protein. Variables were categorised in three classes corresponding to tertiles or in two categories to compare severe OSA *versus* other patients. #: variables with p<0.2 in the univariable analysis were considered in the multivariable linear regression. *: p<0.05.

Outcomes were considered significant when p<0.05. Values are reported as mean±SEM or median (interquartile range (IQR)), depending on their normal distribution.

Results

Intermittent hypoxia stimulates VE-cadherin cleavage in healthy individuals

We assessed sVE levels in the sera of seven healthy volunteers randomly assigned to 14 nights of intermittent hypoxia or intermittent air. The subjects' characteristics were: mean age 23.8±3.5 years and body mass index (BMI) 21.3±2.4 kg·m^{–2}, and five out of the seven (~70%) were male. sVE levels

TABLE 2 Baseline parameters independently associated with soluble VE as determined by a multivariate analysis

Variables	Items, classes	Estimator \pm se	p-value
Group	OSA patients	0.346 \pm 0.12	0.005*
Sex	Male	0.387 \pm 0.15	0.01*
Age years	47–<53.5	0.277 \pm 0.16	0.23
	53.5–<61.75	0.075 \pm 0.16	
	\geq 61.75	–0.022 \pm 0.16	
VEGF pg·mL ^{–1}		0.0004 \pm 0.0002	0.06

OSA: obstructive sleep apnoea; VEGF: vascular endothelial growth factor. *: p<0.05.

remained stable after exposure to 14 nights of intermittent air (median post/pre intermittent air ratio 0.94) while they increased by 19% after 14 nights of intermittent hypoxia exposure (median post/pre intermittent hypoxia ratio 1.12; p=0.015 *versus* intermittent air) (figure 1a and b).

sVE levels are higher in OSA patients than in healthy control subjects

Baseline characteristics of the study population are shown in supplementary table S1. BMI, triglycerides and diastolic blood pressure were slightly higher in individuals with OSA, without clinical relevance. At baseline, the median sVE was significantly higher (+70%) in patients than in control subjects (0.90 (0.57–1.06) *versus* 0.52 (0.43–0.92) AU; p=0.0058) (figure 1c and supplementary table S1). Univariate analysis showed that among parameters significantly associated with sVE values were the OSA severity indices apnoea–hypopnoea index (AHI) and minimal oxygen saturation, sex, systolic and diastolic blood pressure, and the concentration of VEGF in sera (table 1). AHI positively correlated with sVE (r=0.242, p=0.041) (figure 1d). In multivariate analysis, OSA status was independently associated with a 34.6% increase in sVE (p=0.005). Male sex was associated with a 38.7% increase in sVE (p=0.01) (table 2).

sVE decreases after CPAP treatment

After 6 months of CPAP treatment, there was no difference in sVE levels between control subjects and patients (0.77 (0.51–0.92) AU for patients *versus* 0.72 (0.47–0.93) AU for controls; p=0.78) (figure 1c). The level of sVE in control subjects tended to increase between month 0 and month 6, but this increase remained nonsignificant (p=0.59). In a *post hoc* analysis, a decrease in sVE level only occurred in patients with the highest nightly CPAP usage (p=0.034 when CPAP was used for >6 h·night^{–1} *versus* nonsignificant for CPAP used <3 or 3–6 h·night^{–1}) (figure 1e).

Intermittent hypoxia increases VE-cadherin expression and cleavage in vitro leading to endothelial permeability

Western blot analysis showed a significant increase in sVE in supernatants of HAECs after 6 h of exposure to intermittent hypoxia compared with normoxia (+39%; p<0.05) (figure 2a). This result was accompanied by an apparent decrease in the presence of the extracellular domain of VE-cadherin at the cell membrane as shown by immunofluorescence (figure 2b). There was a significant 37.5% reduction in the TEER of HAEC monolayers exposed to 6 h of intermittent hypoxia compared with normoxia (figure 2c), reflecting an increase in endothelial permeability. This was confirmed by an increase in transendothelial FITC–dextran flux after intermittent hypoxia (+19.5%) (figure 2d).

We also demonstrated that intermittent hypoxia induced a 1.3-fold increase in the total amount of VE-cadherin (figure 3a and b) accompanied by a 2.5-fold increase in the amount of phosphorylated VE-cadherin tyrosine (Y685) compared with β -actin (figure 3c). The phosphorylated VE-cadherin/total VE-cadherin ratio tended to be elevated (median (IQR) ratio 1.3 (1.0–2.4)) although it did not reach significance (p=0.12) (figure 3d).

Signalling pathways involved in intermittent hypoxia-induced VE-cadherin cleavage

We investigated the role of oxidative stress, HIF-1 activation, VEGF signalling and tyrosine kinase activity. First, the role of oxidative stress was addressed by using Tempol, a potent ROS scavenger acting as a superoxide dismutase mimetic. Tempol significantly increased TEER values and decreased sVE levels in HAEC supernatants under intermittent hypoxia compared with DMSO, suppressing the intermittent hypoxia effects and returning TEER and sVE levels to baseline (figure 4a and b). Tempol had no effect on TEER and sVE levels in normoxia-exposed cells (figure 4a and b).

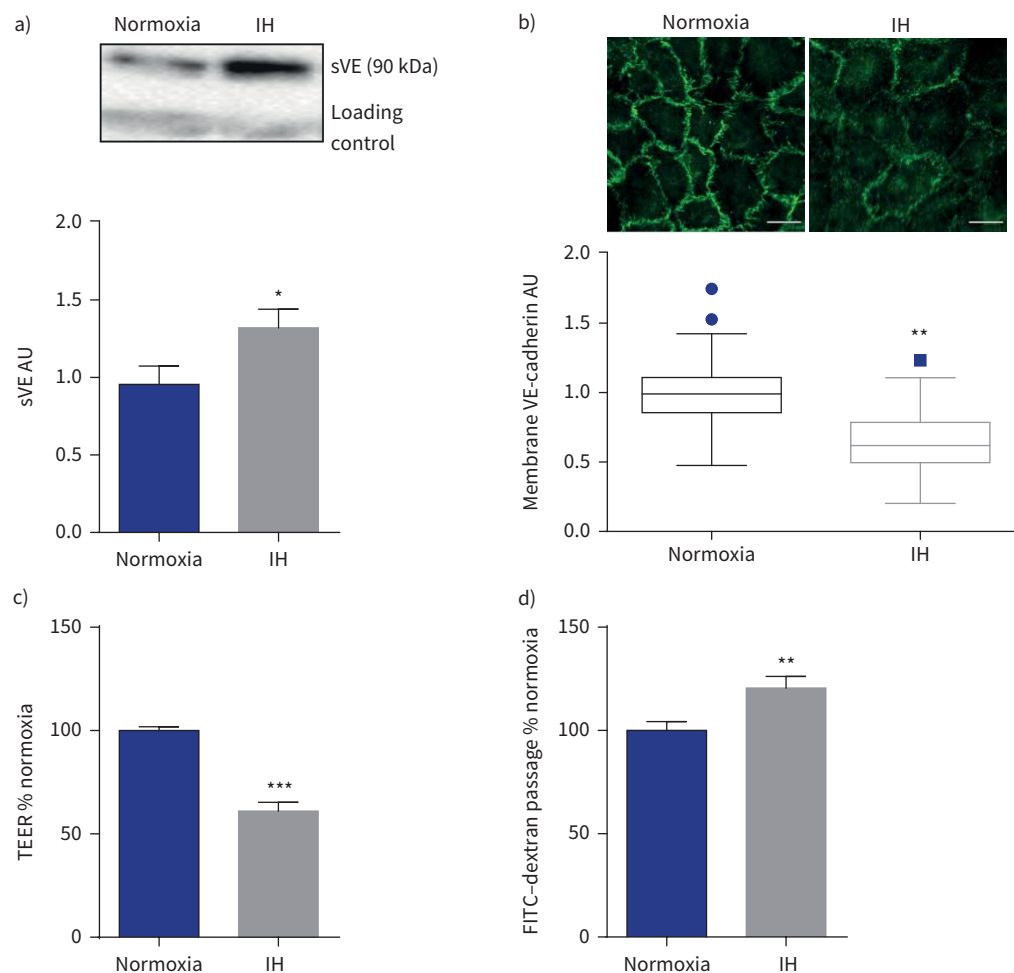


FIGURE 2 Intermittent hypoxia (IH) alters the endothelial barrier. sVE: soluble VE; TEER: transendothelial electrical resistance; FITC: fluorescein isothiocyanate. **a)** Representative example of Western blotting showing a more intense sVE band in the supernatant of human aortic endothelial cells exposed to IH than to normoxia (an immunoglobulin band was used as a loading control for normalisation) and quantification of sVE measured in cell supernatants after 6 h of IH. *: $p < 0.05$ versus normoxia; t-test, $n = 15$. **b)** Immunofluorescence and quantification of anti-VE-cadherin staining performed with an antibody directed against the VE-cadherin extracellular domain showed decreased expression at the membrane after IH. **: $p = 0.01$ versus normoxia; Mann-Whitney rank sum test, four independent experiments and 10–14 cells per experiment. Scale bar: 20 μm . **c)** Increase in endothelial permeability measured by TEER after 6 h of IH. ***: $p < 0.001$ versus normoxia; Welch test, 16 transwells from four independent experiments. **d)** Increase in endothelial permeability measured by FITC-dextran transendothelial flux (passage). **: $p < 0.01$ versus normoxia; Welch test, 33 transwells from 12 independent experiments. Data are presented as mean \pm SEM except for the Tukey plot in **b)** where data are presented as median and interquartile range due to nonnormality of data distribution.

Similarly, inhibition of HIF-1 activity by 2-methoxyestradiol or acriflavine totally prevented any effect of intermittent hypoxia on endothelial permeability and VE-cadherin cleavage (figure 4c and d).

Moreover, inhibition of the tyrosine kinase activity of the VEGF receptor by pazopanib or by using an anti-human VEGF blocking antibody both abolished the effects of intermittent hypoxia on endothelial permeability and VE-cadherin cleavage (figure 5a and b).

Finally, we investigated the role of the Src family tyrosine kinases in the effects induced by intermittent hypoxia. Genistein, a broad-spectrum inhibitor of tyrosine kinases, as well as PP2 and AZD0530 (saracatinib), two specific inhibitors of Src kinases, blocked the intermittent hypoxia-induced decrease in TEER and VE-cadherin cleavage (figure 5c and d).

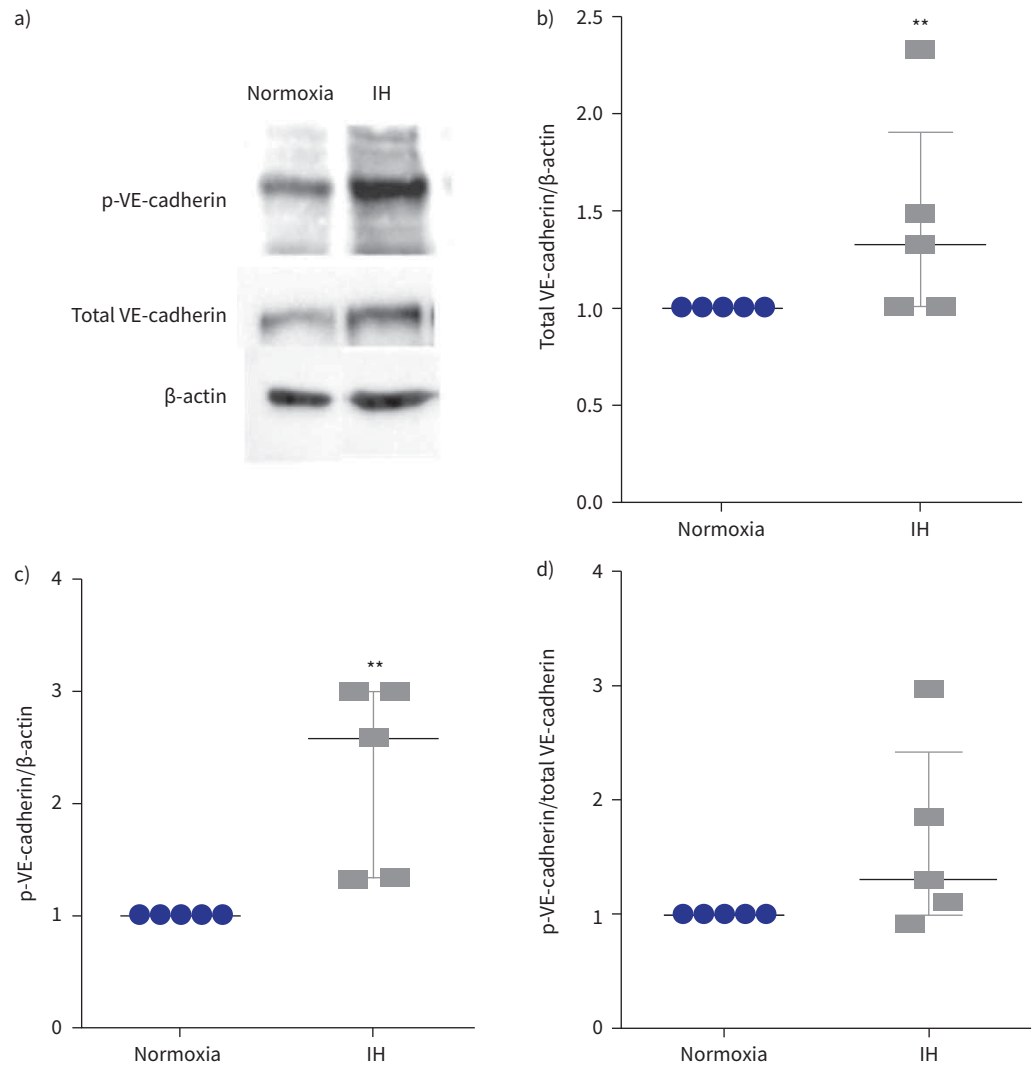


FIGURE 3 Expression and phosphorylation of tyrosine Y685 of VE-cadherin after intermittent hypoxia (IH). p: phosphorylated. **a)** Representative example of Western blotting showing a more intense p-VE-cadherin band in cell extracts of human aortic endothelial cells exposed to IH compared with normoxia. β -actin was used as a loading control for normalisation. **b)** Quantification of levels of total VE-cadherin normalised to β -actin measured in cell lysates. **: p<0.01 versus normoxia; Mann-Whitney test, n=5. **c)** Quantification of levels of p-VE-cadherin normalised to β -actin measured in cell lysates. **: p<0.01 versus normoxia; Mann-Whitney test, n=5. **d)** p-VE-cadherin/total VE-cadherin ratio. p=0.12; Mann-Whitney test, n=5. Data are presented as median and interquartile range.

Discussion

The present study investigates for the first time the cleavage of VE-cadherin in sleep apnoea patients and the specific involvement of the different intermittent hypoxia-activated pathways underlying the increase in endothelial permeability. We demonstrated an elevated level of sVE of both healthy volunteers without any confounders upon exposure to intermittent hypoxia and OSA patients without any known cardiovascular comorbidity. This elevation in serum sVE correlated with AHI and was reversed by CPAP treatment only in the OSA subgroup with high adherence. In cultured cells exposed to intermittent hypoxia, we demonstrated that signalling pathways classically involved in VE-cadherin cleavage (VEGF and Src family tyrosine kinase activation) as well as pathways known to be activated by intermittent hypoxia (ROS and HIF-1 signalling) are implicated in the intermittent hypoxia-induced endothelial barrier dysfunction.

The description of VE-cadherin cleavage in OSA patients due to intermittent hypoxia is original and new. In multivariate analysis, the range of increase in sVE levels in OSA is nearly 40%, which is certainly of

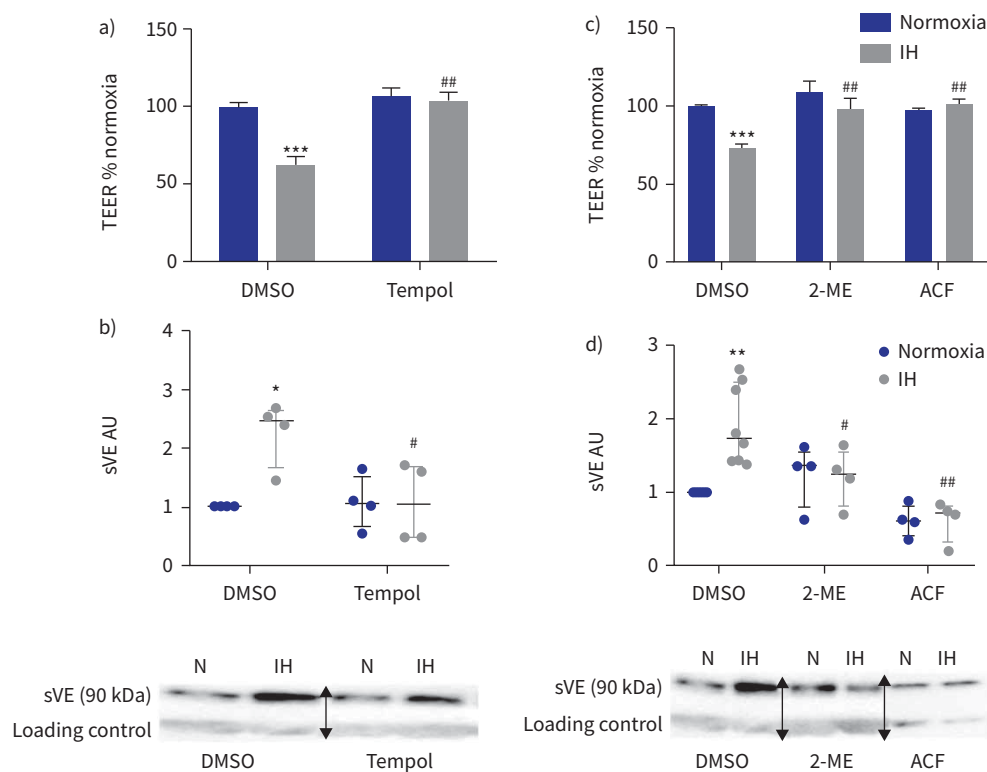


FIGURE 4 Impact of a reactive oxygen species scavenger (Tempol) and hypoxia-inducible factor (HIF)-1 inhibition on the endothelial barrier under intermittent hypoxia (IH) conditions. TEER: transendothelial electrical resistance; DMSO: dimethyl sulfoxide; sVE: soluble VE; 2-ME: 2-methoxyestradiol; ACF: acriflavine; HAEC: human aortic endothelial cell. **a)** Tempol (100 μ M) abolished the effect of IH on endothelial permeability assessed by TEER. ***: $p < 0.001$ versus normoxia+DMSO; ##: $p < 0.01$ versus IH+DMSO; two-way ANOVA, 16 transwells from four independent experiments. Data are presented as mean \pm SEM. **b)** Levels of sVE measured in supernatants of HAECs treated with Tempol. *: $p < 0.05$ versus normoxia+DMSO; #: $p < 0.05$ versus IH+DMSO; two-way ANOVA, $n = 4$. Data are presented as median and interquartile range. Below are shown representative examples of Western blotting showing a less intense sVE band in the supernatant of HAECs treated with IH+Tempol compared with IH+DMSO (an immunoglobulin band is used as a loading control for normalisation). N: normoxia. **c)** Inhibiting HIF-1 by 2-ME (1 μ M) or ACF (1 μ M) prevented the effect of IH on endothelial permeability assessed by TEER. ***: $p < 0.001$ versus normoxia+DMSO; ##: $p < 0.01$ versus IH+DMSO; two-way ANOVA, 16 independent transwells from four independent experiments. Data are presented as mean \pm SEM. **d)** Quantification of sVE levels measured in supernatants of HAECs treated with HIF-1 inhibitors. **: $p < 0.01$ versus normoxia+DMSO; ##: $p < 0.01$ and #: $p < 0.05$ versus IH+DMSO; two-way ANOVA, $n = 4$. Data are presented as median and interquartile range. Below are shown representative examples of Western blotting showing a less intense sVE band in the supernatant of HAECs treated with IH+HIF-1 inhibitors compared with IH+DMSO (an immunoglobulin band is used as a loading control for normalisation). N: normoxia. On Western blots, arrows indicate where images were grouped from different parts of the same gel or from different gels.

clinical relevance. The presence of sVE in serum is recognised as a marker of endothelial dysfunction in several cardiovascular and inflammatory diseases (for review, see [16]), including atherosclerosis [30]. VE-cadherin cleavage leads to the destabilisation of adherens junctions and increases endothelial permeability. This endothelial disorganisation and increased permeability is one of the early steps in the atherogenic process. In our clinical study, patients were free of known cardiovascular comorbidities often occurring with sleep apnoea and our results suggest that in this population sVE might represent an early biomarker revealing initiation of the endothelial dysfunction process. The impact of CPAP treatment on reducing incident late cardiovascular events is still debated and the majority of well-designed randomised controlled trials have been negative (for review, see [31]). Patients included in these trials exhibited prevalent cardiovascular disease and any benefit of CPAP intervention was limited by already existing irreversible lesions. Our results suggest that 6 months of CPAP treatment significantly decreases VE-cadherin cleavage in OSA patients, exerting a protective effect on endothelial function in patients at an

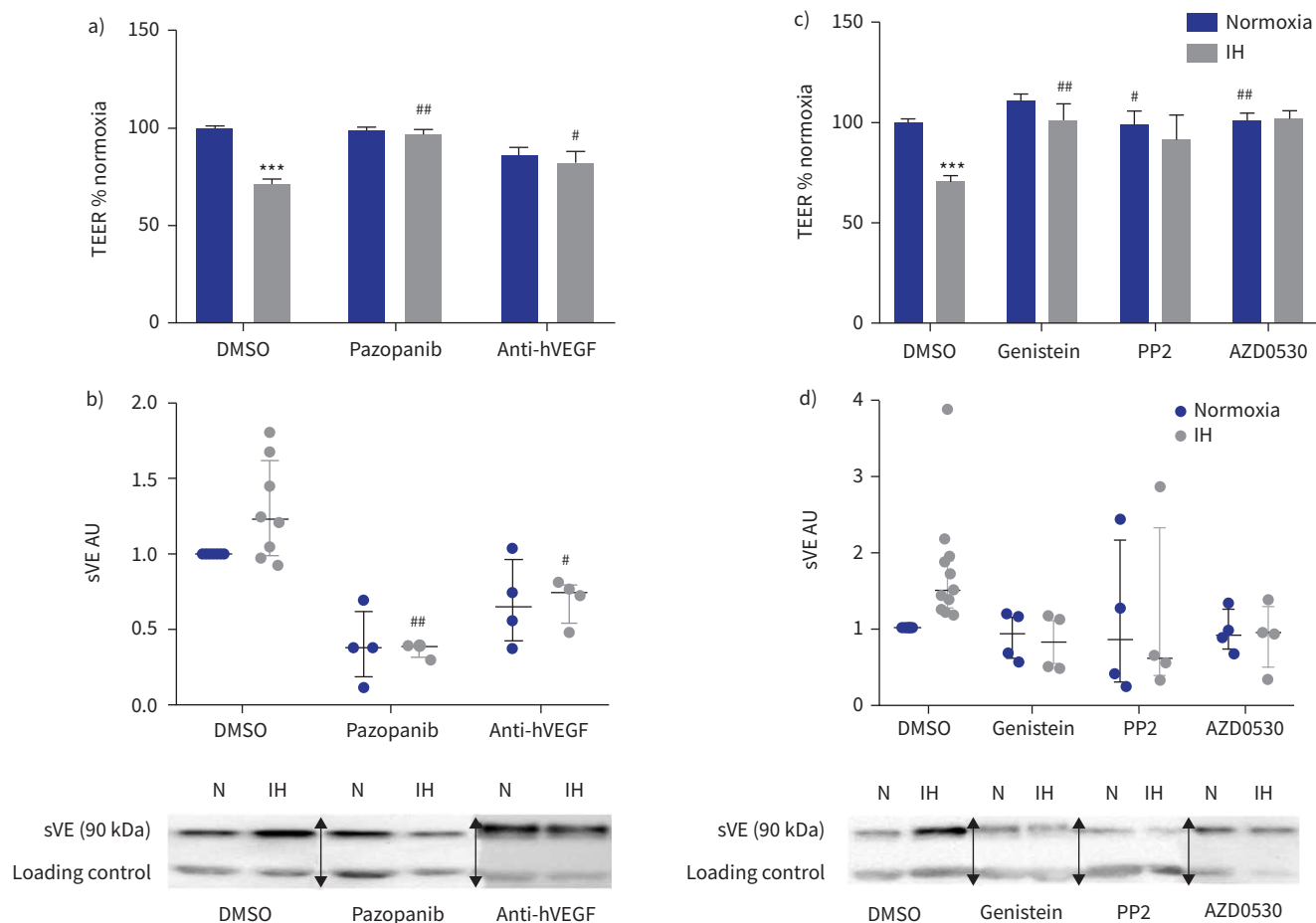


FIGURE 5 Impact of inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) signalling and tyrosine kinase inhibition on the endothelial barrier under intermittent hypoxia (IH) conditions. TEER: transendothelial electrical resistance; DMSO: dimethyl sulfoxide; h: human; sVE: soluble VE; HAEC: human aortic endothelial cell. **a)** Inhibiting VEGF receptor tyrosine kinases by pazopanib ($5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and blocking hVEGF by anti-hVEGF blocking antibody ($0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) prevented the effect of IH on endothelial permeability as assessed by TEER. ***: $p < 0.001$ versus normoxia+DMSO; **: $p < 0.01$ and #: $p < 0.05$ versus IH+DMSO; two-way ANOVA, 19 transwells from four independent experiments. Data are presented as mean \pm SEM. **b)** Quantification of levels of sVE measured in supernatants of HAECs treated with VEGF signalling inhibitors. **: $p < 0.01$ and #: $p < 0.05$ versus IH+DMSO; two-way ANOVA, $n=4$. Data are presented as median and interquartile range. Below are shown representative examples of Western blotting showing a less intense sVE band in the supernatant of HAECs treated with IH+VEGF signalling inhibitors compared with IH+DMSO (an immunoglobulin band is used as a loading control for normalisation). N: normoxia. **c)** Inhibiting tyrosine kinases by genistein ($30 \mu\text{M}$) and Src kinases by PP2 ($10 \mu\text{M}$) and AZD0530 (saracatinib, $1 \mu\text{M}$) prevented the effect of IH on endothelial permeability assessed by TEER. ***: $p < 0.001$ versus normoxia+DMSO; **: $p < 0.01$ and #: $p < 0.05$ versus IH+DMSO; two-way ANOVA, 16 transwells from at least four independent experiments. Data are presented as mean \pm SEM. **d)** Quantification of sVE levels measured in HAEC supernatants showing that treatment by tyrosine kinase inhibitors abolished the effect of IH on VE-cadherin cleavage. $n=4$. Data are presented as median and interquartile range. Below are shown representative examples of Western blotting showing a less intense sVE band in supernatants of HAECs treated with tyrosine kinase inhibitors+IH compared with DMSO+IH (an immunoglobulin band is used as a loading control for normalisation). N: normoxia. On Western blots, arrows indicate where images were grouped from different parts of the same gel or from different gels.

early stage of development of cardiovascular dysfunction. This is of major importance as the field is currently desperately seeking biomarkers to predict cardiovascular response to CPAP so as to personalise prescription [32].

OSA is characterised by intermittent hypoxia associated with sleep fragmentation and increased respiratory efforts during sleep. Among these components, our data suggest that intermittent hypoxia could be the main contributing factor involved in VE-cadherin cleavage. A model of exposure to intermittent hypoxia in healthy volunteers without any confounders robustly demonstrated an increase in sVE levels in sera. Despite a small number of participants, we were able to demonstrate a significant increase of sVE in a

paired analysis, indicating that this effect is homogeneous among patients and consistent with our hypotheses and the other *in vitro* and *in vivo* results. Accordingly, intermittent hypoxia applied to endothelial cells in culture also led to VE-cadherin cleavage. Although a previous publication suggested that membrane expression of VE-cadherin decreased after intermittent hypoxia in cultured human endothelial cells [9], the mechanism involved (*i.e.* internalisation or cleavage) was never investigated. We demonstrate for the first time that VE-cadherin is cleaved *in vivo* in OSA patients, as well as after intermittent hypoxia in cultured human endothelial cells, releasing a soluble fragment in cell supernatant as well as in patients' blood. Regarding the cascade of molecular mechanisms, in OSA patients multivariate analysis found that VEGF tended to be independently associated with sVE levels ($p=0.06$). These findings are in line with the known mechanisms of VE-cadherin cleavage after VEGF binding to its receptor [18] and support the hypothesis that VEGF, which is known to be elevated in OSA patients [6, 21, 22], may be a key cytokine signalling VE-cadherin cleavage. This was confirmed by the demonstration that both an anti-VEGF blocking antibody and an inhibitor of the tyrosine kinase activity of the VEGF receptor (pazopanib) prevented intermittent hypoxia-induced sVE release and endothelial permeability *in vitro*. Similarly, tyrosine kinase inhibitors, either nonspecific (genistein) or targeting the Src family tyrosine kinases (PP2 and saracatinib), were able to prevent intermittent hypoxia-initiated consequences. Finally, we showed that intermittent hypoxia induces an increase in VE-cadherin phosphorylation at the Y685 tyrosine, confirming that intermittent hypoxia activates the major signalling pathways leading to sVE release [15, 19].

Since VEGF is a target of the HIF-1 transcription factor, which is known to be activated in individuals with OSA as well as in murine models of intermittent hypoxia (for review, see [33]), we investigated the involvement of HIF-1 in our *in vitro* model. None of the currently available HIF-1 α inhibitors are truly specific. We thus used two different inhibitors, 2-methoxyestradiol (an HIF-1 inhibitor devoid of any oestrogenic activity) [34, 35] and acriflavine [36], to strengthen our approach and demonstrated that HIF-1 is involved in intermittent hypoxia-induced VE-cadherin cleavage.

Finally, in OSA and intermittent hypoxia, HIF-1 is stabilised and activated by repeated hypoxia-reoxygenation cycles and associated ROS production [33, 37]. We thus used a superoxide dismutase mimetic, Tempol, to demonstrate that ROS are indeed necessary for intermittent hypoxia-induced sVE release and endothelial permeability. Our results are consistent with results from MAKARENKO *et al.* [9] who showed that intermittent hypoxia-induced permeability and decrease of VE-cadherin membrane expression were dependent on ROS. Interestingly, beyond the known activation of HIF-1 by ROS, ROS have also been suggested as directly activating tyrosine kinases [28]. HIF-1-independent pathways may thus be involved in intermittent hypoxia effects on endothelial permeability. Similarly, we cannot exclude that other cytokines and pathways may lead to VE-cadherin cleavage in our model, such as TNF- α [15]. This needs to be explored in future studies.

To conclude, we demonstrated that intermittent hypoxia induces VE-cadherin cleavage at least partly mediated by ROS, HIF-1, VEGF and tyrosine kinase pathways. The sVE-cadherin fragment was found at elevated levels in healthy volunteers exposed to intermittent hypoxia as well as in OSA patients, and might provide an innovative biomarker of increased endothelial permeability and early stages of related disorders.

Acknowledgements: We thank Alison Foote (Grenoble Alpes University Hospital, Grenoble, France) for critical reading and English editing, and Meriem Benmerad (Grenoble Alpes University Hospital) for statistical analysis support.

Author contributions: A. Briançon-Marjollet, O. Harki, J-L. Pépin and I. Vilgrain conceived the study. R. Tamisier and J-L. Pépin recruited patients. O. Harki, B. Gonthier, A. Mahmani and A. Briançon-Marjollet performed the experiments. O. Harki, B. Gonthier, A. Mahmani, S. Bailly and A. Briançon-Marjollet analysed the data. O. Harki, A. Briançon-Marjollet, G. Faury and J-L. Pépin drafted the manuscript. All authors revised and approved the manuscript.

Conflict of interest: O. Harki has nothing to disclose. R. Tamisier reports grants, personal fees for lectures and other (travel grants) from Agiradom (Healthcare provider), grants and personal fees from ResMed, grants from Inspire, Navigant and Jazz Pharmaceuticals, personal fees for lectures from Elivie and Philips, outside the submitted work. J-L. Pépin reports grants and personal fees from Agiradom, AstraZeneca, Philips and ResMed, grants from Air Liquide Foundation, Fisher and Paykel, Mutualia, Vitalaire, Boehringer Ingelheim, Jazz Pharmaceuticals, Night Balance and Sefam, all outside the submitted work. S. Bailly has nothing to disclose. A. Mahmani has nothing to disclose. B. Gonthier has nothing to disclose. A. Salomon has nothing to disclose. I. Vilgrain has nothing to disclose. G. Faury has nothing to disclose. A. Briançon-Marjollet has nothing to disclose.

Support statement: This work was funded by University Grenoble Alpes, INSERM, Fondation Agir Pour les Maladies Chroniques (APMC), Fondation du Souffle and Fondation pour la Recherche en Santé Respiratoire (PhD grant for O. Harki), and Fondation de l'Avenir. J.-L. Pépin, S. Bailly and R. Tamisier are supported by the French National Research Agency in the framework of the "investissements d'avenir" programme (ANR-15-IDEX-02) and the "e-health and integrated care and trajectories medicine and MIAI artificial intelligence" Chairs of excellence from the Grenoble Alpes University Foundation. This work was partially supported by MIAI @ University Grenoble Alpes (ANR-19-P3IA-0003). Funding information for this article has been deposited with the Crossref Funder Registry.

References

- 1 Benjafield AV, Ayas NT, Eastwood PR, *et al.* Estimation of the global prevalence and burden of obstructive sleep apnoea: a literature-based analysis. *Lancet Respir Med* 2019; 7: 687–698.
- 2 Lévy P, Kohler M, McNicholas WT, *et al.* Obstructive sleep apnoea syndrome. *Nat Rev Dis Primer* 2015; 1: 15015.
- 3 Ryan S. Mechanisms of cardiovascular disease in obstructive sleep apnoea. *J Thorac Dis* 2018; 10: S4201–S4211.
- 4 Turnbull CD. Intermittent hypoxia, cardiovascular disease and obstructive sleep apnoea. *J Thorac Dis* 2018; 10: S33–S39.
- 5 Jelic S, Padeletti M, Kawut SM, *et al.* Inflammation, oxidative stress, and repair capacity of the vascular endothelium in obstructive sleep apnea. *Circulation* 2008; 117: 2270–2278.
- 6 Briançon-Marjollet A, Henri M, Pépin J-L, *et al.* Altered *in vitro* endothelial repair and monocyte migration in obstructive sleep apnea: implication of VEGF and CRP. *Sleep* 2014; 37: 1825–1832.
- 7 Arnaud C, Beguin PC, Lantuejoul S, *et al.* The inflammatory preatherosclerotic remodeling induced by intermittent hypoxia is attenuated by RANTES/CCL5 inhibition. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 184: 724–731.
- 8 Arnaud C, Bouyon S, Recoquillon S, *et al.* Nonmuscle myosin light chain kinase: a key player in intermittent hypoxia-induced vascular alterations. *J Am Heart Assoc* 2018; 7: e007893.
- 9 Makarenko VV, Usatyuk PV, Yuan G, *et al.* Intermittent hypoxia-induced endothelial barrier dysfunction requires ROS-dependent MAP kinase activation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2014; 306: C745–C752.
- 10 Zychowski KE, Sanchez B, Pedrosa RP, *et al.* Serum from obstructive sleep apnea patients induces inflammatory responses in coronary artery endothelial cells. *Atherosclerosis* 2016; 254: 59–66.
- 11 Gavard J. Endothelial permeability and VE-cadherin: a wacky comradeship. *Cell Adh Migr* 2014; 8: 158–164.
- 12 Liao F, Li Y, O'Connor W, *et al.* Monoclonal antibody to vascular endothelial-cadherin is a potent inhibitor of angiogenesis, tumor growth, and metastasis. *Cancer Res* 2000; 60: 6805–6810.
- 13 Kevil CG, Ohno N, Gute DC, *et al.* Role of cadherin internalization in hydrogen peroxide-mediated endothelial permeability. *Free Radic Biol Med* 1998; 24: 1015–1022.
- 14 Herren B, Levkau B, Raines EW, *et al.* Cleavage of beta-catenin and plakoglobin and shedding of VE-cadherin during endothelial apoptosis: evidence for a role for caspases and metalloproteinases. *Mol Biol Cell* 1998; 9: 1589–1601.
- 15 Sidibé A, Mannic T, Arboles M, *et al.* Soluble VE-cadherin in rheumatoid arthritis patients correlates with disease activity: evidence for tumor necrosis factor α -induced VE-cadherin cleavage. *Arthritis Rheum* 2012; 64: 77–87.
- 16 Blaise S, Polena H, Vilgrain I. Soluble vascular endothelial-cadherin and auto-antibodies to human vascular endothelial-cadherin in human diseases: two new biomarkers of endothelial dysfunction. *Vasc Med* 2015; 20: 557–565.
- 17 Rochefort P, Chabaud S, Pierga J-Y, *et al.* Soluble VE-cadherin in metastatic breast cancer: an independent prognostic factor for both progression-free survival and overall survival. *Br J Cancer* 2017; 116: 356–361.
- 18 Polena H, Creuzet J, Dufies M, *et al.* The tyrosine-kinase inhibitor sunitinib targets vascular endothelial (VE)-cadherin: a marker of response to antitumoural treatment in metastatic renal cell carcinoma. *Br J Cancer* 2018; 118: 1179–1188.
- 19 Wallez Y, Cand F, Cruzalegui F, *et al.* Src kinase phosphorylates vascular endothelial-cadherin in response to vascular endothelial growth factor: identification of tyrosine 685 as the unique target site. *Oncogene* 2007; 26: 1067–1077.
- 20 Wessel F, Winderlich M, Holm M, *et al.* Leukocyte extravasation and vascular permeability are each controlled *in vivo* by different tyrosine residues of VE-cadherin. *Nat Immunol* 2014; 15: 223–230.
- 21 Peled N, Shitrit D, Bendayan D, *et al.* Association of elevated levels of vascular endothelial growth factor in obstructive sleep apnea syndrome with patient age rather than with obstructive sleep apnea syndrome severity. *Respir Int Rev Thorac Dis* 2007; 74: 50–55.
- 22 Schulz R, Hummel C, Heinemann S, *et al.* Serum levels of vascular endothelial growth factor are elevated in patients with obstructive sleep apnea and severe nighttime hypoxia. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 67–70.
- 23 Kheirandish-Gozal L, Gozal D. Obstructive sleep apnea and inflammation: proof of concept based on two illustrative cytokines. *Int J Mol Sci* 2019; 20: 459.

- 24 Minoves M, Morand J, Perriot F, *et al.* An innovative intermittent hypoxia model for cell cultures allowing fast Po_2 oscillations with minimal gas consumption. *Am J Physiol Cell Physiol* 2017; 313: C460–C468.
- 25 Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, *et al.* Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 4604–4613.
- 26 Briançon-Marjollet A, Pépin JL, Weiss JW, *et al.* Intermittent hypoxia upregulates serum VEGF. *Sleep Med* 2014; 15: 1425–1426.
- 27 Gào X, Schöttker B. Reduction–oxidation pathways involved in cancer development: a systematic review of literature reviews. *Oncotarget* 2017; 8: 51888–51906.
- 28 Tamisier R, Gilmartin GS, Launois SH, *et al.* A new model of chronic intermittent hypoxia in humans: effect on ventilation, sleep, and blood pressure. *J Appl Physiol* 2009; 107: 17–24.
- 29 Tamisier R, Tan CO, Pepin J-L, *et al.* Blood pressure increases in OSA due to maintained neurovascular sympathetic transduction: impact of CPAP. *Sleep* 2015; 38: 1973–1980.
- 30 Soeki T, Tamura Y, Shinohara H, *et al.* Elevated concentration of soluble vascular endothelial cadherin is associated with coronary atherosclerosis. *Circ J* 2004; 68: 1–5.
- 31 Drager LF, McEvoy RD, Barbe F, *et al.* Sleep apnea and cardiovascular disease: lessons from recent trials and need for team science. *Circulation* 2017; 136: 1840–1850.
- 32 Sánchez-de-la-Torre M, Khalyfa A, Sánchez-de-la-Torre A, *et al.* Precision medicine in patients with resistant hypertension and obstructive sleep apnea: blood pressure response to continuous positive airway pressure treatment. *J Am Coll Cardiol.* 2015; 66: 1023–1032.
- 33 Belaidi E, Morand J, Gras E, *et al.* Targeting the ROS–HIF-1–endothelin axis as a therapeutic approach for the treatment of obstructive sleep apnea-related cardiovascular complications. *Pharmacol Ther* 2016; 168: 1–11.
- 34 Becker CM, Rohwer N, Funakoshi T, *et al.* 2-Methoxyestradiol inhibits hypoxia-inducible factor-1 α and suppresses growth of lesions in a mouse model of endometriosis. *Am J Pathol* 2008; 172: 534–544.
- 35 Escuin D, Kline ER, Giannakakou P. Both microtubule-stabilizing and microtubule-destabilizing drugs inhibit hypoxia-inducible factor-1 α accumulation and activity by disrupting microtubule function. *Cancer Res* 2005; 65: 9021–9028.
- 36 Lee K, Zhang H, Qian DZ, *et al.* Acriflavine inhibits HIF-1 dimerization, tumor growth, and vascularization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 17910–17915.
- 37 Semenza GL. Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Physiology* 2009; 24: 97–106.

Supplementary methods and data

Supplementary methods

Healthy volunteers exposed to fourteen nights of intermittent hypoxia

We used sera from a double-blind randomized cross-over study (ClinicalTrials.gov, Identifier: NCT02058823) performed in 12 healthy volunteers, to compare exposure to intermittent hypoxia and intermittent air. Intermittent hypoxia (IH) is obtained by delivering O₂ for 15 seconds every 2 minutes during sleep in a hypoxic tent, where subjects breathed hypoxic air with a 13% FiO₂, to create 30 cycles/hour [1]. Peripheral oxygen saturation range was 85-95%. Subjects were exposed during 8_9h/night, for 14 nights. Intermittent air (IA) is obtained by exposing subjects to the same air flow but sleeping in a normoxic (FiO₂ 21%) tent. Six volunteers were exposed to IH for 14 nights, followed by a wash-out period, and 14 nights of IA; while 6 volunteers were exposed to 14 nights IA first, and then to 14 nights in the 2nd period after the wash-out. Blood samples were collected from fasted volunteers in the morning, before and after 2 weeks of overnight exposure to IA or to IH, and stored at -80°C. Only seven out of the 12 volunteers completed the two periods of 14 nights and the blood collection, and were therefore included for sVE analysis. All participants provided written informed consent approved by the ethical committee Nord Ouest III (October 10th 2011, ref CPP 2011-32; EudraCT:[2010-020801-34](#)) and CNIL approval.

Chemical and inhibitors

We used 0.1% DMSO (as a vehicle control), 30µM genistein (a broad-spectrum tyrosine kinase inhibitor)[2], 10µM PP2 (a Src-kinase inhibitor)[2], 1µM saracatinib (AZD0530, a Src-kinase inhibitor) [3], 1µM 2-Methoxyestradiol (an HIF-1 inhibitor devoid of estrogen-like activity) [4, 5], 1µM acriflavine (an HIF-1 inhibitor)[6], 5µg/mL pazopanib (VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor) [7], 100µM Tempol (a superoxide dismutase mimetic ROS scavenger) [8, 9], which were all obtained from Sigma-Aldrich (Darmstadt, Germany). Mouse anti-hVEGF blocking antibody (0.5µg/mL) [10] was obtained from R&D Systems (Minneapolis, USA). The concentrations used were chosen according to the literature, and cell viability was verified after the treatment of HAEC cells (data not shown).

Cell culture and exposure to intermittent hypoxia

Cells were exposed to fast IH cycles using a recently developed device that mimics the hypoxia-reoxygenation cycles of OSAS patients, as previously described [11]. An IH cycle includes a 5 minute normoxia phase (16% O₂) followed by a 5 minute hypoxia phase (2% O₂). CO₂ was kept constant at 5%. Special plates with gas-permeable bottom membranes (Lumox™ 50mm dishes, Sarstedt, Nümbrecht, Germany; or Fluorcarbon Imaging 24-well Plates, Zell Kontakt, Gottmadingen, Germany) were coated with collagen I (0.2mg/mL, 1h at 37°C) before cell seeding. Cells exposed to IH were compared to control cells cultured at 16% constant oxygen level using the same device and same plates.

For permeability and FITC-dextran experiments, cells were cultured in permeable polystyrene membrane inserts (6.5mm diameter) with 0.4µm membrane pore size (Corning, Tewkesbury, USA) coated with collagen I (0.2mg/mL, 1h at 37°C). HAEC were seeded at 50x10³ cells per insert and proliferated for 3 days until they reached 100% confluence and formed a confluent monolayer with endothelial junctions before IH exposure.

For sVE detection, HAEC were seeded at 350 x 10³ cells per dish in 60mm-dishes coated with collagen I, and cultivated for 3 days to reach 100% confluence before IH exposure.

Western Blot

Cell pellets were lysed in lysis buffer (20 mM Tris HCl, 0.27M sucrose, 0.5% Triton, 1 mM dithiothreitol, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM Na₃VO₄, 25 µg/mL leupeptin, 1 µg/mL pepstatin A), centrifuged at 14,000g for 10 minutes at 4°C and the resulting supernatant was collected.

Sera or cell extracts were separated by 7% SDS-PAGE and transferred onto a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane using a Trans-Blot turbo transfer system. Membranes were incubated with a mouse monoclonal anti-VE-cadherin primary antibody (BV9 clone, 1µg/mL, Merck Millipore) or a rabbit anti-

phosphoY⁶⁸⁵-VE-cadherin antibody (1µg/mL, kindly provided by Dr I. Vilgrain), or a mouse anti-β actin primary antibody. After secondary antibody incubation, membranes were revealed by chemiluminescence using a ChemiDoc XRS⁺ imager system. PVDF membranes, transfer system, enhanced chemiluminescence detection reagents and the detection system were from Bio-Rad Laboratories (Marnes-la-Coquette, France). Bands were quantified by densitometry using ImageJ software.

Supplementary table S1 : Baseline characteristics of OSAS patients and controls. N=31 for control subjects and n=43 for OSA patients.

Variables	Control subjects	OSAS patients	P-value
Male sex, number (%)	23 (71.9)	38 (88.4)	0.13
Age (years) median [Q1;Q3]	51 [46.25; 59]	54.5 [48; 63]	0.21
BMI (kg/m ²) median [Q1;Q3]	24.2 [22.12; 26.12]	25.6 [23.72; 27.7]	0.02
sVE median [Q1;Q3]	0.52 [0.43 ; 0.92]	0.90 [0.57 ; 1.06]	<0.01
AHI (events/hour) median [Q1;Q3]	5.37 [3; 12.25]	33.06 [23.43; 45.45]	<0.01
SBP (mmHg) median [Q1;Q3]	121 [115.5; 128.5]	128.5 [117.25; 132.75]	0.1
DBP (mmHg) median [Q1;Q3]	75 [69.5; 78.5]	79 [75; 84]	0.02
VEGF (pg/mL) median [Q1;Q3]	237.2 [91.4; 408.3]	263.15 [137.3; 433.45]	0.41
CRP (mg/L)	0.9 [0.5; 1.4]	1.4 [0.7; 2.4]	0.07
Glycaemia (mmol) median [Q1;Q3]	4.8 [4.7; 5]	4.9 [4.7; 5.2]	0.18
Triglycerides (g/L)	0.8 [0.6; 1.2]	1.1 [0.8; 1.5]	0.04
Total cholesterol (g/L)	2 [1.8; 2.2]	2.2 [1.9; 2.5]	0.08

References

1. Tamisier R, Gilmartin GS, Launois SH, Pépin JL, Nespoulet H, Thomas R, Lévy P, Weiss JW. A new model of chronic intermittent hypoxia in humans: effect on ventilation, sleep, and blood pressure. *J. Appl. Physiol.* 2009; 107: 17–24.
2. Sidibé A, Mannic T, Arboleas M, Subileau M, Gulino-Debrac D, Bouillet L, Jan M, Vandhuick T, Le Loët X, Vittecoq O, Vilgrain I. Soluble VE-cadherin in rheumatoid arthritis patients correlates with

disease activity: evidence for tumor necrosis factor α -induced VE-cadherin cleavage. *Arthritis Rheum.* 2012; 64: 77–87.

3. Bruneau S, Datta D, Flaxenburg JA, Pal S, Briscoe DM. TRAF6 inhibits proangiogenic signals in endothelial cells and regulates the expression of vascular endothelial growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012; 419: 66–71.
4. Becker CM, Rohwer N, Funakoshi T, Cramer T, Bernhardt W, Birsner A, Folkman J, D'Amato RJ. 2-methoxyestradiol inhibits hypoxia-inducible factor-1 α and suppresses growth of lesions in a mouse model of endometriosis. *Am. J. Pathol.* 2008; 172: 534–544.
5. Escuin D, Kline ER, Giannakakou P. Both microtubule-stabilizing and microtubule-destabilizing drugs inhibit hypoxia-inducible factor-1 α accumulation and activity by disrupting microtubule function. *Cancer Res.* 2005; 65: 9021–9028.
6. Lee K, Zhang H, Qian DZ, Rey S, Liu JO, Semenza GL. Acriflavine inhibits HIF-1 dimerization, tumor growth, and vascularization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2009; 106: 17910–17915.
7. Xu F, Zhang L, Jia Y, Wang X, Li X, Wen Q, Zhang Y, Xu W. Discovery of 4-amino-2-(thio)phenol derivatives as novel protein kinase and angiogenesis inhibitors for the treatment of cancer: synthesis and biological evaluation. Part II. *Eur J Med Chem* 2013; 69: 191–200.
8. Ramond A, Godin-Ribuot D, Ribuot C, Totoson P, Koritchneva I, Cachot S, Levy P, Joyeux-Faure M. Oxidative stress mediates cardiac infarction aggravation induced by intermittent hypoxia. *Fundam Clin Pharmacol* 2013; 27: 252–261.
9. Du Y, Navab M, Shen M, Hill J, Pakbin P, Sioutas C, Hsiai T, Li R. Ambient ultrafine particles reduce endothelial nitric oxide production via S-glutathionylation of eNOS. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 436: 462–466.
10. Briançon-Marjollet A, Henri M, Pépin J-L, Lemarié E, Lévy P, Tamisier R. Altered in vitro endothelial repair and monocyte migration in obstructive sleep apnea: implication of VEGF and CRP. *Sleep* 2014; 37: 1825–1832.
11. Minoves M, Morand J, Perriot F, Chatard M, Gonthier B, Lemarié E, Menut J-B, Polak J, Pépin J-L, Godin-Ribuot D, Briançon-Marjollet A. An innovative intermittent hypoxia model for cell cultures allowing fast Po₂ oscillations with minimal gas consumption. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 2017; 313: C460–C468.

2.5. Notre réponse au commentaire publiée dans ERJ



EUROPEAN RESPIRATORY *journal*

FLAGSHIP SCIENTIFIC JOURNAL OF ERS

Early View

Correspondence

Soluble VE-cadherin: not just a marker of endothelial permeability

Olfa Harki, Gilles Faury, Isabelle Vilgrain, Jean-Louis Pépin, Anne Briançon-Marjollet

Please cite this article as: Harki O, Faury G, Vilgrain I, *et al.* Soluble VE-cadherin: not just a marker of endothelial permeability. *Eur Respir J* 2021; in press (<https://doi.org/10.1183/13993003.02629-2021>).

This manuscript has recently been accepted for publication in the *European Respiratory Journal*. It is published here in its accepted form prior to copyediting and typesetting by our production team. After these production processes are complete and the authors have approved the resulting proofs, the article will move to the latest issue of the ERJ online.

Copyright ©The authors 2021. For reproduction rights and permissions contact permissions@ersnet.org

Soluble VE-cadherin : not just a marker of endothelial permeability

Olfa Harki¹, Gilles Faury¹, Isabelle Vilgrain², Jean-Louis Pépin¹, Anne Briançon-Marjollet^{1*}

¹ Univ. Grenoble Alpes, INSERM, CHU Grenoble Alpes, HP2, 38000 Grenoble, France

² Univ. Grenoble Alpes, INSERM, CEA U1036, 38000 Grenoble, France

* Correspondance to:

Anne Briançon-Marjollet, anne.briancon@univ-grenoble-alpes.fr

+33 476 63 74 75

Conflict of Interests Disclosure : All authors declare that they have no conflict of interest

Dear editor,

We thank S.Q. Li and colleagues for their interest in our work¹ and comments allowing us to extend the knowledge gain from our data. Our experiments in cultured human endothelial cells have shown that intermittent hypoxia (IH) directly lead to increased endothelial VE-cadherin cleavage, increased sVE release and endothelial permeability, without involvement of systemic inflammatory processes. Endothelial permeability is a key event in early vascular alterations leading to remodeling and atherosclerosis and it is of crucial importance to decipher this initial process. Although endothelial adhesion markers were already studied in OSA patients^{2,3}, this is the first time to our knowledge that VE-cadherin regulation and its consequences in terms of endothelial permeability was addressed in OSA.

In our population consisting of relatively healthy OSA patients without comorbidities, there was no endothelial dysfunction as documented by normal peripheral arterial tonometry. We think that VE- cadherin might represent an early stage biomarker, detectable before the occurrence of cardiovascular complications related to endothelial dysfunction. We therefore agree with S.Q. Li et al. that future studies will be needed in larger cohorts -including more advanced stages or comorbidities- to determine whether sVE remain associated with patient endothelial dysfunction and its severity, as assessed by Peripheral Arterial Tone or Flow-Mediated Dilatation.

In our study we reported that 24h-systolic and -diastolic blood pressures were statistically associated with an increase in circulating sVE level ($p=0.0002$)¹. We found a correlation between

levels of 24h- SBP and sVE : slope = 0.02 CI95% [0.01;0.03] , intercept = -3.09 CI95% [-4.47; -1.72], $R^2 = 0.20$, p-value<0.01. Similar results were also obtained with 24h-DBP, suggesting a correlation between circulating sVE level and blood pressure as a key trigger for endothelial dysfunction.

As suggested by S.Q. Li et al., sVE could additionally be a marker of inflammation, which is itself related to endothelial permeability. It is indeed known that VE-cadherin can be cleaved after enhancement of TNF α signaling leading to sVE release and increased permeability^{4,5}. However, Sidibé et al. found no correlation between CRP and sVE in patients with rheumatoid arthritis at early stage (mean CRP = 6mg/L). Similarly, in our study, OSA patients presented only low burden of inflammation (mean usCRP=1.4mg/L) and there was no correlation between CRP and sVE levels (p=0.94 in univariate analysis). These results suggest that, at least in these cohorts with low inflammatory status, sVE release could mainly be a marker of permeability rather than a marker of inflammation.

We agree with the suggestion of S.Q. Li et al. that the functional role of sVE should be questioned in future studies. To date, this has been only sparsely studied. First, studies suggested that sVE can bind to full-length VE-cadherin expressed on endothelial cells to increase permeability⁴ or to modulate adhesion and angiogenesis⁶, suggesting that sVE may indeed have a functional role by interfering with full length VE-cadherin homophilic interaction. Second, it was shown that fibrin can also bind to the extracellular domain of VE-cadherin, thereby promoting the formation of capillary-like structures^{7,8}. Interestingly, fibrinogen seems to be elevated in OSA patients⁹. Circulating sVE could thus act as a competitor of the interaction of fibrin with the full-length VE-cadherin and thereby modulate endothelial cell dynamics.

Beside its role in cell-cell adhesion, Morini et al. showed that VE-cadherin triggers the expression of a set of genes involved in endothelial differentiation and vascular stabilization¹⁰. Whether sVE, by binding to the extracellular domain of VE-cadherin, could regulate gene expression remains an open question.

To conclude, we thank S.Q. Li et al. to have emphasized the potential importance of our data on VE- cadherin cleavage and sVE release in the cardiovascular consequences of OSA. Our first results suggest that, in relatively healthy OSA patients devoid of comorbidities, sVE could be related to early modifications of endothelial permeability without relation to inflammation. Future studies are needed to explore more precisely whether, in other OSA populations with comorbidities or higher systemic inflammation, sVE could be a biomarker and/or actor of inflammation participating in vascular dysfunction by modifying endothelial cell physiology.

References

1. Harki O, Tamisier R, Pépin J-L, et al. VE-Cadherin cleavage in sleep apnoea: new insights into intermittent hypoxia-related endothelial permeability. *Eur Respir J*. Published online May 6, 2021:2004518. doi:10.1183/13993003.04518-2020
2. Dyugovskaya L, Lavie P, Lavie L. Increased adhesion molecules expression and production of reactive oxygen species in leukocytes of sleep apnea patients. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;165(7):934-939. doi:10.1164/ajrccm.165.7.2104126
3. Jelic S, Padeletti M, Kawut SM, et al. Inflammation, oxidative stress, and repair capacity of the vascular endothelium in obstructive sleep apnea. *Circulation*. 2008;117(17):2270-2278. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.741512
4. Flemming S, Burkard N, Renschler M, et al. Soluble VE-cadherin is involved in endothelial barrier breakdown in systemic inflammation and sepsis. *Cardiovasc Res*. 2015;107(1):32-44. doi:10.1093/cvr/cvv144
5. Sidibé A, Mannic T, Arboleas M, et al. Soluble VE-cadherin in rheumatoid arthritis patients correlates with disease activity: evidence for tumor necrosis factor α -induced VE-cadherin cleavage. *Arthritis Rheum*. 2012;64(1):77-87. doi:10.1002/art.33336
6. Seo H-J, Lee S, Kim J-E, Jang J-H. Behavior of Human Umbilical Vein Endothelial Cells on Titanium Surfaces Functionalized with VE-Cadherin Extracellular 1-4 Domains. *Protein Pept Lett*. 2020;27(9):895-903. doi:10.2174/0929866527666200420103016
7. Martinez J, Ferber A, Bach TL, Yaen CH. Interaction of fibrin with VE-cadherin. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;936:386-405. doi:10.1111/j.1749-6632.2001.tb03524.x
8. Yakovlev S, Medved L. Interaction of fibrin(ogen) with the endothelial cell receptor VE-cadherin: localization of the fibrin-binding site within the third extracellular VE-cadherin domain. *Biochemistry*. 2009;48(23):5171-5179. doi:10.1021/bi900487d
9. Zolotoff C, Bertoletti L, Gozal D, et al. Obstructive Sleep Apnea, Hypercoagulability, and the Blood-Brain Barrier. *J Clin Med*. 2021;10(14):3099. doi:10.3390/jcm10143099
10. Morini MF, Giampietro C, Corada M, et al. VE-Cadherin-Mediated Epigenetic Regulation of Endothelial Gene Expression. *Circ Res*. 2018;122(2):231-245. doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.31239

2.6. Discussion

Nous avons démontré pour la première fois l'existence d'un fragment soluble de la VE-cadhérine détectable dans le sang des patients SAOS sans comorbidités, ainsi que dans le sang des volontaires sains exposés à l'hypoxie intermittente. Ce fragment soluble reflète un processus de clivage de la VE-cadhérine et par conséquent un stress vasculaire induit par l'hypoxie intermittente dans le SAOS. Dans la cohorte de patients SAOS étudiée, le taux élevé de sVE sérique a été corrélé avec l'AHI, et a été atténué par le traitement PPC notamment chez les patients les plus compliants.

La sVE sérique a été étudiée et suggérée comme biomarqueur d'un stress endothélial dans des maladies inflammatoires, dans le cancer (Polena et al., 2018; Rochefort et al., 2017) et aussi dans l'athérosclérose (Soeki et al., 2004). Dans le contexte de l'athérosclérose, la perméabilité endothéliale induite par le clivage de la VE-cadhérine pourrait initier le processus d'athérogenèse en facilitant l'infiltration des lipides et des molécules inflammatoires dans la paroi des vaisseaux. Dans notre étude clinique, les patients SAOS n'ayant pas de comorbidités cardiovasculaires avaient des taux élevés de sVE sérique. Ceci suggère que le taux sérique de sVE pourrait être un indicateur précoce d'une perméabilité endothéliale altérée qui serait à l'origine de l'initiation de l'athérosclérose. L'impact de la PPC sur les complications cardiovasculaires est limité en raison probablement de leurs caractères irréversibles à un stade avancé (Drager et al., 2017; McEvoy et al., 2016), d'où l'utilité d'un biomarqueur d'altérations endothéliales précoce qui permet de prédire le pronostic cardiovasculaire dans le SAOS. Dans notre cohorte de patients SAOS dépourvus de maladies cardiovasculaires, le traitement par la PPC a réduit le taux sérique de sVE, évoquant un effet correcteur de la dysfonction endothéliale à un stade précoce.

En utilisant un modèle expérimental *in vitro* d'hypoxie intermittente, nous avons démontré que le clivage de la VE-cadhérine est associé à une augmentation de la perméabilité endothéliale et implique des voies de signalisation qui peuvent dépendre de ROS, HIF-1, VEGF et des tyrosine kinases. Cependant, d'autres voies activées dans le SAOS, comme la voie NF- κ B/TNF- α , pourraient être impliquées dans le clivage de la VE-cadhérine (Sidibé et al., 2012).

Suite à notre publication dans le journal ERJ, le journal a publié une correspondance de Li SQ et al. (Li et al., 2021) qui répondaient à notre article en soulevant 3 points :

- Premièrement, dans notre cohorte de patients, il n'existe pas des corrélations entre la sVE et les paramètres cardiovasculaires, tels que la vasodilatation médiée par le flux (FMD) ou la tonicité artérielle périphérique (PAT), les biomarqueurs inflammatoires et métaboliques circulants ou la pression artérielle. Selon Li et al., ceci affaiblirait le message de notre étude que la sVE sérique est un biomarqueur de dysfonction endothéliale chez les patients SAOS.

- Deuxièmement, la sVE pourrait ne pas être un marqueur de perméabilité endothéliale mais plutôt un marqueur d'inflammation chez les patients SAOS. En effet, des niveaux sériques de sVE élevés ont été rapportés dans des maladies à composante inflammatoire telles que la polyarthrite rhumatoïde, la maladie de Behçet, le purpura de Henoch-Schönlein, la vascularite et dans le sepsis sévère (Blaise et al., 2015; Sidibé et al., 2012). Aussi, l'incubation de cellules endothéliales avec des cytokines inflammatoires telles que le TNF- α conduit à une augmentation significative de sVE (Sidibé et al., 2012). Puisque le SAOS est caractérisé par de l'inflammation et du stress oxydatif, il est donc possible que le taux élevé de sVE retrouvé dans notre cohorte soit plutôt un marqueur de l'inflammation et pas de perméabilité endothéliale.

- Troisièmement, les auteurs se demandent si la sVE pourrait avoir un effet physiopathologique. En effet, il a été démontré que la sVE perturbe la barrière endothéliale en interférant avec les interactions homophiliques des VE-cadhérines entières (Flemming et al., 2015).

Nous avons eu l'opportunité de répondre à cette correspondance dans ERJ :

- Concernant le premier point, notre cohorte de patients SAOS était relativement saine sans comorbidités cardiovasculaires et sans dysfonction endothéliale (valeurs de PAT normales). La sVE sérique pourrait être un biomarqueur précoce détectable avant l'apparition de complications cardiovasculaires liées à la dysfonction endothéliale. Des études chez des cohortes de patients avec comorbidités cardiovasculaires et avec dysfonction endothéliale sont nécessaires pour déterminer si des taux élevés de sVE sont associés à la dysfonction

endothéliale. Dans notre étude, la pression artérielle en tant que paramètre clé de dysfonction endothéliale était significativement associée au taux sérique de sVE ($p=0.0002$).

- Deuxièmement, la sVE pourrait être un marqueur de l'inflammation, qui est elle-même liée à la perméabilité endothéliale. En effet, le TNF- α peut activer le clivage de la VE-cadhérine conduisant à la libération de sVE et à une augmentation de perméabilité endothéliale (Flemming et al., 2015; Sidibé et al., 2012). Cependant, Sidibé et al. n'ont pas trouvé de corrélation entre la CRP et la sVE chez les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde à un stade précoce (CRP moyenne = 6 mg/L). De même, dans notre étude, les patients SAOS ne présentaient qu'une minime inflammation (moyenne usCRP = 1,4 mg/L) et l'analyse univariée n'a montré aucune corrélation entre les taux de usCRP et de sVE ($p = 0,94$). Ceci suggère que, au moins dans notre cohorte à faible niveau d'inflammation, la libération de sVE pourrait être un biomarqueur de perméabilité endothéliale accrue plutôt qu'un biomarqueur d'inflammation. Cependant, la sVE pourrait être aussi un marqueur d'inflammation dans des populations ayant une inflammation bien plus forte, comme c'est le cas dans la polyarthrite rhumatoïde par exemple.

- Troisièmement, le rôle physiologique de sVE est très peu étudié et devrait être investigué dans de futures recherches. Des études ont montré que la sVE peut se lier à la VE-cadhérine entière exprimée sur les cellules endothéliales et perturber l'intégrité des jonctions endothéliales (Flemming et al., 2015) ou moduler l'adhésion des cellules endothéliales de veines ombilicales humaines (HUVEC) et l'angiogenèse (Seo et al., 2020), suggérant que la sVE peut effectivement avoir un rôle fonctionnel en interférant avec les interactions homophiliques entre les protéines VE-cadhérine entières. De plus, Morini et al. ont montré que la VE-cadhérine déclenche l'expression d'un ensemble de gènes impliqués dans la différenciation endothéliale et la stabilisation vasculaire (Morini et al., 2018). La sVE, en perturbant les liaisons des VE-cadhérines entières, pourrait ainsi réguler l'expression des gènes ; mais ceci reste à démontrer.

Etude 2 : Etude de l'impact de l'inhibition du clivage de la VE-cadhérine sur l'athérosclérose induite par l'hypoxie intermittente

1. Objectifs

Les objectifs de cette étude sont :

- d'étudier *in vitro* l'effet de l'hypoxie intermittente ainsi que l'effet de l'inhibition des voies de signalisation du clivage de la VE-cadhérine sur le passage transendothélial des LDL et des monocytes, choisis comme modèles *in vitro* du processus d'athérogenèse.
- déterminer l'effet de blocage du clivage de la VE-cadhérine *in vivo* sur le remodelage vasculaire, l'athérosclérose et l'hypertension artérielle induits par l'hypoxie intermittente (figure 20).

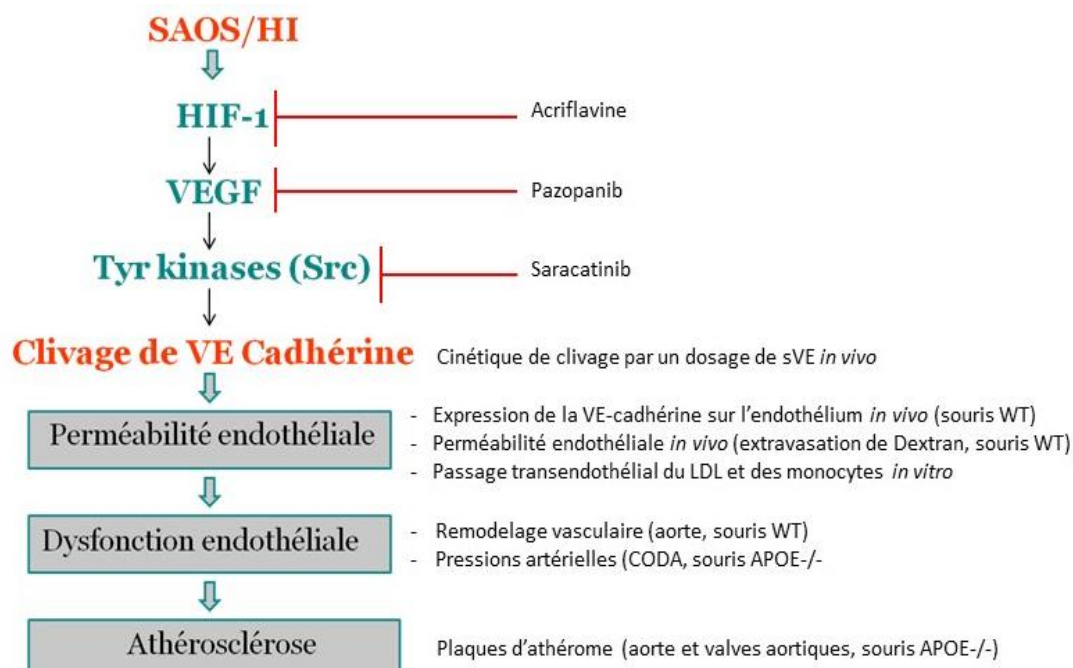


Figure 20: Protocole de l'étude de l'impact de l'inhibition du clivage de la VE-cadhérine sur l'athérosclérose induite par l'hypoxie intermittente

2. Matériel et méthodes

2.1. Inhibiteurs utilisés

Nous avons utilisé des inhibiteurs des voies de signalisation impliquées dans le clivage de la VE-cadhérine :

- L'acriflavine qui est un inhibiteur de HIF-1 (0.5 μ M *in vitro* et 3mg/kg/j *in vivo* en injection intrapéritonéale),
- Le pazopanib qui est un inhibiteur des tyrosine kinases des récepteurs du VEGF (5 μ g/mL *in vitro* et 30mg/kg/j *in vivo* en gavage).
- Le saracatinib ou AZD0530 comme un inhibiteur spécifique des Src-kinases (1 μ M *in vitro* et 20mg/kg/j *in vivo* en gavage).
- Un véhicule qui est le DMSO (0,1%) pour les expériences *in vitro*, du PBS pour les injections intrapéritonéales des souris, du PBS + 0.5% HPMC (hydroxypropylméthylcellulose) + 0.1% Tween 80 pour le gavage des souris.

2.2. Etude du passage transendothélial des LDL et des monocytes *in vitro*

Nous avons utilisé des cellules endothéliales aortiques humaines (HAEC) d'origine commerciale qui ont été soumises à des cycles d'hypoxie intermittente pendant 6 heures à l'aide du dispositif décrit dans la partie 1.1 de l'approche expérimentale. Nous avons utilisé des inserts (TransWells)ensemencés avec des HAEC et cultivés en normoxie (N) jusqu'à confluence puis exposés à l'hypoxie intermittente (HI). Nous avons rajouté des LDL fluorescents après 3h ou des monocytes THP-1 après 2h dans la chambre supérieure des transwells. À la fin de l'exposition (6h d'HI au total), nous avons mesuré dans la chambre inférieure la fluorescence du LDL ou le nombre de monocytes qui ont traversé la monocouche endothéliale (protocoles détaillés en annexe 5 et annexe 6).

2.3. Etude de la régulation de la VE-cadhérine par l'HI *in vivo*

Le fragment extracellulaire clivé de la VE-cadhérine, sVE, a été dosé dans le plasma des souris de phénotype sauvage (WT), âgées de 12 semaines, après 14 jours d'exposition à l'HI à l'aide du dispositif décrit dans la partie 1.2 de l'approche expérimentale. Le plasma a été dilué à 1/25^{ème} et analysé par western blot en utilisant un anticorps primaire monoclonal anti-

VE-cadhérine murine (Clone 11D4.1) dirigé contre la VE-cadhérine de souris (CD144) (protocole détaillé dans l'article prêt à soumettre inséré ci-après).

La VE-cadhérine entière ancrée dans l'endothélium a été analysée sur des cryocoupes d'aortes thoraciques issues des mêmes souris WT par immunofluorescence en utilisant le même anticorps primaire monoclonal anti-VE-cadhérine murine (Clone 11D4.1) dirigé contre la VE-cadhérine de souris (CD144). Les coupes d'aortes n'ont pas été perméabilisées ce qui garantit une spécificité pour le domaine extracellulaire de la VE-Cadhérine (protocole détaillé en annexe 9).

2.4. Etude du remodelage vasculaire *in vivo*

L'épaisseur intima-média ainsi que la structure des fibres élastiques ont été étudiées, respectivement, par une coloration d'hématoxyline-éosine ou une coloration Weigert sur des cryocoupes d'aortes thoraciques issues des souris C57Bl/6 sauvages (WT) après 14 jours d'exposition à l'HI. Quatre à cinq zones non-contiguës de l'aorte ont été analysées pour chaque souris et une moyenne a été calculée.

2.5. Etude des lésions d'athérosclérose *in vivo*

Des souris ApoE^{-/-} âgées de 12 semaines ont été exposées pendant 8 semaines à l'HI à l'aide du dispositif décrit dans la partie 1.2 de l'approche expérimentale. La taille des plaques a été analysée par la méthode Oil Red O sur l'aorte entière et sur les valves aortiques, puis quantifiée à l'aide du logiciel d'analyse d'image (image J) et exprimée par rapport à l'aire totale de l'aorte ou des valves aortiques (protocoles détaillés en annexe 7 et annexe 8).

2.6. Mesure des pressions artérielles *in vivo*

Les pressions artérielles (systolique, diastolique et moyenne) ont été mesurées par sphygmomanométrie à la queue à l'aide d'un appareil CODA chez les souris ApoE^{-/-} vigiles après 8 semaines d'exposition à l'hypoxie intermittente. Les souris ont été acclimatées à l'appareil CODA deux fois par jour pendant 3 jours consécutifs avant la mesure finale.

3. Résultats obtenus

3.1. Passage transendothélial des LDL et des monocytes *in vitro*

Nous avons démontré que l'HI augmente le passage transendothélial des LDL de 37 % et des monocytes de 78 %, *in vitro* à travers une monocouche de cellules endothéliales en culture. Le traitement par un inhibiteur de HIF-1 (l'acriflavine), un inhibiteur des tyrosine-kinases du VEGFR (le pazopanib) et un inhibiteur des Src-kinases (le saracatinib) a aboli l'effet de l'HI.

3.2. Régulation de la VE-cadhérine par l'HI *in vivo*

L'HI active le clivage de la VE-cadhérine au bout de 14 jours chez des souris C57Bl/6 WT. En effet, nous avons observé 65% d'augmentation de la concentration de sVE dans les plasmas des souris HI par rapport aux souris N. En parallèle, cet effet est associé à une déplétion, de même ordre de grandeur, de l'expression de la VE-cadhérine sur l'endothélium de l'aorte thoracique. Le traitement des souris par l'acriflavine, le pazopanib et le saracatinib prévient le clivage de la VE-cadhérine induit par l'HI, évalué par mesure de la sVE plasmatique.

3.3. Effet de l'inhibition du clivage de la VE-cadhérine sur le remodelage vasculaire *in vivo*

Chez les souris C57Bl/6 WT exposées pendant 14 jours à l'HI, l'augmentation de l'épaisseur intima-média due à l'HI est corrigée par les 3 inhibiteurs testés. Concernant la fragmentation des fibres élastiques induite par l'HI, l'acriflavine et le saracatinib corrigent également les effets de l'HI, mais pas le pazopanib.

3.4. Effet de l'inhibition du clivage de la VE-cadhérine sur l'athérosclérose *in vivo*

Chez des souris ApoE^{-/-} exposées pendant 8 semaines à l'HI, la taille des plaques d'athérome augmente par rapport aux souris exposées en N. Les 3 inhibiteurs utilisés ont réduit ces lésions au niveau de l'aorte. Au niveau des valves aortiques, les lésions d'athérosclérose tendent à augmenter en HI, mais cet effet n'est pas statistiquement significatif. Cependant, tous les inhibiteurs réduisaient la taille des plaques d'athérome.

L'analyse du cholestérol total plasmatique chez ces souris n'a montré aucune différence significative entre les groupes, suggérant que l'effet des inhibiteurs sur la réduction des plaques n'est pas dû à une régulation du cholestérol sanguin.

3.5. Effet de l'inhibition du clivage de la VE-cadhérine sur la pression artérielle *in vivo*

La pression artérielle a été mesurée chez les souris ApoE^{-/-} après 8 semaines d'exposition à l'HI. Nous avons observé une normalisation significative de la pression sanguine (systolique, diastolique et moyenne) par les inhibiteurs des tyrosine-kinases (pazopanib et saracatinib). Cependant, l'inhibiteur de HIF-1, l'acriflavine, tend seulement à corriger l'effet de l'HI sur la pression artérielle mais n'atteint pas le seuil de significativité.

4. L'article prêt à soumettre

The inhibition of VE-cadherin cleavage prevents atherosclerosis induced by intermittent hypoxia in mice

Olfa Harki¹, Sophie Bouyon¹, Emeline Lemarié¹, Alexandra Demory¹, Carole Chirica², Isabelle Vilgrain³, Jean-Louis Pépin¹, Gilles Faury¹, Anne Briançon-Marjollet¹

¹Université Grenoble Alpes, INSERM U1300, CHU Grenoble Alpes, Laboratoire HP2, Grenoble, France. ²Unité Biochimie Immunoanalyse, Service de Biochimie SB2TE, CHU Grenoble Alpes.

³Université Grenoble Alpes, INSERM U1036, CEA, Grenoble, France.

Corresponding author: olfa.harki@univ-grenoble-alpes.fr

Short title: VE-cadherin as a new anti-atherogenic target in sleep apnea syndrome

Abstract

Rationale: Intermittent hypoxia (IH), a major component of Obstructive Sleep Apnea syndrome (OSAS), induces atherosclerosis. We recently demonstrated that vascular endothelial cadherin (VE-cadherin) cleavage, releasing a soluble fragment (sVE), is increased in OSAS patient sera and in the medium of cultured endothelial cells exposed to IH. This cleavage is mediated by HIF-1, VEGF and Src kinases signaling pathways and results in an increased endothelial permeability which is an early step of atherogenesis.

Objective: Our aim is to determine whether blocking VE-cadherin cleavage *in vivo* could be a strategy to inhibit IH-induced atherogenesis in mice.

Methods: Human Aortic Endothelial Cells were exposed to IH for 6 hours and treated by tyrosine-kinases inhibitors (Saracatinib, Pazopanib), a HIF-1 inhibitor (Acriflavine) or no inhibitor, then transendothelial passage of LDL and THP-1 monocytes was compared between the different conditions. VE-cadherin regulation, vascular remodeling, atherosclerotic lesions and arterial pressures were studied in IH-exposed C57Bl/6 or ApoE^{-/-} mice treated with the same inhibitors.

Results: In our cellular model, LDL passage and monocytes migration increased after IH and were reversed by all the pharmacological inhibitors tested. In C57Bl/6 mice, 14 days of IH increased sVE plasma level by about 65% and likewise decreased VE-cadherin expression in the aorta endothelium. IH increased aortic intima-media thickness and elastic fiber alteration, and this effect was reversed by acriflavine, pazopanib and/or saracatinib treatments. IH also increased atherosclerotic plaques and arterial pressure in ApoE^{-/-} mice after 8 weeks of exposure. This effect was blocked by the inhibitors of VE-cadherin cleavage signaling pathway.

Conclusion: Blocking VE-cadherin cleavage prevents arterial remodeling *in vivo*, as well as atherogenic mechanisms *in vitro* and atherosclerotic plaques *in vivo*, which suggest that VE-cadherin could be a target to a new anti-atherogenesis strategy and a promising tool to prevent cardiovascular complications associated to OSAS.

Author contributions: ABM, OH, JLP, IV and GF conceived the study, OH, SB, EL, CC and AD performed the experiments, OH, SB, EL and ABM analyzed the data, OH, ABM, GF and JLP drafted the manuscript, all authors revised and approved the manuscript.

Introduction

Cardiovascular diseases are a real public health issue leading to a high global mortality and disability, especially in elderly people¹. Among risk factors for cardiovascular diseases, Obstructive Sleep Apnea Syndrome (OSAS, characterized by numerous breathing interruptions during sleep) is one of the most frequent chronic disease affecting near one billion persons worldwide², associated with an increased risk of atherosclerosis and myocardial infarction, and thus represents a high burden for patients and the society³. The gold standard treatment for OSAS is the application of Continuous Positive Airway Pressure (CPAP) which improves both symptoms and quality of life of OSAS patients, but has a limited impact on late cardiovascular events, such as cardiac infarct or stroke⁴. Thus, the modern conception of OSAS treatment is to combine CPAP with new therapeutic approaches which require the identification of the mechanisms leading to the cardiovascular consequences of OSAS.

OSAS is characterized by intermittent hypoxia (IH) which is the main feature leading to cardiovascular complications. The link between OSAS/IH and the structural and functional impairment of vascular endothelium has been well established in both patients and animal models. Indeed, IH induces various mechanisms such as oxidative stress, activation of Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1), chronic inflammation and sympathetic activation that, in turn, lead to endothelial dysfunction, hypertension, vascular remodeling and atherosclerosis^{3,5,6}.

The integrity of the vascular endothelium is regulated, among other proteins, by vascular endothelial cadherin (VE-cadherin) which is considered to be the major protein of the endothelial adherens junctions. VE-cadherin undergoes cleavage of its extracellular domain which then becomes soluble (sVE) and detectable in the blood of patients affected by OSAS, rheumatoid arthritis or some cancers, suggesting its potential as a biomarker in these

pathologies⁷⁻⁹. VE-cadherin cleavage is activated after phosphorylation of a tyrosine residue in response to different circulating factors like VEGF and TNF- α ^{8,9}. We recently demonstrated that IH induces the cleavage process through pathways that could involve ROS, HIF-1, VEGF and tyrosine kinases, particularly src-kinases, and is associated with elevated endothelial permeability *in vitro*⁷. Actually, endothelial hyperpermeability, which is a crucial and early step in atherogenesis, could facilitate transendothelial lipid flux and inflammatory molecules migration across the endothelium¹⁰. However, the regulation of endothelial integrity and permeability as a major contributor to the early atherogenesis has only been sparsely studied in OSAS patients and experimental models of IH, such as in rodents¹¹ or cell cultures^{7,12,13} so far.

We hypothesize that IH could increase endothelial permeability *in vivo* through its favoring action on VE-cadherin cleavage, therefore enhancing transendothelial flux of proatherogenic molecules and leading to early atherosclerotic lesions.

Thus, our objective was to use both cellular and rodent models to investigate whether IH-induced VE-cadherin cleavage and endothelial permeability could participate in the atherogenesis process. We hypothesized that blocking VE-cadherin cleavage with pharmacological inhibitors could inhibit IH-induced vascular remodeling and atherosclerotic plaques development.

MATERIAL AND METHODS

Cell culture

Cryopreserved primary human aortic endothelial cells (HAoEC, Thermo Fisher Scientific C0065C, Waltham, USA) were used before their 8th passage. Cells were seeded at a density of 1.6×10^4 cells/cm² and cultured (at 37°C, 5% CO₂) in M200 medium (Thermo Scientific M200500, Waltham, USA) supplemented with Large Vessel Endothelial Supplement LVES (Thermo Scientific A1460801, Waltham, USA) and penicillin/streptomycin according to the supplier's recommendations.

Monocytes from the THP-1 human cell line were kindly provided by Dr. Fabienne Burger (Cardiology division, Geneva University Hospitals). They were maintained in RPMI medium, supplemented with 25mM HEPES, 10% fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin/streptomycin and 0.1% fungizone, at 37°C and 5% CO₂.

All cell culture reagents were purchased from Gibco Thermo Fisher Scientific (Illkirch, France).

Intermittent Hypoxia exposure of cells

Cells were exposed for 6 hours to fast IH cycles using a device that mimics the hypoxia-reoxygenation cycles of OSAS patients, as previously described¹⁴. An IH cycle includes a 5-minute normoxia (N) phase (16% O₂) followed by a 5-minute hypoxia phase (2% O₂).

Chemical and inhibitors

For cellular experiments, we used 1μM saracatinib (AZD0530, a Src-kinase inhibitor), 0.5μM acriflavine (an HIF-1 inhibitor), 5μg/mL pazopanib (VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor) solubilized in DMSO before addition to the cells. For control experiments, the same volume of DMSO alone was added to the cells to reach a final DMSO concentration of 0.1%. Acriflavine and pazopanib were all obtained from Sigma-Aldrich (references, respectively are: A8126-25G and 9005-65-6, Darmstadt, Germany), saracatinib was obtained from AdooQ BioScience (reference: A10108, California, USA). The concentrations used were chosen according to the literature, and cell viability was verified after the treatment of HAEC cells as described previously⁷.

***In vitro* LDL transendothelial passage assay**

HAoEC were seeded at a density of 5 x 10⁴ cells/well in transwells (permeable polystyrene membrane inserts, 6.5 mm diameter, 8 μm membrane pore size, Corning (Sigma-Aldrich CLS3422-48EA, Darmstadt, Germany) coated with 0.2 mg/mL type I collagen (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) in M200 medium supplemented with LVES and penicillin/streptomycin. After three days of incubation at 37°C and 5% CO₂, the transwells were transferred to 24-well plates with a gas-permeable bottom (Fluorocarbon Imaging plates, Zell-Kontakt, Hardenberg, Germany). Inhibitors were diluted in M200 medium and

added into the upper chamber of the transwells, M200 medium was added to the lower chamber. Transwells were exposed to IH or N for 3 hours. Then, 10 µg/mL of fluorescent labelled-LDL (FL-LDL, Invitrogen, Waltham, USA) was added into the upper chamber of the transwells and cells were re-incubated again in the IH device for an additional 3 hours. Finally, media from the lower chamber of each transwell were collected and the quantity of FL-LDL was quantified using fluorescence detection according to the supplier's recommendations. Values were normalized using the mean of normoxic control duplicates.

***In vitro* monocyte transendothelial migration assay**

HAoEC were seeded at a density of 5×10^4 cells/well in transwells (permeable polystyrene membrane inserts, 6.5 mm diameter, 8 µm membrane pore size, Corning) coated with 0.2 mg/mL type I collagen (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) in M200 medium supplemented with LVES and penicillin/streptomycin. After three days of incubation at 37°C and 5% CO₂, the transwells were transferred to 24-well plates with a gas-permeable bottom (Fluorocarbon Imaging plates, Zell-Kontakt, Hardenberg, Germany). The upper and lower chambers of the transwells were filled, respectively, with 200µl and 600µl of M200 medium and exposed to IH or N for 2 hours. Then, 6×10^5 THP1 monocytes, diluted in 200 µl M200 medium, were added to the upper chamber of the transwells and 100 ng/mL of MCP1 (monocyte chemoattractant protein 1, R&D Systems) was added to the lower chamber. Transwells were re-incubated for an additional 4 hours in the IH device. Then, monocytes which had migrated in the lower chamber of the transwells were concentrated in 50µl of M200 medium and counted using a Neubauer counting chamber. Values were normalized using the mean of normoxic control transwells.

Animals

We assessed vascular remodeling in 72 wild type C57BL/6 mice (male, age=12 weeks, weight= 26-27 g) purchased from Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France), and used 61 ApoE^{-/-} mice (C57BL/6 background, male, age=12±1 weeks, weight= 24-26 g) bred in our local animal facility to study atherosclerotic lesions. All mice were fed on a standard diet and were weighed every week of exposure to IH. All the experiments were conducted in accordance with the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used

for Experimental and Other Scientific Purposes (Council of Europe, European Treaties ETS 123, Strasbourg, 18 March 1986), and to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publication No. 85-23, revised 1996). Our project was approved by the local ethical committee and the French Ministry of Research (APAFIS#22190-2019072615145639). Animals were housed in a local facility (at 20-22°C) and had free access to food and water.

Exposure to intermittent hypoxia

Wild type (WT) C57Bl/6 mice were exposed to IH or N for 2 weeks, while ApoE^{-/-} mice were exposed for 8 weeks. The fraction of inspired oxygen (FiO₂) in cages was monitored with a gas analyzer throughout the experiments. Intermittent hypoxia was generated by intermittent injection of low oxygen air in the cages, with 1-minute cycles (30 seconds at 5% FiO₂, 30 seconds at 21% FiO₂ in the cages) repeated for 8 hours/day (from 8:00am to 4:00pm). Normoxic mice were exposed to the same air flow turbulences and noises as IH mice. The effect of IH was checked by measuring HIF-1 expression by immunofluorescence on aorta cryosections (Supplementary data 1).

Treatment of mice with VE-cadherin cleavage inhibitors

wild type C57Bl/6 mice were randomly distributed into 8 groups. Two groups were treated daily with vehicle for the two weeks of exposure: G1 is the normoxic control (N+vehicule, n=16) and G2 is the hypoxic control (IH+vehicule, n=16). In both of these two control groups, 8 mice were treated by oral gavage and 8 mice were treated by intraperitoneal injection, because our pharmacological treatments use these 2 different routes. During the 2 weeks of IH exposure, acriflavine solubilized in PBS (Sigma-Aldrich A8126-25G, Darmstadt, Germany) was administered by daily intraperitoneal injection, while pazopanib (Sigma-Aldrich 444731-52-6, Darmstadt, Germany) and saracatinib (AdooQ BioScience A10108, California, USA), both solubilized in PBS, 0.5% HPMC (hydroxypropylmethylcellulose), 0.1% Tween 80, were administered by daily oral gavage. The groups treated by inhibitors are: G3 exposed to N and treated by 3mg/kg/day acriflavine (N+ACF, n=8), G4 exposed to IH and treated by 3mg/kg/day acriflavine (IH+ACF, n=8), G5 exposed to N and treated by 30mg/kg/day pazopanib (N+pazopanib, n=8), G6

exposed to IH and treated by 30mg/kg/day pazopanib (IH+pazopanib, n=8), G7 exposed to N and treated by 20mg/kg/day saracatinib (N+saracatinib, n=8), G8 exposed to IH and treated by 20mg/kg/day saracatinib (IH+ saracatinib, n=8). Similarly, ApoE^{-/-} mice were randomly distributed to the same groups, including only 12 animals per control vehicle group (N and IH) and 6 animals per inhibitor-treated group. ApoE^{-/-} mice were treated by using the same routes and doses for each inhibitor as those used for wild-type C57Bl/6 animals, during the 8 weeks of IH exposure (5 days per week).

In some groups, the final number of animals for which data were collected is less than the initial number because of some animal deaths during exposure.

Specimen collection

At the end of the period of exposure to N or IH, the animals were anesthetized by an intraperitoneal injection of ketamine-xylazine (100mg/kg-10mg/kg). Hematocrit was measured (supplementary data 2 et 3), blood was collected by cardiac puncture in heparin tubes. After a cardiac perfusion with PBS, aortas, carotids and aortic roots of WT C57Bl/6 mice were harvested and stored at -80°C until analysis. The entire aortas of ApoE^{-/-} mice were harvested and instantly fixed with 2% paraformaldehyde for 24 hours, then saved in PBS at 4°C until Oil Red-O staining.

sVE semi-quantitative dosage by western blot

Plasma from WT C57Bl/6 mice were diluted 1:25 in PBS and analyzed by western-blotting. Proteins were separated by 8% SDS-PAGE and transferred onto a nitrocellulose membrane using a Trans-Blot turbo transfer system. Membranes were incubated with a rat anti-mouse CD144 (VE-cadherin) primary antibody (Clone 11D4.1, 0.25µg/mL, BD Biosciences 550548, New Jersey, USA). After a rabbit anti-rat secondary antibody incubation (Abcam ab6734, Cambridge, United Kingdom), membranes were revealed by chemiluminescence using a ChemiDoc XRS+ imager system. Nitrocellulose membranes, transfer system, enhanced chemiluminescence detection reagents and the detection system were from Bio-Rad Laboratories (Marnes-la-Coquette, France). Bands were quantified by densitometry

using the ImageJ software. We also dosed sVE in 6 plasma samples from a pilot experiment including only N/IH vehicle-treated mice.

Immunofluorescence

Thoracic aorta cryosections (thickness: 10 μm) from WT C57Bl/6 mice were used for immunofluorescence. Cryosections were fixed in 4% paraformaldehyde. Non-specific binding was blocked with 10% goat serum in PBS. Sections were incubated overnight at 4°C with a rat anti-mouse CD144 primary antibody (Clone 11D4.1, 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, BD Biosciences 550548, New Jersey, USA) or a rabbit anti-mouse HIF1 α (1:500; Abcam Ab2185, Cambridge, United Kingdom) antibodies diluted in PBS-5% goat serum. Then, the slides were incubated for 1-hour with a secondary Alexa Fluor 488 anti-rat or Alexa Fluor 546 anti-rabbit antibodies (1:500, Thermo Scientific A-11006 and Thermo Scientific A-11035, Waltham, USA). Cell nuclei were stained with DAPI. One section from each aorta was observed by fluorescence microscopy (Axio Imager, Zeiss, Oberkochen, Germany) and fluorescence was quantified using the software ImageJ (Fiji, imagej.net/Fiji) after subtracting the autofluorescence of elastin and the background.

Intima-Media Thickness (IMT) and Elastic Fiber Network analysis

Cryosections (thickness: 10 μm) of thoracic aortas from WT C57Bl/6 mice were stained with hematoxylin-eosin or Weigert solution to assess IMT or elastic fiber defects, respectively. Then, the sections were examined by microscopy (Axioscan, Zeiss, Oberkochen, Germany) and analyzed with the ZEN software version 3.1 (Zeiss). For each animal, 4 to 5 non-contiguous sections separated by about 100 μm were analyzed and a mean value was obtained by averaging at least 32 measurements (8 different areas per section) for IMT and the 4 to 5 measurement for elastin defects spanning the entire aorta.

Atherosclerotic lesion size

Atherosclerotic lesions of the whole aortas and aortic roots were analyzed by Oil red-O (ORO) staining (indicating lipid depositions). For each aortic root, we observed 5 non-contiguous sections (thickness: 10 μm) separated by 100 μm using an Axioscan microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany). Lipid depositions were measured in aortas and in aortic

roots by using the software ImageJ (Fiji) and expressed as a ratio of the atherosclerotic lesion size (ORO stained area) to the total area of aortas or aortic roots in a given section. A mean value was obtained by averaging the 5 measurements for aortic roots.

Plasma total-cholesterol and LDL-cholesterol dosage

Total cholesterol and LDL-cholesterol in ApoE^{-/-} mouse plasmas were analyzed by using an enzymatic colorimetric method on a chemistry analyzer (Atellica Solution, Siemens, Germany).

Arterial blood pressure recording

Systolic blood pressure (SBP), diastolic blood pressure (DBP) and mean arterial pressure (MAP) were measured by CODA in conscious ApoE^{-/-} mice after 8 weeks of exposure to IH or N using a non-invasive pressure recording system (CODA; Kent Scientific, Torrington, CT) which allows measurement of blood pressure in the tail artery of awake mice. Mice had been acclimated to the CODA restraining system and cuff inflation twice daily for 3 consecutive days before the effective recording. Mean value was calculated by averaging the 6 measurements obtained at the effective recording.

Statistical analysis

Comparisons between two groups were performed by t-test or Mann–Whitney test, while comparisons of several groups were performed by three-way ANOVA, two-way ANOVA or Kruskal-wallis test followed by the post hoc Fisher's LSD test using GraphPad Prism 8.0.1 software (*graphpad.com*) or Statistica software (*fr.statista.com*). The choice of parametric (t-test, ANOVA) or non-parametric (Mann-Whitney, kruskal wallis) tests depended on the normality of the distribution of values and on the equality of variances. For cell culture experiments, we verified previously that there were no significant differences between experiments regarding the effect of IH or pharmacological inhibitors. Values are reported as mean±SEM or median+interquartile range (IQR), depending on the normality or not of their distribution. $p \leq 0.05$ was considered as statistically significant.

RESULTS

Intermittent hypoxia increases transendothelial passage of LDL and monocytes migration *in vitro*

Using a transwell system, we showed that IH induced a significant increase in LDL passage by 37% (Figure 1A, bars: DMSO) and monocyte migration by 78% (Figure 1B, bars: DMSO) through an endothelial monolayer, compared to normoxia (N).

Blocking pathways involved in VE-cadherin cleavage reversed the effect of intermittent hypoxia on LDL passage and monocytes migration *in vitro*

Treating the HAEC monolayers by HIF-1, VEGF receptor kinases and Src-kinases inhibitors, respectively acriflavine (ACF), pazopanib and saracatinib, abolished the IH-induced elevation of LDL passage (Figure 1A), and decreased monocyte migration under IH, compared to N (Figure 1B).

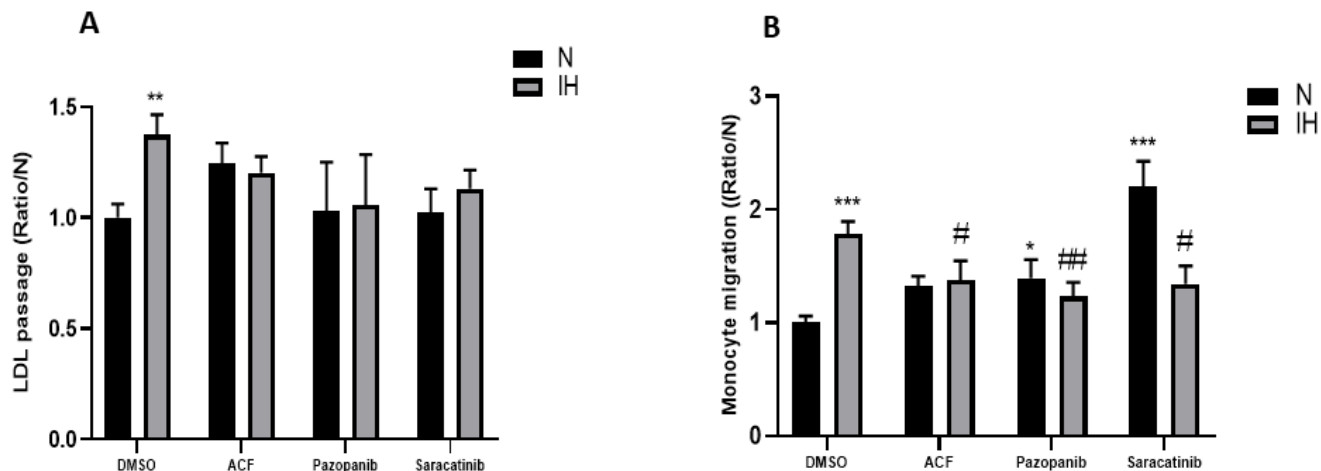


Figure 1: IH increases trans-endothelial passage of LDL and monocytes *in vitro* which was prevented by inhibitors of VE-cadherin cleavage. A) Inhibiting HIF-1 by acriflavine and tyr-kinases by pazopanib and saracatinib prevented the IH-induced increase in transendothelial passage of LDL (2-way ANOVA, ** $p < 0.01$ vs N+DMSO, $n = 28$ for DMSO, $n = 8-12$ for inhibitors from at least 4 independent experiments). **B)** Inhibiting HIF-1 by acriflavine and tyr-kinases by pazopanib and saracatinib prevented the IH-induced transendothelial migration of monocytes (2-way ANOVA, * $p < 0.05$ vs N+DMSO, *** $p < 0.001$ vs N+DMSO, # $p < 0.05$ vs IH+DMSO, ## $p < 0.01$ vs IH+DMSO, ### $p < 0.001$ vs IH+DMSO, $n = 10-11$ from at least 5 independent experiments). Values are mean \pm SEM. N=Normoxia, IH=intermittent hypoxia, ACF=acriflavine. Control experiments: DMSO (vehicle of the inhibitors).

Intermittent Hypoxia induces VE-cadherin cleavage *in vivo*

In vivo, we showed that a 2-week exposure to IH is sufficient to stimulate VE-cadherin cleavage in C57Bl/6 mice. Indeed, we observed a significant increase in sVE level in the plasma of IH-mice (+65 %) compared to N-mice (Figure 2A-B). This effect is associated with a depletion, in the same proportion (-65 %), of the expression of full-length VE-cadherin on the aorta endothelium detected by immunofluorescence (Figure 2C).

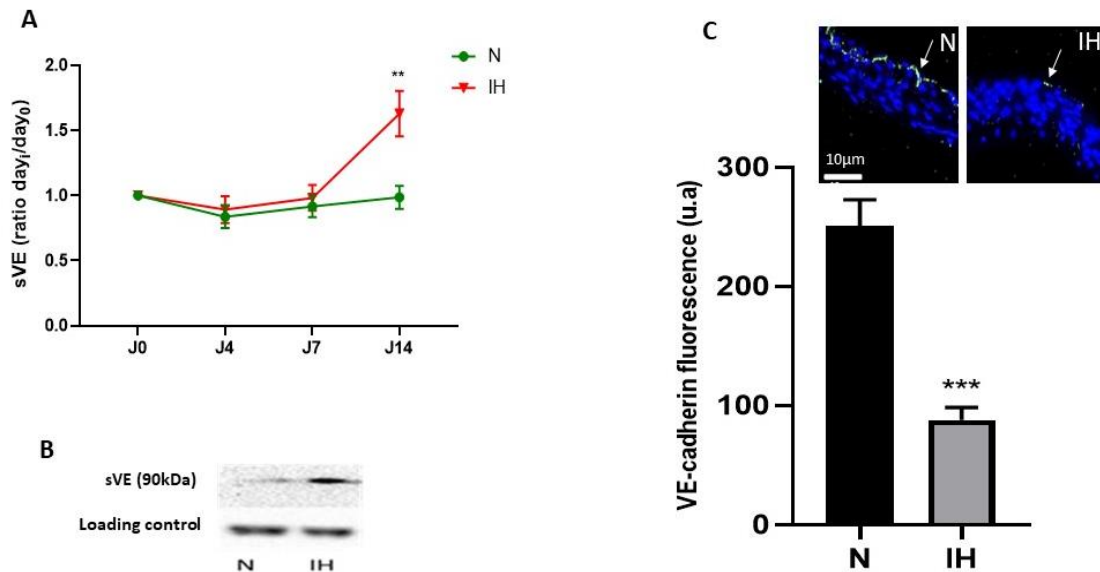


Figure 2: Intermittent hypoxia impairs endothelial adherent junctions *in vivo*. **A)** IH increases sVE level in the plasma of WT C57Bl/6 mice treated with vehicle (DMSO) after 14 days of exposure to IH (N vs IH at day 14, ** $p < 0.01$, Welch t-test, $n = 21-22$). **B)** A representative example of western blot showing a more intense sVE-band in the plasma of mice exposed to IH compared to those exposed to normoxia for 14 days (the immunoglobulin band is used as a loading control for normalization). **C)** IH reduces VE-cadherin expression in the endothelium of WT C57Bl/6 mice after 14 days of exposure to IH (N vs IH at day 14, *** $p < 0.001$, Welch t-test, $n = 15-16$), arrows indicate the VE-cadherin fluorescence in green, the blue staining is DAPI. Values are mean \pm SEM. N=Normoxia, IH=intermittent hypoxia.

Inhibiting HIF-1, VEGFR tyr-kinases and src-kinases prevented the *in vivo* effect of IH on VE-cadherin cleavage

In WT C57Bl/6 mice exposed to IH for 2 weeks, we found that acriflavine, pazopanib and saracatinib reversed the IH-induced elevation of the VE-cadherin cleavage (Figure 3). Surprisingly, plasma sVE level was increased in N animals treated by saracatinib, compared to the corresponding values found in N animals treated with vehicle alone (Figure 3B).

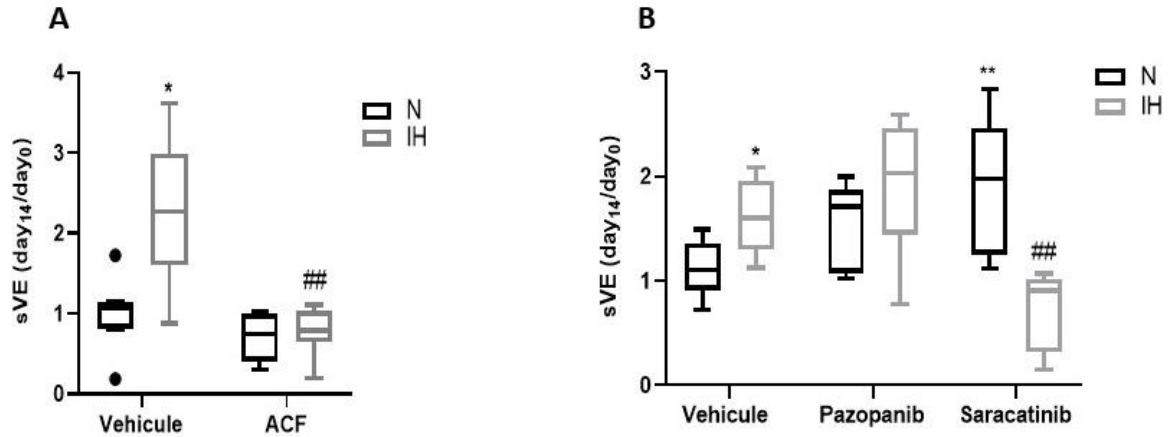


Figure 3: Effect of inhibitors of VE-cadherin cleavage on plasma sVE levels. A) Inhibiting HIF-1 (by ACF) reversed the IH-induced elevation of sVE level in the plasma of WT C57Bl/6 mice exposed 14 days to IH or N (Kruskal-wallis test, * $p < 0.05$ vs N+vehicle, ## $p < 0.01$ vs IH+vehicle, $n = 6-8$). **B):** Inhibiting VEGFR tyrosinases (by pazopanib) or src-kinases (by saracatinib) reversed the IH-induced elevation of sVE level in the plasma of WT C57Bl/6 mice exposed 14 days to IH or N (Kruskal-wallis test, * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs N+vehicle, ## $p < 0.01$ vs IH+vehicle, $n = 5-8$). Values are median + interquartile range. N=Normoxia, IH=intermittent hypoxia, ACF=Acriflavine.

The inhibition of VE-cadherin cleavage prevents the effect of intermittent hypoxia on vascular remodeling and elastic fiber network *in vivo*

To assess the vascular remodeling, we measured the intima-media thickness (IMT) in aortas of WT C57Bl/6 mice exposed 14 days to IH or N, treated by acriflavine, pazopanib or saracatinib. We reproduced the known IH-induced elevation of IMT⁵ and we showed that all the inhibitors reversed this effect (Figure 4 A-C).

We also demonstrated that IH alters elastic fibers, and this effect was reversed by acriflavine and saracatinib, not pazopanib (Figure 4 D-E).

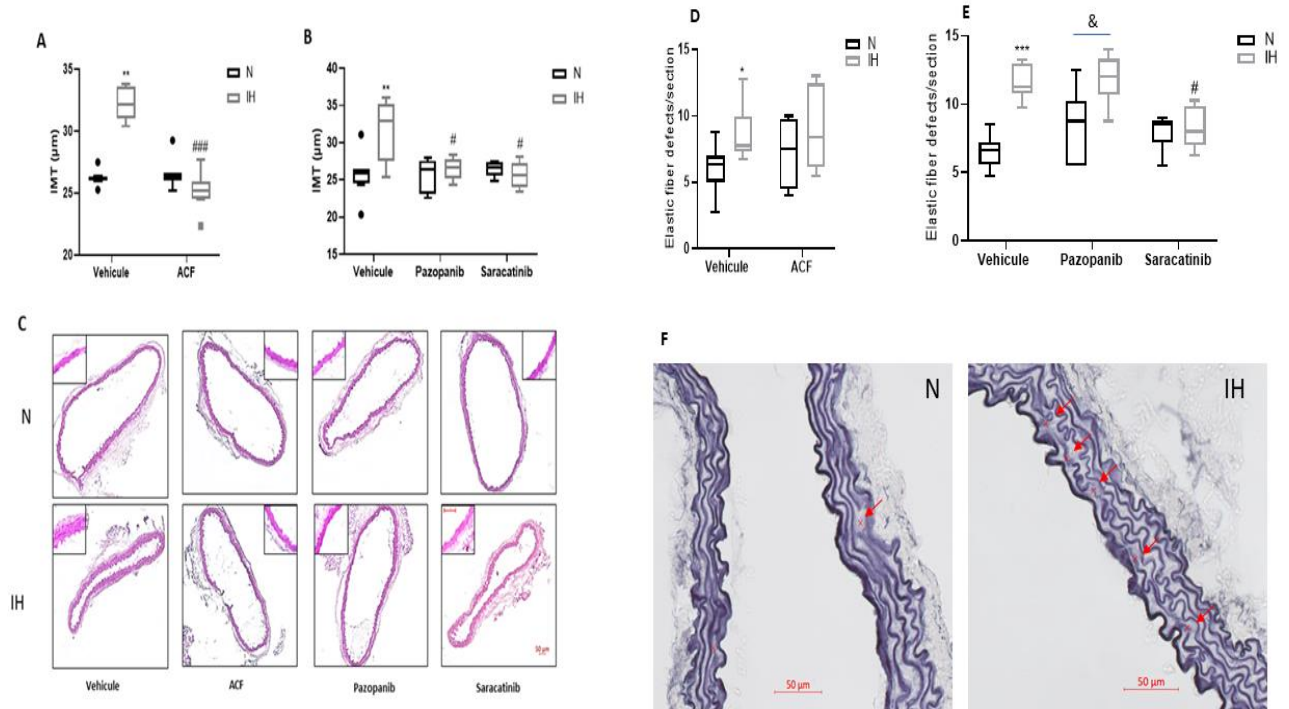


Figure 4: The effect of the inhibition of VE-cadherin pathways on vascular structure. A) Inhibiting HIF-1 (by ACF) prevents the IH-induced elevation of IMT in WT C57Bl/6 mice exposed 14 days to IH, compared to N (Kruskal-wallis test, $**p < 0.01$ vs N+vehicle, $###p < 0.001$ vs IH+vehicle, $n = 7-8$). **B)** Inhibiting VEGFR tyrosinases (by pazopanib) and src-kinases (by saracatinib) prevents the IH-induced elevation of IMT in WT C57Bl/6 mice exposed 14 days to IH, compared to N (Kruskal-wallis test, $**p < 0.01$ vs N+vehicle, $\#p < 0.05$ vs IH+vehicle, $n = 5-8$). **C)** Representative images of aortic cross-sections stained with Hematoxylin-Eosin. **D)** Inhibiting HIF-1 (by ACF) prevents IH-induced elastic fiber defects in WT mice exposed 14 days to IH (Kruskal-wallis test, $*p < 0.05$ vs N+vehicle, $n = 7-8$). **E)** Inhibiting src-kinases (by saracatinib) prevents IH-induced elastic fiber defects in WT mice exposed 14 days to IH (Kruskal-wallis test, $***p < 0.001$ vs N+vehicle, $\#p < 0.05$ vs IH+vehicle, $\&p < 0.05$ N+Pazopanib vs IH+Pazopanib, $n = 5-8$). **F)** Representative examples of Weigert stained aortas indicating elastic defects with red marks in N and IH control mice (treated with vehicle only). Values are median + Interquartile range. N=Normoxia, IH=intermittent hypoxia, ACF=acriflavine. Scale bar=50µm.

Blocking VE-cadherin cleavage prevents the favoring effect of intermittent hypoxia on atherosclerosis

We assessed atherosclerotic lesions in aortas and in aortic roots by using Oil Red O staining in ApoE^{-/-} mice after 8 weeks of exposure to IH or N. We found that blocking VE-cadherin cleavage reduced the IH-induced enhancement of the formation of atherosclerotic plaques in aortas (Figure 5 A-C). In aortic roots, the same trends were observed but the effect of IH on atherosclerotic lesions did not reach the significance level (Figure 5 D-E). Finally, we

verified that the inhibitors did not induce significant changes in plasma total-cholesterol levels (supplementary data 4).

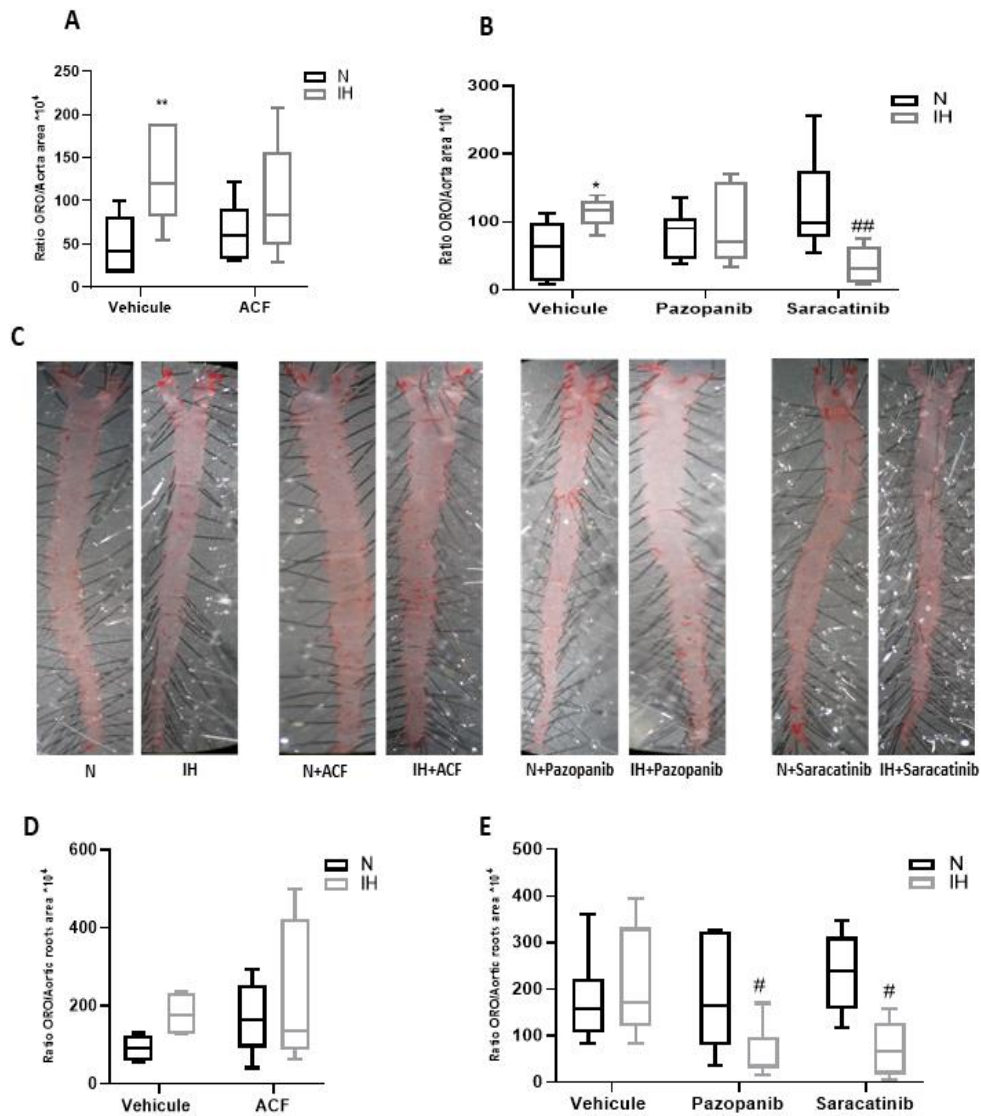


Figure 5: The impact of blocking VE-cadherin cleavage on atherosclerosis lesions. A) Inhibiting HIF-1 (by ACF) reduces atherosclerotic plaques in aortas of ApoE^{-/-} mice exposed for 8 weeks to IH (Kruskal-Wallis test, ** $p < 0.01$ vs N+vehicle, $n = 5-8$). **B)** Inhibition of VEGFR tyr-kinases (by pazopanib) and src-kinases (by saracatinib) prevents the formation of atherosclerotic plaques in aortas of ApoE^{-/-} mice exposed for 8 weeks to IH (Kruskal-Wallis test, * $p < 0.05$ vs N+vehicle, ## $p < 0.01$ vs IH+vehicle, $n = 5-6$). **C)** representative examples of ORO-stained aortas. **D)** Inhibiting HIF-1 (by ACF) tends to reduce atherosclerotic plaques in aortic roots of ApoE^{-/-} mice exposed for 8 weeks to IH (Kruskal-Wallis test, $p = 0.08$ for N+vehicle vs IH+vehicle, $n = 4-8$). **E)** Inhibition of VEGFR tyr-kinases (by pazopanib) and src-kinases (by saracatinib) prevents atherosclerotic plaques in aortic roots of APO E^{-/-} mice exposed for 8 weeks to IH (Kruskal-Wallis test, # $p < 0.05$ vs IH+vehicle, $n = 5-6$). Values are median + interquartile range. N=Normoxia, IH=intermittent hypoxia, ACF=Acriflavine.

Inhibitors of VE-cadherin cleavage pathways abolish the effect of IH on arterial pressures

We measured arterial pressure by CODA method in ApoE^{-/-} mice after 8 weeks of exposure to IH. We found that intermittent hypoxia increases arterial pressures, in accordance with the literature, and tyrosine kinases inhibitors (pazopanib and saracatinib) prevent this effect (Figure 6A). Inhibiting HIF-1 by acriflavine tends to abolish the effect of intermittent hypoxia on arterial pressures (Figure 6B).

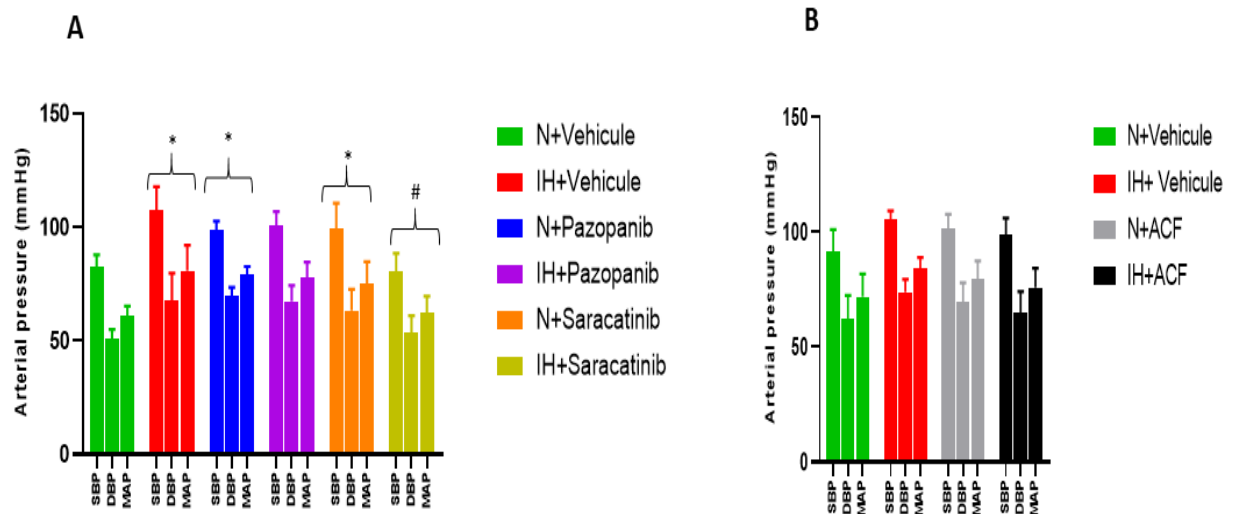


Figure 6: The impact of blocking VE-cadherin cleavage on arterial pressures. A) Inhibiting VEGFR tyr-kinases (by pazopanib) and src-kinases (by saracatinib) prevents the effect of IH on arterial pressure in ApoE^{-/-} mice exposed for 8 weeks to IH (3-way ANOVA, followed by a Fisher's LSD test, * $p < 0.05$ vs N+vehicule, # $p < 0.05$ vs IH+vehicule, $n = 5-8$). **B)** Inhibiting HIF-1 (by ACF) tends to reduce the effect of IH on arterial pressure in ApoE^{-/-} mice exposed for 8 weeks to IH (3-way ANOVA, $p = 0.17$ for the interaction IH x treatment, $n = 5-8$). Values are mean \pm SEM. N=Normoxia, IH=intermittent hypoxia, ACF=Acriflavine, SBP=systolic blood pressure, DBP=diastolic blood pressure, MAP =mean blood pressure.

DISCUSSION

Our study shows for the first time that, in mice, intermittent hypoxia (IH) increases the cleavage of VE-cadherin and the release of its soluble fragment (sVE) in the blood, and alters endothelial adherens junctions. Moreover, we have demonstrated that inhibition of the pathways involved in VE-cadherin cleavage⁷ prevents the intermittent hypoxia-induced vascular remodeling, atherosclerosis and arterial hypertension.

The depletion of VE-cadherin from endothelial cell membranes is responsible for increased endothelial permeability^{15,16}, which could lead to increased infiltration of pro-atherogenic molecules or cells into the vascular wall. Actually, plasma sVE level has been found high in atherosclerosis in mice^{17,18} and humans¹⁹. We have demonstrated an increase of LDL passage (+37%) and monocyte migration (+78%) *in vitro*, through an endothelial monolayer under IH conditions. This effect correlates and is probably due to the IH-induced increase in endothelial permeability, as described previously⁷ which could favor the paracellular passage of these molecules and cells^{20,21}, through the formation of intercellular gaps^{7,12}. It has been demonstrated that these gaps are caused, at least in part, by disruption of VE-cadherin function¹² due to the cleavage of its extracellular domain by neutrophil surface-bound proteases²². However, other mediators and pathways could also regulate this infiltration. Actually, the endothelial permeability to LDL could be regulated by the tight junction proteins, such as occludins and claudins²¹, and by transcellular route^{21,23} through the cGMP/PKG/NF- κ B signaling pathway²¹. Regarding leukocyte transendothelial migration, it could also involve the transcellular pathway²⁴ and JAM proteins^{25,26}. Also, under IH, we have demonstrated a 19.5% increase in the paracellular passage of dextran⁷, a typical agent whose transport is conducted by mostly paracellular route^{27,28}. The higher transendothelial passage of LDL and monocytes under IH could thus be explained by the activation of a combination of paracellular and transcellular routes. Future studies will be required to further explore and characterize the transcellular route in IH-induced endothelial permeability.

We then treated WT C57Bl/6 mice with inhibitors of VE-cadherin cleavage pathways, as described previously⁷, and showed that a HIF-1 inhibitor (acriflavine), a VEGF receptor tyrosinases inhibitor (pazopanib) and a Src-kinases inhibitor (saracatinib) abolished the IH-induced VE-cadherin cleavage *in vivo*, reflected by the reduction of plasma sVE levels. This generalizes to the *in vivo* physiopathology our previous results obtained *in vitro*⁷, showing that VE-cadherin cleavage involves HIF-1/tyrosine-kinases pathways. Moreover, the inhibition of VE-cadherin cleavage pathways by the use of these inhibitors prevented both LDL passage and monocyte migration induced by IH *in vitro*.

In WT C57Bl/6 mice, IH generated the already known vascular remodeling (i.e. increased IMT)⁵ and elastic fiber network alteration^{11,29}. The inhibition of VE-cadherin cleavage by acriflavine, pazopanib and saracatinib reversed the IH-induced vascular remodeling, while only acriflavine and saracatinib prevented the IH-induced elastic fiber fragmentation, not pazopanib.

Since vascular remodeling is an early step in the atherogenesis process, we then analyzed atherosclerotic lesions induced by IH in ApoE^{-/-} mice. We reproduced the known favoring effect of IH on the formation of atherosclerotic lesions⁵ in aortas. The inhibition of VE-cadherin cleavage pathways by acriflavine, pazopanib and saracatinib reduced the atherosclerotic lesion size in aortas without modifying total cholesterol levels in plasmas. This suggests that IH-induced atherosclerosis is enhanced by the endothelial hyperpermeability mediated by VE-cadherin cleavage⁷, which facilitates the infiltration of lipids and inflammatory cells in the arterial wall. Our results are coherent with previous studies, out of the IH context, which demonstrated that the inhibition of VE-cadherin cleavage³⁰, tyrosine-kinases^{30,31}, src-kinases^{32,33} and HIF-1^{34,35} protects against atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice. However, we couldn't exclude the contribution of other pathways activated by IH, as inflammation^{36,37}, NF-κB/TNFα pathways^{9,17}, cysteinyl-leukotriene pathway³⁸ or cyclooxygenase pathway³⁹.

We finally assessed the effect of the inhibition of VE-cadherin cleavage on arterial pressures, since hypertension is a common cardiovascular complication of IH-induced endothelial dysfunction. We demonstrated that the VEGF receptor tyr-kinases inhibitor (pazopanib) and a Src-kinases inhibitor (saracatinib) significantly prevent the known IH-induced elevation of arterial pressure⁵. However, HIF-1 inhibition by acriflavine only tends to prevent this effect (p=0.17). Thus, the inhibition of VE-cadherin cleavage could be a challenging tool to prevent some cardiovascular comorbidities of OSAS, such as atherosclerosis and hypertension.

We surprisingly noticed that, in animals exposed to N, saracatinib significantly increased plasma sVE, atherosclerosis lesions (p=0.07), and arterial pressures compared to the

normoxic group treated with the inhibitor vehicle. These effects are not found under IH, and may be explained by the fact that, in N, src-kinases are not active and have a different conformation from that of the active enzyme assumed to be present during IH⁴⁰. When src-kinase is in its inactive form (in N conditions), saracatinib could not efficiently bind to the ATP binding site as it does with the active form of the enzyme, and therefore loses its specificity for the enzyme. This could lead to cardiovascular side effects similar to those of multitarget tyrosine kinases inhibitors (as dasatinib, nilotinib, sunitinib, etc.), among whom a high risk of hyperlipidemia⁴¹⁻⁴³. To a lesser extent, pazopanib tends to have effects resembling those of saracatinib, but the difference doesn't reach the significance level except for arterial pressure, whose increase is a known side effect of pazopanib⁴⁴. Moreover, anti-VEGF therapy is considered as a risk factor of increased IMT and thus of atherosclerosis⁴⁵. This could be explained by the lack of specificity for the inactive form of the VEGF receptor tyr-kinases inhibitor, pazopanib, and by the fact that this molecule targets multiple tyrosine kinases⁴³.

To conclude, we have demonstrated that inhibiting VE-cadherin cleavage prevents vascular remodeling, atherosclerosis and arterial pressures *in vivo*. Since there is no direct and specific inhibitor of the cleavage of VE-cadherin, we used inhibitors of different molecular processes known⁷ to be major contributors of this cleavage, such as VEGFR tyrosine kinases⁸, src-kinases⁹ and HIF-1, VEGF being a target gene of HIF-1³. All these inhibitors abolished the IH-induced VE-cadherin cleavage, endothelial permeability to LDL and monocytes *in vitro*, vascular remodeling, atherosclerosis and hypertension. Saracatinib had the strongest effect since it also reduced these parameters under N levels. These findings provide new insights into the IH-induced arterial dysfunctions, and suggest a strong potential of VE-cadherin targeting for new anti-atherogenic therapeutic strategies to reduce cardiovascular complications associated to OSAS.

GRANTS

This work was funded by University Grenoble Alpes, INSERM, Fondation Agir Pour les Maladies Chroniques (APMC), Fondation du Souffle and Fondation pour la Recherche en Santé Respiratoire (PhD grant for Olfa Harki), and Fondation de l'Avenir.

REFERENCES

1. Roth, G. A. *et al.* Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990–2019. *Journal of the American College of Cardiology* **76**, 2982–3021 (2020).
2. Benjafield, A. V. *et al.* Estimation of the global prevalence and burden of obstructive sleep apnoea: a literature-based analysis. *Lancet Respir Med* **7**, 687–698 (2019).
3. Lévy, P. *et al.* Obstructive sleep apnoea syndrome. *Nat Rev Dis Primers* **1**, 15015 (2015).
4. McEvoy, R. D. *et al.* CPAP for Prevention of Cardiovascular Events in Obstructive Sleep Apnea. *New England Journal of Medicine* **375**, 919–931 (2016).
5. Harki, O. *et al.* Intermittent hypoxia-related alterations in vascular structure and function: a systematic review and meta-analysis of rodent data. *European Respiratory Journal* (2021) doi:10.1183/13993003.00866-2021.
6. Ryan, S. Mechanisms of cardiovascular disease in obstructive sleep apnoea. *J Thorac Dis* **10**, S4201–S4211 (2018).
7. Harki, O. *et al.* VE-Cadherin cleavage in sleep apnoea: new insights into intermittent hypoxia-related endothelial permeability. *European Respiratory Journal* (2021) doi:10.1183/13993003.04518-2020.
8. Polena, H. *et al.* The tyrosine-kinase inhibitor sunitinib targets vascular endothelial (VE)-cadherin: a marker of response to antitumoural treatment in metastatic renal cell carcinoma. *Br J Cancer* **118**, 1179–1188 (2018).
9. Sidibé, A. *et al.* Soluble VE-cadherin in rheumatoid arthritis patients correlates with disease activity: evidence for tumor necrosis factor α -induced VE-cadherin cleavage. *Arthritis Rheum* **64**, 77–87 (2012).
10. Mundi, S. *et al.* Endothelial permeability, LDL deposition, and cardiovascular risk factors—a review. *Cardiovascular Research* **114**, 35–52 (2018).
11. Arnaud, C. *et al.* Nonmuscle Myosin Light Chain Kinase: A Key Player in Intermittent Hypoxia-Induced Vascular Alterations. *J Am Heart Assoc* **7**, (2018).
12. Makarenko, V. V. *et al.* Intermittent hypoxia-induced endothelial barrier dysfunction requires ROS-dependent MAP kinase activation. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* **306**, C745–752 (2014).
13. Zychowski, K. E. *et al.* Serum from obstructive sleep apnea patients induces inflammatory responses in coronary artery endothelial cells. *Atherosclerosis* **254**, 59–66 (2016).
14. Minoves, M. *et al.* An innovative intermittent hypoxia model for cell cultures allowing fast Po₂ oscillations with minimal gas consumption. *Am J Physiol Cell Physiol* **313**, C460–C468 (2017).

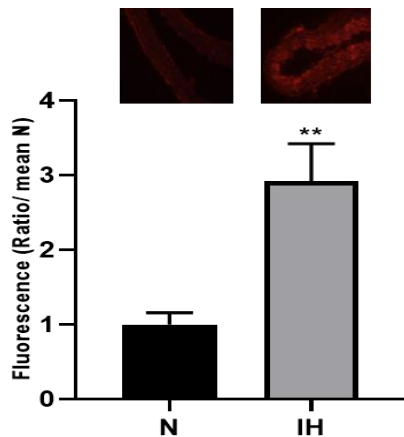
15. Manuneedhi Cholan, P. *et al.* TRAIL protects against endothelial dysfunction in vivo and inhibits angiotensin-II-induced oxidative stress in vascular endothelial cells in vitro. *Free Radic Biol Med* **126**, 341–349 (2018).
16. Wessel, F. *et al.* Leukocyte extravasation and vascular permeability are each controlled in vivo by different tyrosine residues of VE-cadherin. *Nat Immunol* **15**, 223–230 (2014).
17. Wu, Y. *et al.* Baicalin alleviates atherosclerosis by relieving oxidative stress and inflammatory responses via inactivating the NF- κ B and p38 MAPK signaling pathways. *Biomed Pharmacother* **97**, 1673–1679 (2018).
18. Miyazaki, T. *et al.* m-Calpain induction in vascular endothelial cells on human and mouse atheromas and its roles in VE-cadherin disorganization and atherosclerosis. *Circulation* **124**, 2522–2532 (2011).
19. Soeki, T. *et al.* Elevated concentration of soluble vascular endothelial cadherin is associated with coronary atherosclerosis. *Circ J* **68**, 1–5 (2004).
20. Weber, C., Fraemohs, L. & Dejana, E. The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation. *Nat Rev Immunol* **7**, 467–477 (2007).
21. Ba, J., Peng, H., Chen, Y. & Gao, Y. Effects and Mechanism Analysis of Vascular Endothelial Growth Factor and Salvianolic Acid B on 125I-Low Density Lipoprotein Permeability of the Rabbit Aortary Endothelial Cells. *Cell Biochem Biophys* **70**, 1533–1538 (2014).
22. Hermant, B. *et al.* Identification of proteases involved in the proteolysis of vascular endothelium cadherin during neutrophil transmigration. *J Biol Chem* **278**, 14002–14012 (2003).
23. Jang, E., Robert, J., Rohrer, L., von Eckardstein, A. & Lee, W. L. Transendothelial transport of lipoproteins. *Atherosclerosis* **315**, 111–125 (2020).
24. Millán, J. *et al.* Lymphocyte transcellular migration occurs through recruitment of endothelial ICAM-1 to caveola- and F-actin-rich domains. *Nat Cell Biol* **8**, 113–123 (2006).
25. Keiper, T. *et al.* The role of junctional adhesion molecule-C (JAM-C) in oxidized LDL-mediated leukocyte recruitment. *The FASEB Journal* **19**, 2078–2080 (2005).
26. Koenen, R. R. *et al.* Regulated release and functional modulation of junctional adhesion molecule A by disintegrin metalloproteinases. *Blood* **113**, 4799–4809 (2009).
27. Frost, T. S., Jiang, L., Lynch, R. M. & Zohar, Y. Permeability of Epithelial/Endothelial Barriers in Transwells and Microfluidic Bilayer Devices. *Micromachines (Basel)* **10**, E533 (2019).
28. Thomas, A. *et al.* Characterization of vascular permeability using a biomimetic microfluidic blood vessel model. *Biomicrofluidics* **11**, 024102 (2017).
29. Suarez-Giron, M. C. *et al.* Acetylsalicylic Acid Prevents Intermittent Hypoxia-Induced Vascular Remodeling in a Murine Model of Sleep Apnea. *Front Physiol* **9**, 600 (2018).

30. Jiang, H. *et al.* Endothelial tyrosine kinase receptor B prevents VE-cadherin cleavage and protects against atherosclerotic lesion development in ApoE^{-/-} mice. *Oncotarget* **6**, 30640–30649 (2015).
31. Zhang, Y., Li, L., You, J., Cao, J. & Fu, X. Effect of 7-difluoromethyl-5, 4'-dimethoxygenistein on aorta atherosclerosis in hyperlipidemia ApoE^{-/-} mice induced by a cholesterol-rich diet. *Drug Des Devel Ther* **7**, 233–242 (2013).
32. Bian, F. *et al.* C-reactive protein promotes atherosclerosis by increasing LDL transcytosis across endothelial cells. *Br J Pharmacol* **171**, 2671–2684 (2014).
33. Liu, J. *et al.* LCK inhibitor attenuates atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice via regulating T cell differentiation and reverse cholesterol transport. *J Mol Cell Cardiol* **139**, 87–97 (2020).
34. Bourghardt, J. *et al.* The endogenous estradiol metabolite 2-methoxyestradiol reduces atherosclerotic lesion formation in female apolipoprotein E-deficient mice. *Endocrinology* **148**, 4128–4132 (2007).
35. Christoph, M. *et al.* Local inhibition of hypoxia-inducible factor reduces neointima formation after arterial injury in ApoE^{-/-} mice. *Atherosclerosis* **233**, 641–647 (2014).
36. Arnaud, C. *et al.* The inflammatory preatherosclerotic remodeling induced by intermittent hypoxia is attenuated by RANTES/CCL5 inhibition. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **184**, 724–731 (2011).
37. Arnaud, C., Poulain, L., Lévy, P. & Dematteis, M. Inflammation contributes to the atherogenic role of intermittent hypoxia in apolipoprotein-E knock out mice. *Atherosclerosis* **219**, 425–431 (2011).
38. Gautier-Veyret, E. *et al.* Cysteinyl-leukotriene pathway as a new therapeutic target for the treatment of atherosclerosis related to obstructive sleep apnea syndrome. *Pharmacol. Res.* **134**, 311–319 (2018).
39. Gautier-Veyret, E. *et al.* Intermittent hypoxia-activated cyclooxygenase pathway: role in atherosclerosis. *Eur Respir J* **42**, 404 (2013).
40. Hennequin, L. F. *et al.* N-(5-chloro-1,3-benzodioxol-4-yl)-7-[2-(4-methylpiperazin-1-yl)ethoxy]-5-(tetrahydro-2H-pyran-4-yloxy)quinazolin-4-amine, a novel, highly selective, orally available, dual-specific c-Src/Abl kinase inhibitor. *J Med Chem* **49**, 6465–6488 (2006).
41. Yu, L., Liu, J., Huang, X. & Jiang, Q. Adverse effects of dasatinib on glucose-lipid metabolism in patients with chronic myeloid leukaemia in the chronic phase. *Sci Rep* **9**, 17601 (2019).
42. Rea, D. *et al.* Early onset hypercholesterolemia induced by the 2nd-generation tyrosine kinase inhibitor nilotinib in patients with chronic phase-chronic myeloid leukemia. *Haematologica* **99**, 1197–1203 (2014).
43. Dai, H. *et al.* Risk of Dyslipidemia Associated with VEGF/VEGFR Inhibitors: A Meta-Analysis. *Transl Oncol* **13**, 100779 (2020).

44. Pinkhas, D., Ho, T. & Smith, S. Assessment of pazopanib-related hypertension, cardiac dysfunction and identification of clinical risk factors for their development. *Cardiooncology* **3**, 5 (2017).
45. Študentová, H. *et al.* Risk factors of atherosclerosis during systemic therapy targeting vascular endothelial growth factor. *Oncol Lett* **11**, 939–944 (2016).

Supplementary data

Supplementary data 1: The effect of IH was checked by measuring HIF-1 expression by immunofluorescence on aorta cryosections.



Intermittent hypoxia activates HIF-1 on the endothelium of WT C57Bl/6 mice after 14 days of exposure to IH (N vis IH, $p=0.006$, Welch t-test, $n=8$). Values are mean + SEM.

Supplementary data 2: Weight and hematocrit of WT C57Bl/6 mice used for the vascular remodeling experiment.

Administration route	group	n	Weight day0	Weight day14	Hematocrit	p (hematocrit)
Gavage	N	8	26,48 ± 1,06	27,72 ± 1,03	42,5 ± 2	0,001
	IH	7	26 ± 1,11	25,45 ± 1,01	48,85 ± 3,07	
	N+Pazopanib	7	26,78 ± 1,96	27,3 ± 0,86	44,42 ± 2,99	0,03
	IH + Pazopanib	8	26,26 ± 2,09	23,96 ± 1,78	48,37 ± 2,38	
	N+Saracatinib	6	26,75 ± 0,94	27,61 ± 0,43	45,83 ± 2,64	0,008
	IH+Saracatinib	5	27,78 ± 1,57	24,72 ± 1,27	52,5 ± 1,29	
IP	N	8	25,07 ± 2,13	26,41 ± 1,9	44,5 ± 1,19	0,006
	IH	8	25,3 ± 1,03	23,83 ± 1,03	49 ± 4,14	
	N+ACF	7	24,48 ± 1,72	25,84 ± 0,98	45,28 ± 1,25	0,002
	IH+ACF	8	25,28 ± 1,67	22,82 ± 1,29	51,37 ± 2,55	

Supplementary data 3: Weight and hematocrit of ApoE^{-/-} mice used for the atherosclerotic lesion experiments.

Administration route	group	n	Weight day0	Weight day56	Hematocrit	p (hematocrit)
Gavage	N	6	24,65 ± 1,55	25,4 ± 1,46	45 ± 0,81	0,04
	IH	5	24,12 ± 1,72	22,7 ± 1	48,75 ± 1,5	
	N+Pazopanib	6	26,38 ± 1,36	25,95 ± 1,03	44,83 ± 2,13	0,05
	IH+Pazopanib	6	26,63 ± 1,4	25,11 ± 1,7	48,83 ± 3,25	
	N + Saracatinib	6	24,93 ± 0,64	24,61 ± 0,47	45,2 ± 0,83	0,003
	IH + Saracatinib	6	25,51 ± 1,21	23,13 ± 0,73	50,66 ± 2,33	
IP	N	6	24,95 ± 2,28	26,41 ± 2,52	47,50 ± 2,88	0,73
	IH	5	24,56 ± 1,2	24,38 ± 0,98	48,25 ± 2,21	
	N+ACF	8	24,58 ± 1,33	24,98 ± 1,79	45,14 ± 2,96	0,11
	IH + ACF	7	23,62 ± 1,58	23,2 ± 1,06	47,37 ± 2,82	

Supplementary data 4: Total cholesterol in ApoE^{-/-} mice (n=3 to 5 in some groups, because of a lack of plasma to perform the dosage, due to technical issues).

	N	N+ Pazopanib	N+ saracatinib	IH	IH+Pazopanib	IH+ saracatinib
Number	6	5	6	3	6	6
Mean \pm SD (mmol/L)	10,62 \pm 1,77	12,49 \pm 1,71	11,72 \pm 1,89	9,03 \pm 0,65	11,36 \pm 0,99	9,91 \pm 3,16

	N	N+ ACF	IH	IH+ACF
Number	6	6	4	8
Mean \pm SD (mmol/L)	9,02 \pm 2,22	10,10 \pm 1,46	9,97 \pm 3,61	11,11 \pm 2,86

5. Discussion

Notre étude a démontré pour la première fois que l'HI augmente le clivage de la VE-cadhérine chez la souris, traduit par une augmentation du taux plasmatique de sVE, et une altération des jonctions adhérentes endothéliales. La déplétion en VE-cadhérine des membranes des cellules endothéliales est à l'origine d'une augmentation de la perméabilité de l'endothélium (Harki et al., 2021a; Manuneedhi Cholan et al., 2018; Wessel et al., 2014) qui pourrait faciliter l'infiltration de molécules pro-athérogènes dans la paroi vasculaire (Ba et al., 2014; Weber et al., 2007). En effet, le niveau de sVE sérique a été démontré élevé chez la souris (Miyazaki et al., 2011; Wu et al., 2018) et chez l'Homme athéromateux (Soeki et al., 2004). De façon concordante, nous avons montré une augmentation du passage transendothélial des LDL et des monocytes *in vitro* à travers une monocouche de cellules endothéliales cultivées en HI. Nos résultats préliminaires montrent que la pré-exposition des monocytes à l'HI n'a pas d'effet sur leur passage transendothélial. Ceci suggère que l'effet observé dans notre étude est dû à l'impact de l'HI sur les cellules endothéliales par augmentation de leur perméabilité paracellulaire. Cependant, on ne peut pas exclure un rôle du passage transcellulaire et des jonctions serrées dans cet effet (Ba et al., 2014; Keiper et al., 2005; Millán et al., 2006).

Le traitement des souris C57Bl/6 WT par l'acriflavine, le pazopanib et le saracatinib réduit le taux de sVE plasmatique et prévient *in vitro* le passage transendothélial des LDL et des monocytes. Ces molécules pourraient ainsi prévenir la dysfonction endothéliale et l'athérosclérose induites par l'HI. Nous avons donc mené des expériences *in vivo* pour vérifier cette hypothèse.

Nous avons reproduit l'effet documenté de l'HI sur le remodelage vasculaire chez les souris C57Bl/6 WT et sur l'athérosclérose chez les souris ApoE^{-/-} (Harki et al., 2021b). L'inhibition du clivage de la VE-cadhérine par l'acriflavine, le pazopanib et le saracatinib a bloqué ces effets. Nos résultats sont concordants avec d'autres études qui ont montré que l'inhibition du clivage de la VE-cadhérine (Jiang et al., 2015), des tyrosine-kinases (Zhang et al., 2013), des src-kinases (Bian et al., 2014; Liu et al., 2020) et de HIF-1 (Bourghardt et al., 2007; Christoph et al., 2014) prévient l'athérosclérose chez des souris ApoE^{-/-} en dehors du contexte de l'HI. Le fait que les inhibiteurs ne réduisent pas les taux plasmatiques du cholestérol total suggère que leurs effets sur l'athérosclérose induite par l'HI ne sont pas liés

à une modification des taux sanguins du cholestérol mais bien à une diminution de l'infiltration des lipides et des cellules inflammatoires dans la paroi artérielle, consécutivement au clivage de la VE-cadhérine. Cependant, nous ne pouvons pas exclure la contribution d'autres voies activées par l'HI comme l'inflammation (Arnaud et al., 2011b), la voie NF-kB/TNF α (Wu et al., 2018), la voie des cystéinyl-leucotriènes (Gautier-Veyret et al., 2018) ou la voie des cyclooxygénases (Gautier-Veyret et al., 2013). Nos résultats vont être complétés par analyse de la qualité des plaques d'athérome par étude de l'inflammation et du collagène chez les souris ApoE $^{-/-}$. Ceci permettra d'évaluer le risque de vulnérabilité des plaques d'athérome et l'effet des inhibiteurs testés sur ce paramètre.

Nous avons finalement évalué l'effet de l'inhibition du clivage de la VE-cadhérine sur la pression artérielle, puisque l'hypertension est une complication cardiovasculaire courante de la dysfonction endothéliale induite par l'HI. Nous avons démontré que les inhibiteurs des tyrosine-kinases (pazopanib et saracatinib) bloquent l'augmentation de la pression artérielle induite par l'HI. L'acriflavine tend seulement à empêcher cet effet, sans atteindre le seuil de significativité ($p=0.17$). Notre étude est la première à démontrer un effet anti-hypertenseur des inhibiteurs des tyrosine-kinases.

Curieusement, nous avons remarqué que, chez les animaux exposés à la N, le saracatinib augmente significativement le taux de sVE plasmatique, les lésions d'athérosclérose ($p=0.07$) et la pression artérielle. Cet effet n'est pas retrouvé en HI, puisqu'au contraire le saracatinib inhibe bien l'effet de l'HI sur ces paramètres. Cela pourrait s'expliquer par le fait que la conformation inactive de la tyrosine-kinase (en conditions de N) est différente de sa conformation active (en HI) (Hennequin et al., 2006). En effet, le saracatinib n'est pas capable d'occuper efficacement le site actif de l'enzyme inactivée et pourrait perdre ainsi sa spécificité pour la kinase. Le manque de spécificité pourrait entraîner des effets secondaires cardiovasculaires similaires à ceux des inhibiteurs des tyrosine-kinases multicibles (par exemple le dasatinib, le nilotinib, le sunitinib, etc.) comme le risque d'hyperlipidémie (Dai et al., 2020; Rea et al., 2014; Yu et al., 2019a). Le pazopanib a un effet ressemblant à celui du saracatinib, mais moins prononcé : il n'est généralement pas significatif sauf pour la pression artérielle. Cela pourrait s'expliquer par le manque de spécificité pour la forme inactive de l'enzyme et par le fait que cette molécule cible plusieurs tyrosine-kinases (Dai et al., 2020; Študentová et al., 2016).

Pour conclure, l'inhibition des voies de signalisation du clivage de la VE-cadhérine prévient la survenue d'athérosclérose induite par l'HI en réduisant la perméabilité endothéliale aux molécules et cellules pro-athérogènes. Ces résultats fournissent de potentielles cibles pour une nouvelle stratégie thérapeutique anti-athérogène pour prévenir les complications cardiovasculaires associées au SAOS.

Etude 3 : Méta-analyse préclinique pour étudier l'effet de l'hypoxie intermittente sur la structure et la fonction des artères chez les rongeurs

1. Introduction

L'hypoxie intermittente est considérée comme la composante du SAOS la plus responsable des complications cardiovasculaires. Pour étudier les mécanismes physiologiques sous-jacents, des modèles animaux d'hypoxie intermittente sont utilisés, comme la trachéotomie, l'utilisation d'un ballon gonflable dans la trachée ou d'un masque nasal qui permettent d'obstruer par intermittence les voies respiratoires de l'animal, ou l'exposition des animaux à des niveaux de FiO_2 bas par intermittence (Dematteis et al., 2009; Hunyor and Cook, 2018). Cette dernière méthode est largement utilisée et a permis de confirmer le rôle de l'hypoxie intermittente dans les altérations vasculaires du SAOS ainsi que de décrypter les mécanismes physiopathologiques impliqués, tels que l'activation du système nerveux sympathique, la dysfonction endothéliale, l'inflammation ou le stress oxydatif (Dematteis et al., 2009). Cependant, l'ampleur de l'effet de l'hypoxie intermittente sur les vaisseaux varie d'une étude à l'autre voire disparaît (Lefebvre et al., 2006; Zhou et al., 2014). Cette discordance entre les études pourrait s'expliquer par l'hétérogénéité des schémas d'exposition à l'hypoxie intermittente utilisés (durée des cycles d'hypoxie intermittente, durée journalière ou totale d'exposition), par l'hétérogénéité des modèles de rongeurs (type de rongeur, sexe, souche, âge, régime alimentaire), ainsi que la disparité des lits vasculaires étudiés (grandes artères élastiques, petites artères musculaires).

Parallèlement, les études cliniques sont confrontées à des facteurs confondants, telles que les comorbidités cardiovasculaires associées au SAOS, et le rôle de l'hypoxie intermittente en tant que facteur de risque cardiovasculaire indépendant est encore controversé.

Il semble alors crucial d'analyser l'effet de l'hypoxie intermittente sur les vaisseaux dans les différents modèles expérimentaux à partir des données exhaustives de la littérature afin de comprendre sa contribution aux altérations fonctionnelles des artères et aux complications cardiovasculaires du SAOS.

1. Objectifs

Nous avons mené une revue systématique et une méta-analyse dont l'objectif est :

- de mesurer l'impact global de l'hypoxie intermittente sur les paramètres physiologiques généraux (pression artérielle) et vasculaires dans les artères systémiques (remodelage vasculaire, réactivité vasculaire et lésions d'athérosclérose),
- d'identifier les principaux facteurs expliquant l'hétérogénéité de l'effet de l'hypoxie intermittente, notamment en ce qui concerne les modèles de rongeurs et les schémas d'exposition.

2. Matériel et méthodes

Nous avons fait une recherche dans les bases de données Pubmed, Web of Science et EMBASE en utilisant les mots clés "intermittent hypoxia" ET "rodent" OU "mice" OU "rat". Sur la liste des articles renvoyés par les bases de données, nous avons tout d'abord sélectionné les études pertinentes sur la base des résumés (2 lecteurs indépendants). Tous les articles rédigés en anglais et ayant étudié l'effet de l'hypoxie intermittente sur des paramètres vasculaires chez les rongeurs ont été inclus. Ensuite, tous ces articles ont été lus intégralement et sélectionnés selon des critères d'inclusion et d'exclusion. Les critères d'inclusion sont : la présence d'un groupe témoin normoxique, des cycles d'hypoxie intermittente répétitive au cours de la même journée pendant au moins un jour, des rongeurs de phénotype sauvage (à l'exception des rongeurs ApoE^{-/-} qui ont été également inclus pour analyser la taille des lésions d'athérosclérose), l'étude de la pression artérielle ou d'au moins un paramètre caractérisant la structure ou la fonction vasculaire (réactivité artérielle, remodelage et taille des lésions d'athérosclérose). Nous avons exclu les études sans groupe témoin normoxique, les études utilisant l'hypoxie continue ou l'hypoxie intermittente associée à des conditions hypercapniques ou hypobares, les études utilisant l'hypoxie intermittente pendant des périodes prénatales ou néonatales, les études analysant des paramètres vasculaires sur des artères pulmonaires, rétiniennes ou cérébrales et enfin toutes les études réalisées sur des animaux transgéniques, à l'exception des souris ApoE^{-/-}.

La qualité des études a été évaluée à l'aide de l'outil SYRCLE qui décrit différents risques de biais : biais de sélection (sélection des groupes selon les caractéristiques des animaux au départ), biais de performance (absence de randomisation au niveau des cages, pas de traitement en aveugle des animaux), biais de détection (pas de randomisation des animaux pour les analyses, pas de mesure en aveugle des paramètres biologiques), biais d'attrition (données manquantes) et biais de déclaration (déclaration sélective des résultats). Chaque risque de biais est noté comme élevé, faible ou peu clair (Hooijmans et al., 2014).

Pour chaque critère de jugement, les résultats ont été exprimés en différence moyenne standardisée, $SMD = ((Mc - Me)) / SD$, où Mc est la moyenne de la mesure dans le groupe normoxique, Me est la moyenne de la mesure dans le groupe hypoxique, et SD est l'écart type combiné des deux groupes. Selon les standards internationaux, l'effet est considéré comme important quand $SMD > 0,8$, modéré quand la SMD est entre 0,5 et 0,8 et faible quand la SMD est entre 0,2 et 0,5.

3. Principaux résultats

Nous avons inclus 125 études, 112 chez des rongeurs de phénotype sauvage et 13 chez des souris ApoE^{-/-}.

Effet de l'hypoxie intermittente sur les pressions artérielles

Notre méta-analyse a démontré que l'hypoxie intermittente augmente significativement les pressions artérielles systolique, diastolique et moyenne. L'augmentation est d'environ 13 mmHg ($SMD = 1.43$, CI [1.13-1.73]) pour la pression artérielle moyenne. Les analyses de méta-régression sur les paramètres de l'hypoxie intermittente ont montré qu'une durée d'exposition plus longue et une FiO_2 plus sévère ont tendance à être associées à un effet plus important de l'hypoxie intermittente sur la pression artérielle moyenne.

Effet de l'hypoxie intermittente sur la réactivité vasculaire

Concernant la réactivité sur des artères canulées et sur des anneaux d'artères, les tests de vasodilatation ont montré que la réponse vasodilatatrice à $10^{-6}M$ d'acétylcholine diminue significativement suite à l'exposition à l'hypoxie intermittente ($SMD = -1,26$ [-2,10;-0,41] pour les artères canulées, et $SMD = -2,53$ [-4,06 ; -1,00] pour les anneaux artériels). Cet effet est conséquent chez les rongeurs mâles ($SMD = -1,78$ [-3,12 ; -0,44]) mais très faible chez

les rongeurs femelles (SMD = 0,12 [-1,82 ; 2,06]). Les tests de vasoconstriction ont montré que l'hypoxie intermittente augmente la réponse des artères à 10^{-8} M d'endothéline-1 (SMD=1,11 [0,22 ; 2,01]) mais pas à 10^{-6} M de phényléphrine (SMD=0,04 [-0,6; 0,68]).

Effet de l'hypoxie intermittente sur le remodelage vasculaire

Notre méta-analyse a montré que l'hypoxie intermittente augmente l'épaisseur intima-média (SMD = 1,10 [0,58 ; 1,62]), ce qui correspond à une augmentation moyenne d'environ 5,23 μ m. Cet effet est plus marqué chez la souris (SMD = 1,34 [0,55 ; 2,14]) que chez le rat (SMD = 0,40 [-0,13 ; 0,93]), et chez les rongeurs jeunes (association négative entre l'âge et l'épaisseur intima-média). L'analyse de méta-régression multivariée a montré une association positive significative entre la durée totale d'exposition et l'épaisseur intima-média.

Effet de l'hypoxie intermittente sur les lésions d'athérosclérose

Chez les souris ApoE^{-/-}, notre méta-analyse a montré que l'HI augmente fortement les lésions d'athérosclérose chez les souris ApoE^{-/-} (SMD = 1,08 [0,80 ; 1,37]). Aussi, le poids corporel des souris tend à être associé avec la taille des lésions (p = 0,06).

4. L'article



Early View

Review

Intermittent hypoxia-related alterations in vascular structure and function: a systematic review and meta-analysis of rodent data

Olfa Harki, Quentin Boete, Jean-Louis Pépin, Claire Arnaud, Elise Belaidi, Gilles Faury, Charles Khouri, Anne Briançon-Marjollet

Please cite this article as: Harki O, Boete Q, Pépin J-L, *et al.* Intermittent hypoxia-related alterations in vascular structure and function: a systematic review and meta-analysis of rodent data. *Eur Respir J* 2021; in press (<https://doi.org/10.1183/13993003.00866-2021>).

This manuscript has recently been accepted for publication in the *European Respiratory Journal*. It is published here in its accepted form prior to copyediting and typesetting by our production team. After these production processes are complete and the authors have approved the resulting proofs, the article will move to the latest issue of the ERJ online.

Intermittent hypoxia-related alterations in vascular structure and function: a systematic review and meta-analysis of rodent data

Olfa Harki¹, Quentin Boete¹, Jean-Louis Pépin¹, Claire Arnaud¹, Elise Belaidi¹, Gilles Faury¹, Charles Khouri^{1,2*}, Anne Briançon-Marjollet^{1*}

¹ Univ. Grenoble Alpes, INSERM , CHU Grenoble Alpes, HP2, 38000 Grenoble, France

² Pharmacovigilance Unit & Clinical Pharmacology Department, Grenoble Alpes University Hospital, Grenoble, France

*Co-last authors have equally contributed to the work.

Corresponding authors:

Dr Anne Briançon-Marjollet
Laboratoire HP2, INSERM U1300
Bâtiment Jean Roget, Site Santé La Tronche
38042 Grenoble Cedex 9
France
anne.briancon@univ-grenoble-alpes.fr
+33 476 63 74 75
Twitter @LaboratoireHP2

Dr Charles Khouri
Centre Régional de Pharmacovigilance, CHU Grenoble Alpes
38043 Grenoble Cedex 09, France
Tel : [+33 4 76 76 51 45](tel:+33476765145)
CKhouri@chu-grenoble.fr

Abbreviated title: Intermittent hypoxia alters vascular structure and function

Key Words: Systematic review, meta-analysis, intermittent hypoxia, arterial pressure, vascular reactivity, vascular remodeling.

Take-home message : Our meta-analysis of rodent studies firmly establishes that intermittent hypoxia, as a model of obstructive sleep apnea, alters vascular pressure, remodeling and reactivity. Severity of IH and rodent characteristics contribute to this impact.

Abstract

Obstructive Sleep Apnea and the related intermittent hypoxia (IH) are widely recognized as risk factors for incident cardiovascular diseases. Numerous studies support the deleterious vascular impact of IH in rodents but an overall interpretation is challenging owing to heterogeneity in rodent species investigated and the severity and duration of IH exposure.

To clarify this major issue, we conducted a systematic review and meta-analysis to quantify the impact of IH on systemic artery structure and function depending on the different IH exposure designs.

We searched PubMed, Embase and Web of Sciences and included 125 articles in a meta-analysis, among them 112 using wild-type rodents and 13 using Apolipoprotein E knock-out mice. We used the standardized mean difference (SMD) to compare results between studies.

IH significantly increased mean arterial pressure (+ 13.90 mmHg (95% CI [11.88; 15.92])), systolic and diastolic blood pressure. Meta-regressions showed that mean arterial pressure change was associated with strain and year of publication. IH altered vasodilation in males but not in females, and increased endothelin-1-induced, but not phenylephrine-induced, vasoconstriction. Intima-media thickness significantly increased upon IH exposure (SMD 1.10 [0.58; 1.62], absolute values: +5.23 (2.81-7.84)). This increase was observed in mice but not in rats, and was negatively associated with age. Finally IH increased atherosclerotic plaque size in ApoE^{-/-} mice (SMD 1.08 [0.80; 1.37]).

To conclude, our meta-analysis established that IH, independently of other confounders, has a strong effect on vascular structure and physiology. Our findings support the interest of identifying and treating sleep apnea in routine cardiology practice.

Introduction

Obstructive Sleep Apnea Syndrome (OSAS) is one of the most frequent chronic diseases, affecting up to nearly one billion individuals worldwide,¹ and is characterized by the repetitive occurrence of apneas and hypopneas during sleep². OSAS is widely recognized as a risk factor for prevalent and incident cardiovascular (CV) diseases including hypertension, atherogenesis, stroke, and myocardial infarction, thus leading to increased morbidity and mortality²⁻⁴. Among OSAS pathophysiological mechanisms, intermittent hypoxia (IH) caused by repetitive hypoxia-reoxygenation cycles is thought to be the key intermediary mechanism leading to CV morbidity and mortality^{2,5,6}. However, clinical studies are frequently partly flawed by confounders and the role of IH as an independent cardiovascular risk factor is still debated. It is crucial to establish from robust and consistent experimental data the role of IH in increasing cardiovascular risk so as to better understand its contribution toward cardiovascular diseases.

Among OSA animal models developed in the last decades⁵, IH exposure in rodents is by far the most commonly used worldwide. Studies on rodents exposed to IH have allowed to dissect the contribution of different pathophysiological pathways and intermediary mechanisms, such as sympathetic nervous system activation, endothelial dysfunction, inflammation, or oxidative stress in triggering CV consequences. Many studies using animal models have supported the hypothesis that IH might be responsible for increased arterial blood pressure^{5,7}, structural vascular remodelling⁸⁻¹⁰, altered vascular reactivity^{11,12}, and atherosclerosis progression¹³⁻¹⁵. However, some studies showed no effect of IH on vascular parameters (for example¹⁶⁻¹⁹) and there was heterogeneity regarding effect size. Inconsistency between studies might be explained by disparity in rodent models and variations in patterns of IH exposure. Indeed, studies included mice or rats, predominantly males, but from different strains, of different ages and weights at baseline, and on different diets (standard versus high fat diet). There were also variations regarding the studied vascular beds, from large elastic to small muscular arteries, which might potentially account for substantial variability. Last but not least, IH patterns differed across studies. Animals were exposed to IH severities ranging from 5 to 10% FiO₂, hypoxic phases varied from 6 to 12 hours per day, and desaturation-reoxygenation sequences lasted from 20 seconds to a few minutes with the total duration of IH exposure ranging from a few days to up to several weeks or months.

With the goal of clarifying and strengthening our knowledge, we carried out a systematic review and meta-analysis addressing the overall impact of IH on vascular parameters, namely blood pressure, vascular remodeling, arterial function and atherosclerotic lesions in systemic arteries. Subgroup analyses and meta-regressions were performed to identify the main factors accounting for

heterogeneity in results, with particular interest in assessing different rodent models and IH cycle characteristics.

Methods

The protocol for the meta-analysis was recorded in the PROSPERO registry under the number CRD42020169940 (https://www.crd.york.ac.uk/prospero/display_record.php?ID=CRD42020169940). Owing to the very large amount of available data, this work focuses on structural and functional vascular outcomes.

Search methods and study selection

We searched Pubmed, Web of Science and EMBASE for articles published up to April 16th, 2021. The search terms were “Intermittent hypoxia” AND “Rodent” OR “mice” OR “rat” (see PROSPERO record for exact query). We also searched for keywords and MeSH related to each search term. After the initial electronic search, we screened the titles and the abstracts to retrieve relevant articles. Eligibility was considered if they were written in English and addressed vascular outcomes of intermittent hypoxia in rodents. Then, the full manuscripts were screened for inclusion and exclusion criteria. Two authors independently screened all references for inclusion, and discrepancies were resolved by discussion among the team.

We included only controlled studies with a well-established control group i.e. normoxic animals, for adult rodents exposed to chronic intermittent hypoxia. An intermittent hypoxia cycle was defined as the repetitive occurrence of several hypoxia-reoxygenation sequences during the same day. Chronic IH was defined as a repetition of IH cycles over time, for a minimum of one day. All wild-type rodent models (mouse and rat, male and female, young or aged, lean or obese) with exposure to intermittent hypoxia and compared to a normoxic group were included.

The outcomes considered as mandatory for inclusion were variables allowing characterization of vascular structure or function. This included blood pressure (systolic (SBP)/diastolic (DBP)/mean/pulsed), arterial reactivity (vasodilatory response to 10^{-6} M acetylcholine and vasoconstriction responses to 10^{-6} M phenylephrine or 10^{-8} M endothelin-1, both *ex vivo* in cannulated vessels or vessel rings); vascular remodeling (Intima-Media Thickness (IMT), internal vessel diameter), and atherosclerosis plaque size in apolipoprotein E knock-out (ApoE^{-/-}) mice.

We excluded studies without any control group (normoxic and untreated mice), studies in which hypoxia was applied continuously (i.e. no hypoxia-normoxia cycles), or studies in which hypoxia was combined with hypercapnic or hypobaric conditions. We also excluded studies using IH exposure in

prenatal or perinatal periods and studies using transgenic animals, except for ApoE -/- mice that are the model of choice to study atherosclerosis plaques. Studies on pulmonary, retinal or cerebral vascular beds were also excluded.

Assessment of methodological quality

The quality assessment of studies was performed using the SYRCLE tool described by Hooijmans et al.²⁰. This contains several types of bias: selection bias (sequence generation, baseline characteristics, and allocation concealment), performance bias (randomized housing of animals, blinding of investigators), detection bias (random outcome assessment, blinding of outcome assessor), attrition bias (incomplete outcome data), and reporting bias (selective outcome reporting). Each risk of bias was scored as High, Low, or Unclear. Three authors were involved and every discrepancy was discussed to achieve a shared decision.

Statistical analysis

We performed two separate meta-analyses for wild-type rodents and ApoE-/- mice. For each outcome, data were abstracted and analyzed using standardized mean difference, $SMD = ((Mc - Me)) / SD$, where Mc is the mean of the outcome measure in the control group, Me is the mean of the outcome measure in the experimental group, and SD is the pooled standard deviation of the two groups.²¹ A $SMD > 0.8$ was considered as large, 0.5-0.8 as moderate, and 0.2-0.5 small²². In case of a missing SD we calculated or estimated it from confidence intervals, standard errors, t values, P values or F values.²³ The remaining SD were imputed using the mean outcome-specific SD from other included studies. All results are represented using orchard plots, an innovative data visualization tool well adapted for displaying the results of a large number of outcomes²⁴ (supplementary figure 1).

To facilitate interpretation of some results, we also performed meta-analyses using natural mean differences for arterial pressure outcomes. We have back-transformed SMD to natural mean differences using the median SD from the control groups of included studies using the target unit for IMT outcome^{25,25}. SMD are expressed with 95% confidence intervals. For study descriptions, we used medians and interquartile ranges (IQR).

Given the high anticipated heterogeneity in included studies we performed random effect meta-analysis by the restricted maximum-likelihood estimator method.²⁶ Moreover, to account for correlation among multi-arm studies we constructed a hierarchical/mixed effect model with a random intercept for study. We explored sources of heterogeneity through pre-specified subgroup analyses and meta-regressions according to population (species, strain, gender, age, diet and body

weight), year of publication and details of intermittent hypoxia protocols (oxygen fraction (FiO₂) during hypoxic phases, duration of hypoxic and normoxic phases, frequency, duration per day and total duration of exposure).

Given the large number of studied outcomes, we performed meta-regressions only on pre-specified primary outcomes: mean arterial blood pressure (MAP), intima-media thickness, response of vessel rings to acetylcholine, and atherosclerosis lesion size in ApoE^{-/-} mice. We first performed univariate meta-regressions on study and animal characteristics (age and body weight were adjusted on species). Then, we added the significant predictors ($p < 0.2$) in meta-regression models evaluating intermittent hypoxia (IH) protocol parameters. Given the exploratory nature of these analyses we considered all p -values < 0.05 as significant. Lastly, to assess the robustness of the findings, we performed sensitivity analyses by excluding potential outliers for significant meta-regressions.

Funnel plot asymmetry was also explored for primary outcomes using Egger's regression test, as recommended by the Cochrane handbook for systemic reviews of interventions²⁷, with $p < 0.1$ suggesting publication bias. We also performed a Trim and Fill analysis to assess the impact of small study effects on the meta-analyses results²⁸.

All statistical analyses were performed using R statistical software (version 3.6.2).

Results

Our literature review yielded 5127 references among which we ultimately selected 125 studies for inclusion in the meta-analysis, 112 in wild-type rodents and 13 using ApoE^{-/-} mice (Figure 1). Supplementary table 1 and supplementary figure 2 present vascular outcomes available across the studies, settings of hypoxic exposure and experimental designs.

Among the 112 studies on wild-type rodents, 24 were performed in mice (23 in C57Bl/6 mice, 1 in 129S1 mice) and 88 in rats (60 in Sprague-Dawley, 24 in Wistar and 4 in other strains of rats). At study inclusion, median body weight and age were 25.75g (IQR 22.1-27.1) and 8.0 (7-11) weeks for mice and 275g (200-325) and 9 (8-12.7) weeks for rats respectively. Males were used in 103 studies, females in 4 studies, both males and females in one study, and 4 studies did not report the sex of the animals. Animals received standard diet in 93 studies, high-fat diet in one study and both standard and high-fat diet in 4 studies; diet was not specified in 13 studies.

For the studies in ApoE^{-/-} mice, median weight was 27g (25.9-29.5) and median age was 12 (8- 14) weeks. Nine studies used males, 3 used both males and females and 1 did not report the sex. The diet was standard in 5 studies, high fat in 6 studies and both standard and high fat in 2 studies.

Concerning IH protocols (Supplementary figure 2), median and IQ values of FiO₂ during hypoxic periods were of 5.25% (IQR 5-9), desaturation during 60 (30-102.5) seconds followed by 90 (30-217.5) seconds of reoxygenation and return to a FiO₂ of 21% (normoxia). Cycles were repeated on average for 8h/day for a median duration of 21 (10-35) days. Forty-three percent of studies used a FiO₂ of 5%, 11% used a FiO₂ of 6%, and 19% used a FiO₂ of 10% during hypoxic phases. Fourteen percent of studies had a duration of 7 days, 19% a duration of 14 days, 11% a duration of 21 days, 8% a duration of 28 days and 22% a duration of 35 days, in total 14% of studies exposed for ≥42 days.

The number of included studies for each outcome is shown in supplementary table 1. Outcomes were excluded from statistical analysis when <3 studies reported them. In wild-type animals, this was the case for pulsed arterial pressure, atherosclerotic plaques, endothelial permeability, vasoconstriction in cannulated vessels, compliance/pulse wave velocity. In ApoE^{-/-} mice, this was the case for all outcomes except for lesion size.

Impact of IH on arterial blood pressure

Intermittent hypoxia significantly increased systolic, diastolic and mean arterial pressure in systemic vessels of wild-type rodents (Figure 2A-C). Mean arterial pressure (MAP) SMD was 1.43, CI [1.13-1.73], $I^2 = 75.85\%$ corresponding to a mean increase of 13.90 mmHg (CI [11.88; 15.92]) after IH. Similarly, SBP increased by 13.13 [10.80; 15.47] mmHg, and DBP by 12.24 [9.01; 15.47] mmHg. Forest plots for SBP, DBP and MAP expressed in mmHg are shown in Supplementary Figure 3A, B, C.

Subgroup analyses showed a significant heterogeneity according to strain (test for subgroup difference <0.01): MAP increased in mice (C57Bl/6) as well as in rats (Wistar and Sprague Dawley) but not in Fischer 344, Wistar Kyoto or lean Zucker rats, although the number of studies was very limited for these strains (Table 1 and supplementary figure 4). Meta-regression analyses for IH parameters after adjustment for significant confounders in univariate meta-regression (strain and year of publication) showed that a lower FiO_2 during hypoxic phases and total duration of exposure tended to be associated with a higher MAP ($p=0.11$ and $p=0.07$, respectively). Moreover, total duration of exposure was significantly associated with MAP in multivariate meta-regressions after adjusting for all IH parameters ($p=0.046$).

Impact of IH on arterial reactivity

Vasodilation tests, assessed on cannulated arteries as well as on arterial rings, showed that reactivity to Ach ($10^{-6}M$) significantly decreased after IH in both cannulated arteries SMD=-1.26 [-2.10;-0.41], $I^2 = 62.1\%$ (Figure 3A), and arterial rings SMD=-2.53 [-4.06;-1.00], $I^2 = 93.29\%$ (Figure 3B). IH also increased vasoconstriction due to endothelin-1 ($10^{-8}M$) (SMD=1.11 [0.22; 2.01], $I^2 = 41.82\%$) (Figure 3C). On the other hand, there was no impact of IH on the vasoconstriction induced by phenylephrine ($10^{-6}M$) (SMD=0.04 [-0.6; 0.68], $I^2 = 41.82\%$) (Figure 3D).

Subgroup analyses showed that the IH-induced decrease in Ach-dependent vasodilation was observed in male but not in female rodents (SMD 0.12 [-1.82; 2.06] in females vs -1.78 [-3.12; -0.44] in males, $p<0.01$) (supplementary figure 5). Meta-regression analyses for IH parameters after adjustment for the significant confounder in univariate meta-regression (sex) showed that FiO_2 was significantly associated with vasodilation impairment, especially at moderate hypoxia levels (i.e. in the range of 10% FiO_2) (Figure 3E and Table 1). However, after adjusting for the other IH parameters, this association did not persist ($p=0.15$).

Impact of IH on vascular remodeling

In wild-type rodents, intima-media thickness significantly increased after IH (SMD 1.10 [0.58; 1.62], $I^2 = 76.5\%$) (Figure 4A) with an increase of IMT of 5.23 (2.81-7.84) μm . In contrast, inner vessel diameter did not significantly change after IH (Figure 4B). Subgroup analyses for IMT showed a much stronger effect of IH in mice (SMD 1.34 [0.55; 2.14]) than in rats (SMD 0.40 [-0.13; 0.93]) ($p=0.03$ for subgroup difference) (supplementary figure 6). Univariate analysis also showed that age was negatively associated with IMT thickening ($p=0.014$, Figure 4C and table 1). Meta-regression analysis for IH parameters after adjustment for significant predictors in univariate meta-regression (strain, species, year of publication and age) were not significant for IMT at a p -value of 0.05, but total duration of exposure tended to be associated with IMT thickening ($p=0.07$) (Figure 4D and table 1). After adjustment for other IH parameters in multivariate metaregression, duration of exposure was significantly associated with IMT ($p=0.046$).

Impact of IH on atherosclerosis lesions in ApoE^{-/-} mice

Since vascular remodeling is an early step in the process of atherogenesis and because wild-type C57Bl/6 mice are resistant to atherosclerosis, we included ApoE^{-/-} mice in the meta-analysis, as a recognized model of susceptibility to atherosclerosis. The analysis showed that IH strongly increased atheromatous lesion size in ApoE^{-/-} mice (SMD 1.08 [0.80; 1.37], $I^2 = 27.5\%$) (Figure 5). Meta-regression analysis for IH parameters showed that IH parameters were not significantly associated with lesion size in ApoE^{-/-} mice, except for a strong trend towards significance regarding the animal's body weight ($p=0.06$) (table 1).

Risk of bias of studies

The risk of bias of studies was assessed using the SYRCLE tool²⁰. The results are presented in Supplementary Figure 7 and supplementary table 2. Items for which the risk of bias was low were selective outcome reporting (selection bias, 35% low risk), sequence generation (39% of studies are at low risk), baseline characteristics (48% low risk) and incomplete outcome data (attrition bias, 56% low risk). However, incomplete outcome data was also the criterion with the highest percentage of high-risk studies (23%). Finally, several outcomes, mainly categorized as performance and detection bias, were almost never mentioned and therefore scored as "unclear risk": allocation concealment,

randomized housing, blinding of investigators, random outcome assessment, blinding of outcome assessor.

Small study effect

Funnel plots are presented in supplementary figure 8 for MAP, ring dilation, IMT and plaque size. For these four items, the asymmetric distribution of studies and a significant Egger regression test indicating a clear small study effect were observed. However, the SMD remained significant for all outcomes after correcting for missing studies (Trim and Fill analysis), meaning a consistent effect of IH on the outcomes (Supplementary table 3).

Discussion

One of the main features of obstructive sleep apnea syndrome is intermittent hypoxia which represents the major trigger for cardiovascular complications²⁹. A large corpus of studies in animals report diverse effect sizes for the impact of intermittent hypoxia on vascular parameters such as arterial pressure, altered vascular reactivity or remodeling. However, there is heterogeneity or even inconsistencies among the published results and, to date, no meta-analysis has been done to assess the impact of IH on these specific parameters. Our meta-analysis firmly establishes that intermittent hypoxia, in the absence of the confounders flawing human studies, triggers blood pressure elevation, alterations in vasodilation and atherosclerosis. Some of these responses were proportional to the hypoxic burden and duration of exposure. Another lesson was to delineate the different responses depending on the species, strains, sex and age of exposed animals.

Impact of IH on vascular parameters

Our meta-analysis confirmed that IH has a clear and significant impact on the primary outcomes: arterial pressure, vessel reactivity, intima-media thickness and atherosclerotic lesions (standard mean differences always > 0.7). This is consistent with the known vascular effects of OSAS^{3,29}, supporting the relevance of these IH models in rodents to the human pathology. In particular, while clinical studies are often difficult to interpret due to comorbidities, rodent studies suggest that IH per se may be the main cause of the vascular consequences of OSA.

Our meta-analysis showed that IH is associated with a significant increase in MAP, which is consistent with the elevation in sympathetic activity and blood pressure occurring in healthy volunteers submitted to 14 nights of intermittent hypoxia³⁰. Interestingly, despite the lack of

significance meta-regression analyses suggest that FiO_2 (i.e. the hypoxic burden) tended to be associated with MAP ($p=0.11$), suggesting that the severity of hypoxia could be a key element for increased risk of hypertension. This could be of high clinical significance since epidemiological studies^{31,32} already suggest a dose response relationship between OSA severity, as defined by the Apnea-Hypopnea Index, and hypertension. Also, responses to continuous positive airway pressure, the primary therapy for OSA, is related to the severity of hypoxia at the time of OSA diagnosis (see meta-analyses^{33,34}). This suggests that beyond confounders (such as obesity or metabolic syndrome) IH may be the main parameter accounting for increased blood pressure in OSA. It also suggests that parameters such as minimal oxygen saturation or time spent at $<90\%$ oxygen saturation should be used to describe more precisely OSA severity and hypoxic burden, rather than the AHI which does not necessarily reflect the patient's hypoxic burden.

In vascular reactivity studies, we observed that IH significantly altered endothelium-dependent vasodilation in response to acetylcholine. This is in line with studies in humans suggesting that OSA alters endothelial function³⁵, and is associated with arterial stiffness^{36,37}. Our group recently reported in an individual participant meta-analysis that among adults without overt CV disease, severe OSA (AHI ≥ 30) was independently associated with an increased risk of endothelial dysfunction that may predispose to late CV events³⁸. Moreover, vasoconstriction in response to endothelin-1 was enhanced, while vasoconstriction in response to phenylephrine was not altered by IH. Other vasoconstrictors, such as angiotensin II, have only been sparsely studied and the lack of data did not allow a meta-analysis. Interestingly, endothelin-1-induced vasoconstriction was largely studied with IH protocols that included $5\% \text{CO}_2$ in the air breathed by animals. IH combined with hypercapnia also increased the contractile response to ET-1^{39,40}. Our meta-analysis thus suggests that IH, rather than hypercapnia, may thus be responsible for the ET-1 response.

In this meta-analysis, we did not have sufficient statistical power to allow comparison of the reactivity of different vascular beds after IH. However, some studies report some differences in the reactivity among vascular beds, in particular in small muscular vs large elastic arteries⁴⁰. More studies are needed to allow a meta-analysis on the effects on various vascular beds.

IH-induced vascular remodeling in rodents, as characterized by an augmentation in the intima-media thickness, is consistent with what is observed in humans^{41,42}. Our results are also consistent with a recent meta-analysis limited to aorta IMT in mice⁴³. Although not reaching significance in univariate analysis ($p=0.07$), the IMT was associated with the total duration of exposure in multivariate analysis. This suggests a progressive remodeling of arteries over time. Interestingly, internal vessel diameter was not modified in rodents while, in humans, it is postulated that obstructive sleep apnea could

induce an increase in diameter, at least in some patients and vessels^{44,45}. IH models in rodents might rapidly attain the late characteristics of the disease such as thickening the media following changes in the inner diameter of vessels. Other remodeling parameters, such as compliance or elasticity, could not be included in our meta-analysis due to insufficient studies. However, IH in rodents is known to induce disorganization of the elastin fiber network^{9,46,47}, reduced vessel distension and increased stiffness^{48,49}. Taken together, IH induces structural remodeling along with alterations in vasoreactivity (blunted vasodilation and increased vasoconstriction) that could act synergistically to increase blood pressure.

Since increased IMT suggests ongoing atherogenesis in wild-type rodents, we included ApoE^{-/-} mice in the meta-analysis because they are susceptible to atherosclerosis and a model of choice to study the impact of IH on atherosclerotic lesions. As expected, we found that IH strongly increased atherosclerotic lesions, consistent with the remodeling observed in wild-type animals⁹, and with the known pro-atherogenic consequences of OSAS in humans^{50,51}. Interestingly, diet (standard vs high fat) did not significantly modulate plaque size after IH, suggesting that IH is a robust inducer of plaques, independent of a high fat diet.

We performed meta-regression analyses to determine whether the variability of IH protocols could modulate the impact of IH. Apart from the associations mentioned above, other meta-regressions found no significant effect of IH parameters on the selected vascular outcomes. This would suggest that IH has a robust impact on these outcomes, whatever the duration or severity of IH (in the range of our inclusion criteria). Interestingly, FiO₂ was always ≤ 10% in the included studies, corresponding to the very severe hypoxia that occurs in the most severe OSAS patients. A less severe hypoxic burden has been little investigated in animal experiment designs. This needs investigation in future animal studies because the impact of OSA treatments in reducing cardiovascular consequences is mostly debated for the mild to moderate spectrum of the disease.

Contribution of animal characteristics to IH impact

In univariate analyses, we investigated the contribution of strain, sex, age, diet, body weight and year of publication on IH effects. The species and/or the strain significantly impacted MAP and IMT, suggesting that the choice of species/strain of mice or rats is important when designing a study. MAP is consistently elevated in the most frequently used models such as C57Bl/6 mice, or Sprague-Dawley or Wistar rats. However, MAP was not found to be elevated in Fischer, Wistar kyoto or lean Zucker rats; although the very small number of studies using these strains probably accounts for this absence of statistical effect. Vascular remodeling as assessed by IMT is much more pronounced in

mice than in rats; rats may thus not be a good model to study remodeling. Our meta-analysis may help researchers to choose the most appropriate models according to the objectives of their study.

Analysis by sex showed that the alteration of vessel dilation induced by IH is found in males, but not in females, despite the small number of studies using females (n=5), suggesting a robust difference in the impact of IH on vasodilation between males and females. This may reflect a sex-related sensibility to the IH stimulus regarding this particular outcome, consistent with the known stimulation of endothelial-dependent vasodilation by oestrogens⁵². It may underlie the fact that, although most OSAS patients are men, specific studies of the vascular consequences of OSAS in women are necessary, although they are under-represented in the current literature^{36,53}.

Animal age was inversely associated with IH-induced intima-media thickening, suggesting that young animals may be more sensitive to IH in terms of vascular remodeling. This is consistent with data in humans³⁴. Age had no significant association with other parameters. However, the vast majority of studies were performed in young animals (8-9 weeks old) and the very few using animals older than 50 weeks had to be considered as outliers. There is a lack of information about the effects of IH in older animals, indicating a need for further studies, particularly as obstructive sleep apnea is predominant in humans aged over 50 and not in young adults.

Beside predominantly using young and male animals, animal models currently used present some limitations regarding their relevance for clinical picture of OSA. First, only the IH component of sleep apnea is modelled, while sleep fragmentation and increased respiratory efforts are not considered in the IH models. IH is generally applied during daytime corresponding to rodent's sleep, but in some cases, IH has been applied in awake animals. Moreover, in most models CO₂ is not controlled as OSA-related intermittent hypercapnia is difficult to mimic. Finally, intermittent hypoxia applied to animals is generally severe : 43% of studies use a FiO₂ of 5% corresponding to severe OSA with SaO₂ ranges achieving 60-80%⁵, and only 19% of studies use a FiO₂ of 10% corresponding to SaO₂ variations encountered in moderate to severe OSA patients⁵. There is a need for implementing international consensus statements for fixing shared experimental protocols of IH exposures in terms of severity, circadian alignment and CO₂ monitoring.

Risk of bias and limitations of the analysis

Funnel plots and Egger regression tests evidenced a small study effect for all the outcomes studied. Such an effect could have multiple reasons: selective reporting of results or publication bias, non-exhaustive research strategy, poor methodological quality of small studies leading to overestimation

of results, true heterogeneity in the results or chance⁵⁴. One of the potential limitations of our research strategy is the exclusion of non-English language studies because of the difficulty to assess the eligibility criteria of such studies, notably regarding IH protocols. However, interestingly the SMD remained stable for the four main outcomes after the Trim and Fill analyses correcting for missing values, suggesting a limited impact of the small study effect on the results. A publication bias is not unusual in animal studies and is probably mainly due to selective reporting such as non-publication of negative results and selection of publishable outcomes. This could be associated with the frequent reluctance of journals to publish negative results. To avoid this reporting bias, we suggest that journals accept to publish animal study protocols or negative results, and authors to pre-register their protocols as is done for clinical studies. For many of the listed items the risk of bias assessed with the SYRCLC risk of bias tool was quite high. This is in line with the poor SYRCLC scores in many other animal study meta-analyses. We argue for improvement of research and publication practices with regard to laboratory animal studies and the widespread adoption and implementation of the SYRCLC guidelines.

Another limitation of this meta-analysis was the heterogeneity of the outcomes and units of measurement. The use of SMD was intended to deal with this, but our analyses still showed strong heterogeneity for most of the outcomes studied. Statistical analyses only partly succeeded in identifying factors that could explain this heterogeneity, although some characteristics such as species, sex or certain IH properties were suggested. There may be other underlying factors that could potentially explain the heterogeneity of results that were not investigated in our study, such as laboratory-, experimentation- or investigator-dependent effects.

Conclusion

To our knowledge, this is the first meta-analysis of animal studies on the vascular impact of intermittent hypoxia. The meta-analysis based on a large corpus of articles evidenced the clear impact of IH on arterial pressure, reactivity and vascular remodeling. We identified some features of IH, in particular FiO_2 during hypoxia, which were sometimes associated with an amplified impact of IH. However, in most cases the impact of IH was independent of the precise pattern of IH exposure, suggesting that whatever its modality, aimed at mimicking obstructive sleep apnea in humans, IH had a robust effect on rodent vessel structure and function.

Funding

This work was supported by the “Fondation du Souffle / Fondation pour la Recherche en Santé Respiratoire” (PhD fellowship for O.H.), Fondation de l’Avenir, Fondation Agir Pour les Maladies Chroniques, and ANR Arterylastic grant ANR-18-CE-18-0001 (PhD fellowship for Q.B.).

Acknowledgments

The authors thank Axel Couturier for helpful discussions and Alison Foote for critical reading and English editing.

References

1. Benjafield, A. V. *et al.* Estimation of the global prevalence and burden of obstructive sleep apnoea: a literature-based analysis. *Lancet Respir. Med.* **7**, 687–698 (2019).
2. Lévy, P. *et al.* Obstructive sleep apnoea syndrome. *Nat. Rev. Dis. Primer* **1**, 15015 (2015).
3. Ryan, S. Mechanisms of cardiovascular disease in obstructive sleep apnoea. *J. Thorac. Dis.* **10**, S4201–S4211 (2018).
4. Javaheri, S. *et al.* Sleep Apnea: Types, Mechanisms, and Clinical Cardiovascular Consequences. *J. Am. Coll. Cardiol.* **69**, 841–858 (2017).
5. Dematteis, M. *et al.* Cardiovascular consequences of sleep-disordered breathing: contribution of animal models to understanding the human disease. *ILAR J.* **50**, 262–281 (2009).
6. Ryan, S. *et al.* Understanding the pathophysiological mechanisms of cardiometabolic complications in obstructive sleep apnoea: towards personalised treatment approaches. *Eur. Respir. J.* **56**, 1902295 (2020).
7. Fletcher, E. C., Lesske, J., Culman, J., Miller, C. C. & Unger, T. Sympathetic denervation blocks blood pressure elevation in episodic hypoxia. *Hypertens. Dallas Tex* 1979 **20**, 612–619 (1992).
8. Yang, R. *et al.* Restoring leptin signaling reduces hyperlipidemia and improves vascular stiffness induced by chronic intermittent hypoxia. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **300**, H1467-1476 (2011).
9. Arnaud, C. *et al.* The inflammatory preatherosclerotic remodeling induced by intermittent hypoxia is attenuated by RANTES/CCL5 inhibition. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **184**, 724–731 (2011).
10. Gras, E. *et al.* Endothelin-1 mediates intermittent hypoxia-induced inflammatory vascular remodeling through HIF-1 activation. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985 **120**, 437–443 (2016).
11. Totoson, P. *et al.* Atorvastatin protects against deleterious cardiovascular consequences induced by chronic intermittent hypoxia. *Exp. Biol. Med. Maywood NJ* **238**, 223–232 (2013).

12. Phillips, S. A., Olson, E. B., Morgan, B. J. & Lombard, J. H. Chronic intermittent hypoxia impairs endothelium-dependent dilation in rat cerebral and skeletal muscle resistance arteries. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **286**, H388-393 (2004).
13. Savransky, V. *et al.* Dyslipidemia and atherosclerosis induced by chronic intermittent hypoxia are attenuated by deficiency of stearoyl coenzyme A desaturase. *Circ. Res.* **103**, 1173–1180 (2008).
14. Arnaud, C., Poulain, L., Lévy, P. & Dematteis, M. Inflammation contributes to the atherogenic role of intermittent hypoxia in apolipoprotein-E knock out mice. *Atherosclerosis* **219**, 425–431 (2011).
15. Drager, L. F. *et al.* Chronic intermittent hypoxia induces atherosclerosis via activation of adipose angiopoietin-like 4. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **188**, 240–248 (2013).
16. Lee, M. Y. K. *et al.* Low but not high frequency of intermittent hypoxia suppresses endothelium-dependent, oxidative stress-mediated contractions in carotid arteries of obese mice. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985* **125**, 1384–1395 (2018).
17. Lefebvre, B. *et al.* Functional assessment of vascular reactivity after chronic intermittent hypoxia in the rat. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **150**, 278–286 (2006).
18. Tuleta, I. *et al.* Hypoxia-induced endothelial dysfunction in apolipoprotein E-deficient mice; effects of infliximab and L-glutathione. *Atherosclerosis* **236**, 400–410 (2014).
19. Zhou, S. *et al.* Deletion of metallothionein exacerbates intermittent hypoxia-induced oxidative and inflammatory injury in aorta. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2014**, 141053 (2014).
20. Hooijmans, C. R. *et al.* SYRCLE's risk of bias tool for animal studies. *BMC Med. Res. Methodol.* **14**, 43 (2014).
21. Cohen, J. *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*. (Routledge, 1988).
22. Carson, C. The effective use of effect size indices in institutional research. *Citováno Dne* **11**, 2016 (2012).

23. Higgins, J. & Green, S. (editors). Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions. Version 5.1.0 [updated March 2011]. The Cochrane Collaboration. <http://handbook.cochrane.org/> (2011).
24. The orchard plot: Cultivating a forest plot for use in ecology, evolution, and beyond - Nakagawa - - Research Synthesis Methods - Wiley Online Library. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jrsm.1424>.
25. Murad, M. H., Wang, Z., Chu, H. & Lin, L. When continuous outcomes are measured using different scales: guide for meta-analysis and interpretation. *BMJ* **364**, k4817 (2019).
26. Viechtbauer, W. & others. Conducting meta-analyses in R with the metafor package. *J Stat Softw* **36**, 1–48 (2010).
27. Higgins, J. *et al.* Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions version 6.1 (updated September 2020). in Available from www.training.cochrane.org/handbook. (Cochrane, 2020).
28. Duval, S. & Tweedie, R. Trim and Fill: A Simple Funnel-Plot–Based Method of Testing and Adjusting for Publication Bias in Meta-Analysis. *Biometrics* **56**, 455–463 (2000).
29. Lévy, P. *et al.* Obstructive sleep apnoea syndrome. *Nat. Rev. Dis. Primer* **1**, 15015 (2015).
30. Tamisier, R. *et al.* 14 nights of intermittent hypoxia elevate daytime blood pressure and sympathetic activity in healthy humans. *Eur. Respir. J.* **37**, 119–128 (2011).
31. Peppard, P. E., Young, T., Palta, M. & Skatrud, J. Prospective study of the association between sleep-disordered breathing and hypertension. *N. Engl. J. Med.* **342**, 1378–1384 (2000).
32. Young, T. *et al.* Population-based study of sleep-disordered breathing as a risk factor for hypertension. *Arch. Intern. Med.* **157**, 1746–1752 (1997).
33. Bratton, D. J., Gaisl, T., Wons, A. M. & Kohler, M. CPAP vs Mandibular Advancement Devices and Blood Pressure in Patients With Obstructive Sleep Apnea: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA* **314**, 2280–2293 (2015).

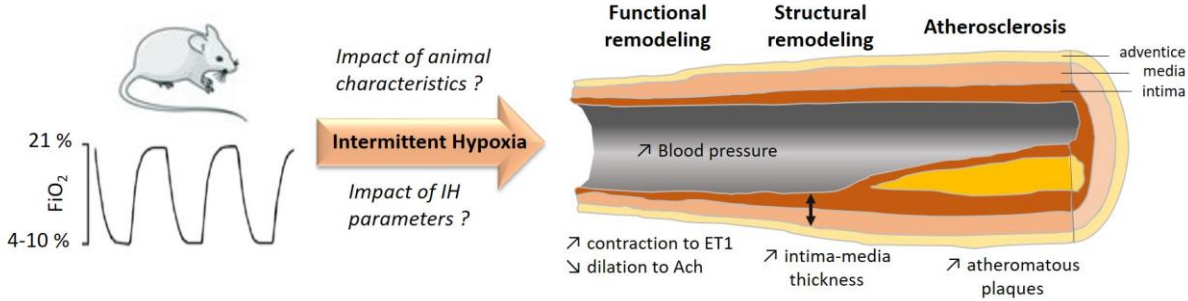
34. Pengo, M. F. *et al.* Obstructive sleep apnoea treatment and blood pressure: which phenotypes predict a response? A systematic review and meta-analysis. *Eur. Respir. J.* **55**, (2020).
35. Wang, Y. *et al.* Patients with Obstructive Sleep Apnea Display Decreased Flow-Mediated Dilatation: Evidence from a Meta-Analysis. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* **23**, 1069–1082 (2017).
36. Jenner, R. *et al.* Association of obstructive sleep apnea with arterial stiffness and nondipping blood pressure in patients with hypertension. *J. Clin. Hypertens. Greenwich Conn* **19**, 910–918 (2017).
37. Joyeux-Faure, M. *et al.* Contribution of obstructive sleep apnoea to arterial stiffness: a meta-analysis using individual patient data. *Thorax* **73**, 1146–1151 (2018).
38. Bironneau, V. *et al.* Sleep apnoea and endothelial dysfunction: An individual patient data meta-analysis. *Sleep Med. Rev.* **52**, 101309 (2020).
39. Allahdadi, K. J., Walker, B. R. & Kanagy, N. L. Augmented endothelin vasoconstriction in intermittent hypoxia-induced hypertension. *Hypertens. Dallas Tex 1979* **45**, 705–709 (2005).
40. Allahdadi, K. J., Walker, B. R. & Kanagy, N. L. ROK contribution to endothelin-mediated contraction in aorta and mesenteric arteries following intermittent hypoxia/hypercapnia in rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **293**, H2911-2918 (2007).
41. Nadeem, R. *et al.* Patients with obstructive sleep apnea display increased carotid intima media: a meta-analysis. *Int. J. Vasc. Med.* **2013**, 839582 (2013).
42. Zhou, M. *et al.* The Association Between Obstructive Sleep Apnea and Carotid Intima-Media Thickness: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Angiology* **68**, 575–583 (2017).
43. Umeda, A. *et al.* Effects of Normoxic Recovery on Intima-Media Thickness of Aorta and Pulmonary Artery Following Intermittent Hypoxia in Mice. *Front. Physiol.* **11**, (2020).
44. Tachikawa, R. *et al.* Impact of obstructive sleep apnea on abdominal aortic diameters. *Am. J. Cardiol.* **114**, 618–623 (2014).

45. Kwon, Y. *et al.* Obstructive sleep apnea and structural/functional properties of the thoracic ascending aorta: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Cardiology* **142**, 180–188 (2019).
46. Castro-Grattoni, A. L. *et al.* Intermittent Hypoxia-Induced Cardiovascular Remodeling Is Reversed by Normoxia in a Mouse Model of Sleep Apnea. *Chest* **149**, 1400–1408 (2016).
47. Rubies, C. *et al.* Aortic remodelling induced by obstructive apneas is normalized with mesenchymal stem cells infusion. *Sci. Rep.* **9**, 11443 (2019).
48. Phillips, S. A., Olson, E. B., Lombard, J. H. & Morgan, B. J. Chronic intermittent hypoxia alters NE reactivity and mechanics of skeletal muscle resistance arteries. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* **1985** **100**, 1117–1123 (2006).
49. Arnaud, C. *et al.* Nonmuscle Myosin Light Chain Kinase: A Key Player in Intermittent Hypoxia-Induced Vascular Alterations. *J. Am. Heart Assoc.* **7**, (2018).
50. Zhao, Y. Y. *et al.* Associations Between Sleep Apnea and Subclinical Carotid Atherosclerosis: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Stroke* **50**, 3340–3346 (2019).
51. Lévy, P. *et al.* Obstructive sleep apnea and atherosclerosis. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **51**, 400–410 (2009).
52. Miller, V. M. & Duckles, S. P. VASCULAR ACTIONS OF ESTROGENS: FUNCTIONAL IMPLICATIONS. *Pharmacol. Rev.* **60**, 210–241 (2008).
53. Cano-Pumarega, I. *et al.* Sleep Apnea and Hypertension: Are There Sex Differences? The Vitoria Sleep Cohort. *Chest* **152**, 742–750 (2017).
54. Page, M. J., Sterne, J. A. C., Higgins, J. P. T. & Egger, M. Investigating and dealing with publication bias and other reporting biases in meta-analyses of health research: A review. *Res. Synth. Methods* (2020) doi:10.1002/jrsm.1468.

Table 1. Meta-regression analyses for the main outcomes: MAP, dilation of artery rings, IMT, atherosclerosis lesions in ApoE^{-/-} mice (“ApoE lesion”). Bold figures indicate significance at p<0.05, ¥ p<0.2 indicates moderators included in the multivariate model to adjust meta-regressions on IH parameters.

Moderator	MAP			Arteries rings dilation			IMT			ApoE lesion		
	n	slope	p-val	n	slope	p-val	n	slope	p-val	n	slope	p-val
Univariate metaregressions												
Strain	112		0.00¥	16		0.47	28		0.05¥	25		0.86
Diet	102		0.62	16		0.37	NA			25		0.38
Species	112		0.10	16		0.47	28		0.03¥	NA		
Gender	110		0.85	14		0.00¥	23		0.96	24		0.39
Body weight	82	-0.001	0.07	12	0.041	0.06	17	-0.004	0.15¥	13	-0.145	0.06¥
Year of publication	112	0.029	0.05¥	16	-0.142	0.59	28	0.086	0.11¥	25	-0.038	0.38
Age	47	-0.015	0.15	12	0.0004	0.99	21	-0.026	0.014	20	0.012	0.72
Univariate adjusted metaregression on IH parameters												
FiO ₂	112	-0.103	0.11	16	-0.734	0.002	28	0.118	0.61	25	0.260	0.32
Duration of exposure	112	0.015	0.07	16	-0.023	0.60	28	0.027	0.07	25	0.0011	0.68
Duration of IH per day	112	-0.073	0.55	16	0.050	0.90	28	-0.0003	0.99	25	0.044	0.63
Duration of reoxygenation phase	112	0.0014	0.30	16	-0.005	0.61	28	0.0011	0.86	25	-0.009	0.35
Duration of hypoxic phase	112	-0.0002	0.89	16	-3.744	0.07	28	0.0047	0.59	25	-0.005	0.38

Figure legends



Graphical abstract : Our meta-analysis included rodents exposed to experimental intermittent hypoxia. We demonstrate that IH significantly increased blood pressure, altered vasodilation and increased vasoconstriction, increased intima-media thickness and atherosclerosis plaques. Altogether, IH is responsible for structural and functional vascular alterations in obstructive sleep apnea.

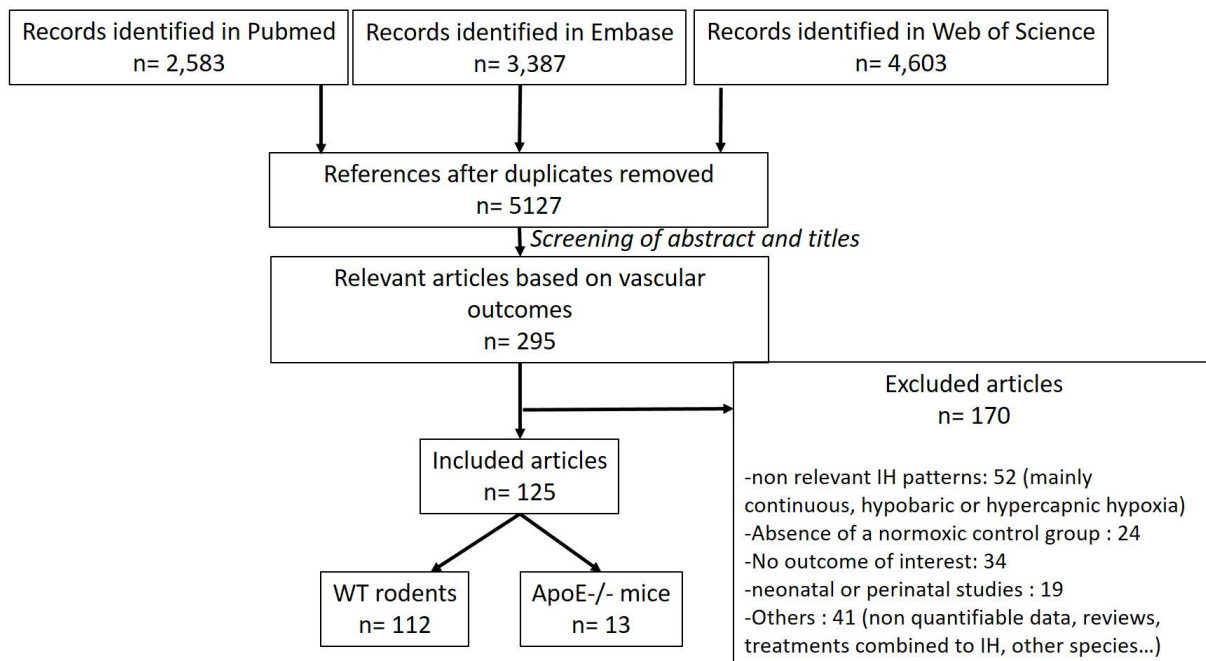


Figure 1: Flow diagram of the study

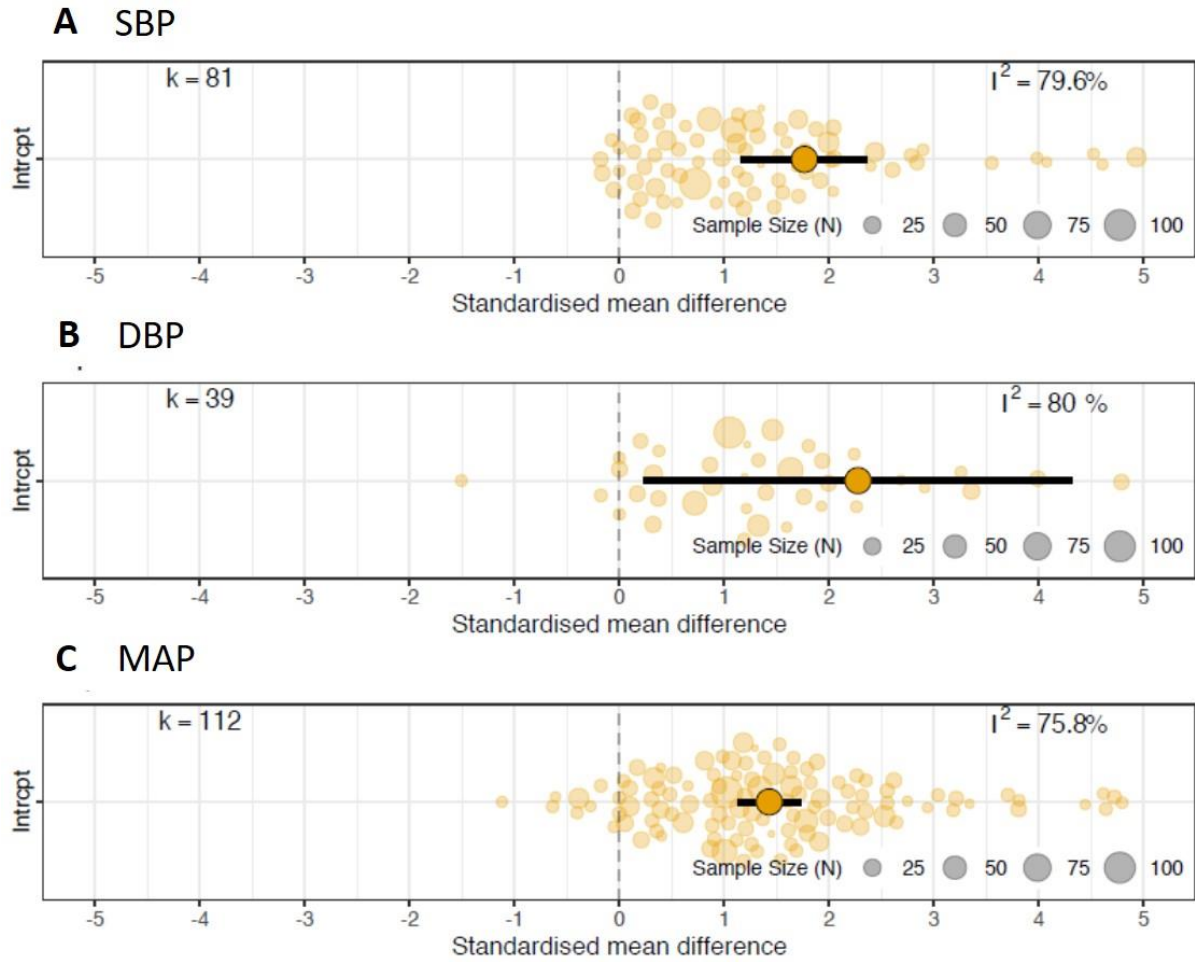


Figure 2: IH increases blood pressure in systemic vessels of wild-type animals. Orchard plots showing SMD for: A) systolic blood pressure (SBP), B) diastolic blood pressure (DBP), C) mean arterial pressure (MAP).

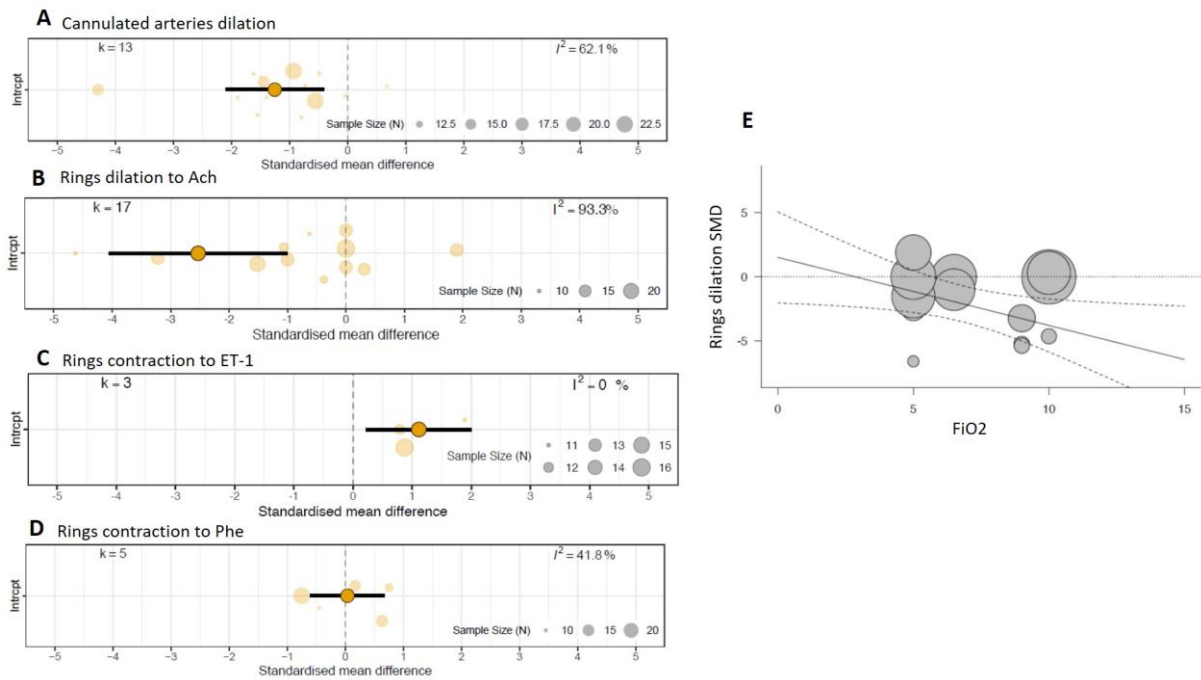


Figure 3: IH reduces vasodilation in response to Acetylcholine and increases vasoconstriction in response to ET-1 but not to Phenylephrine. Orchard plots showing SMD for A) cannulated artery dilation, B) artery ring dilation with Acetylcholine (10^{-6} M), C) artery ring constriction with Endothelin-1 (10^{-8} M), D) artery ring constriction with Phenylephrine (10^{-6} M). E) Association between ring vasodilation and FiO₂ ($p < 0.01$, slope = -0.73).

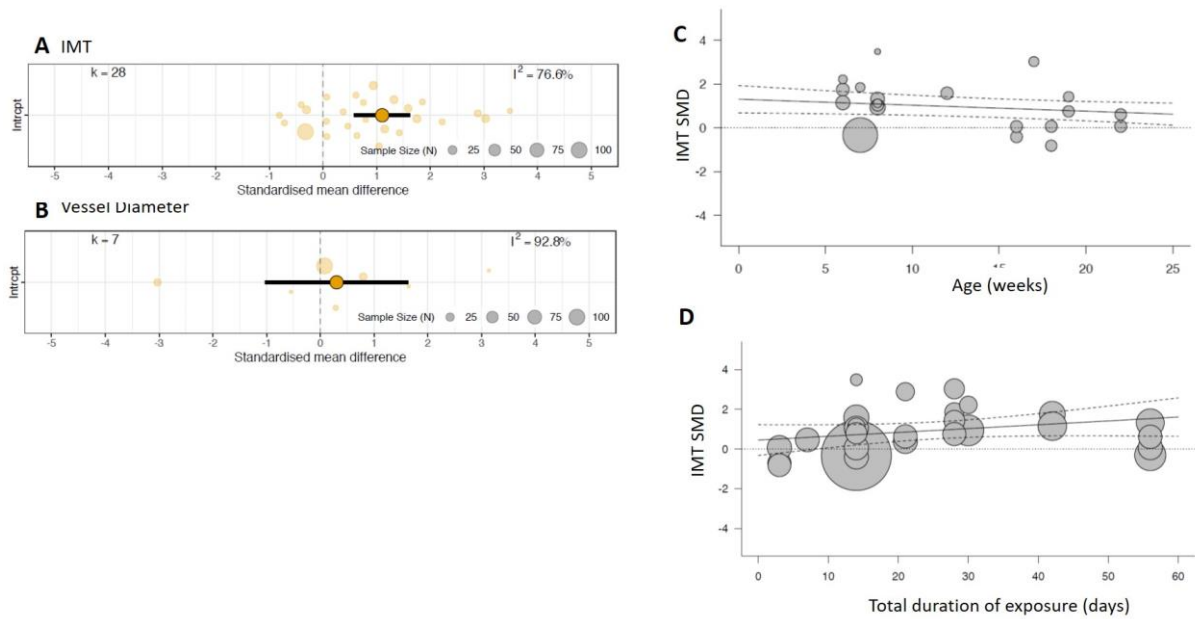


Figure 4: IH provokes arterial wall structural remodeling. Orchard plots showing SMD for A) intima-media thickness (IMT) of systemic arteries, B) vessel luminal diameter. C) Univariate meta-regressions showing the negative correlation between IMT and rodent age ($p=0.014$, slope = -0.03). D) Univariate adjusted meta-regression showing a strong trend towards positive correlation between IMT and total duration of exposure in days ($p=0.07$, slope = 0.03).

Plaque size

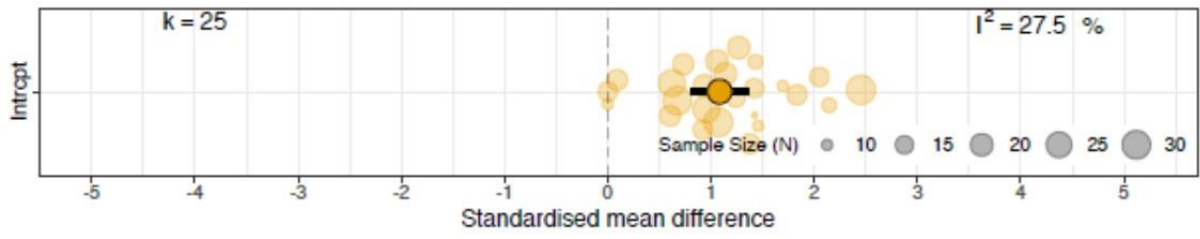
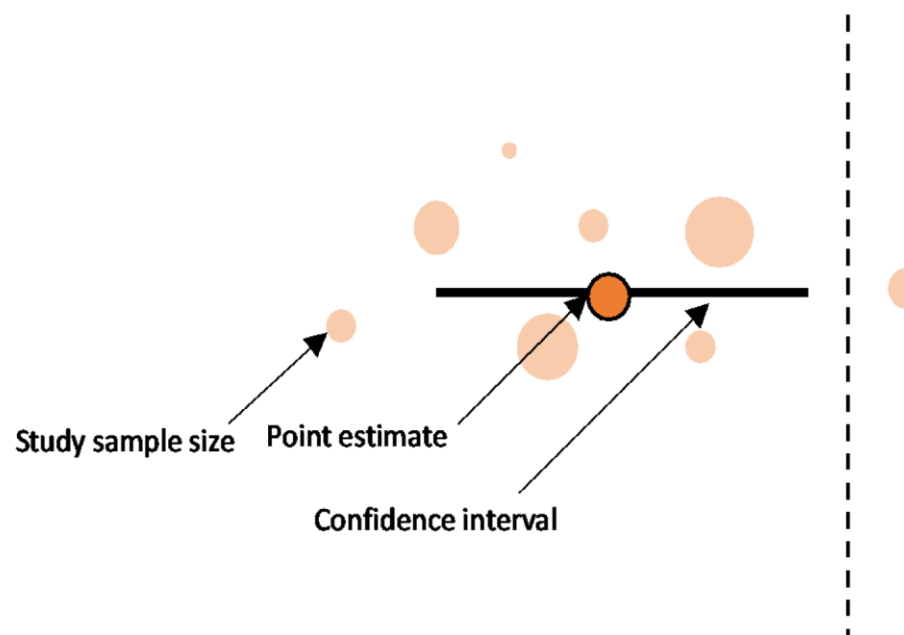


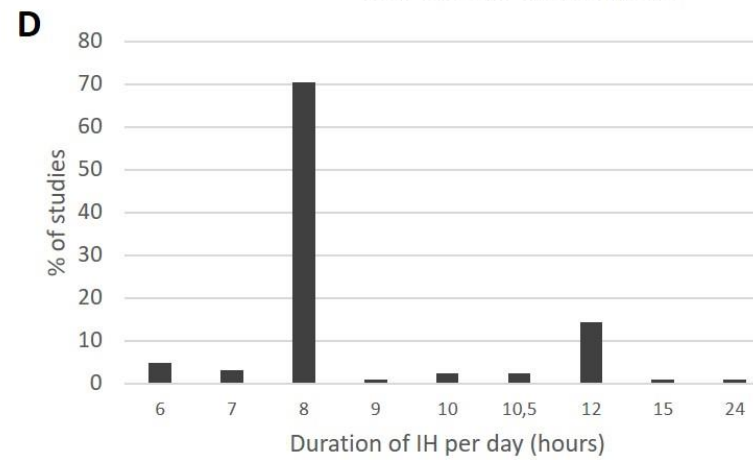
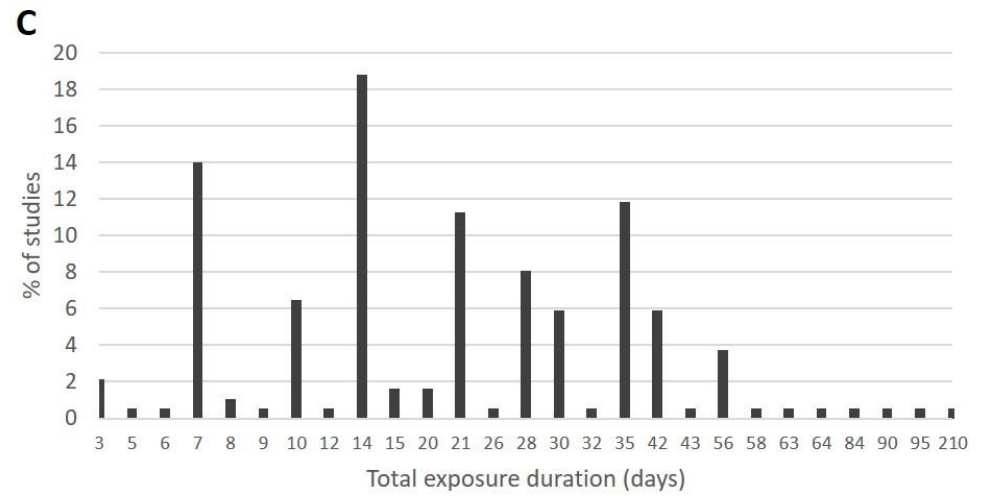
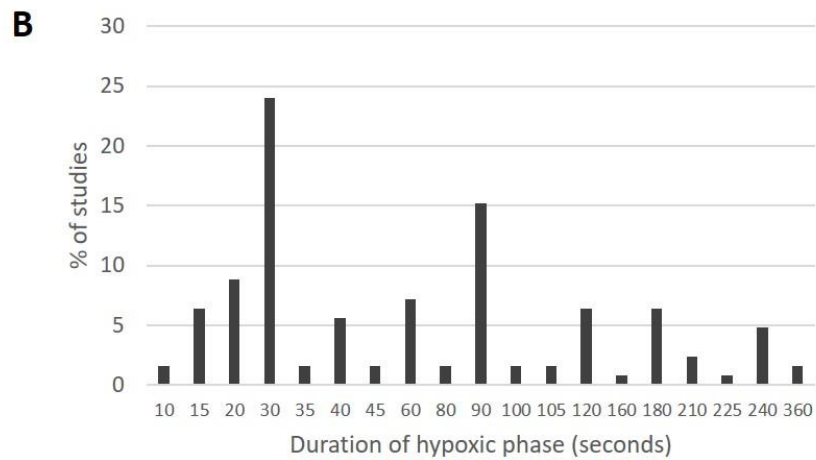
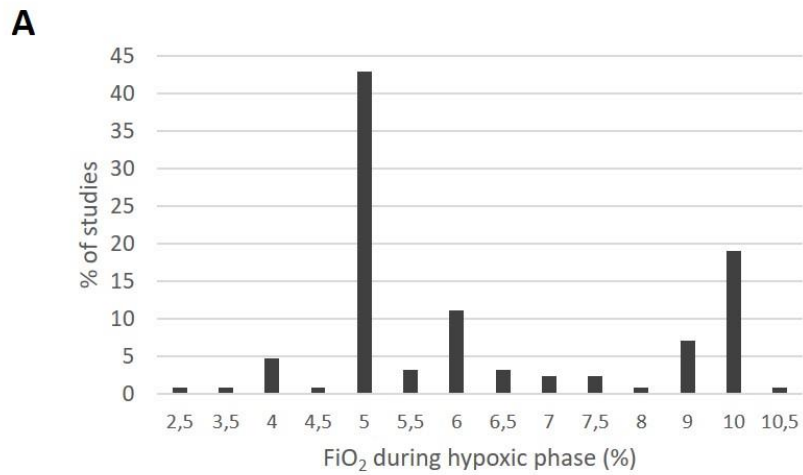
Figure 5: IH increases atherosclerotic plaque size in ApoE^{-/-} mice. Orchard plot showing SMD for atherosclerosis lesion size.

Supplemental data

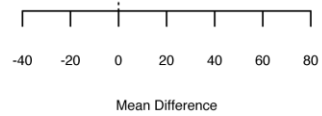
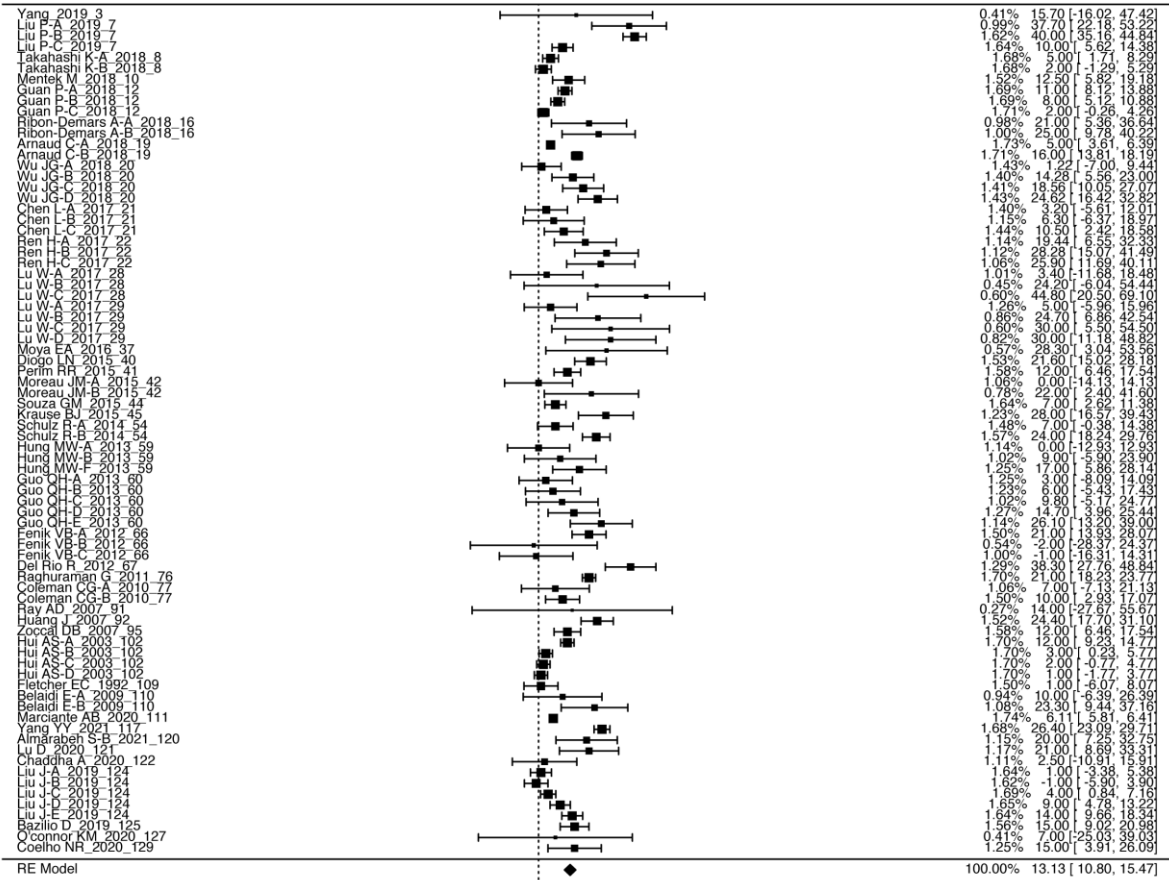
Supplementary Figure 1

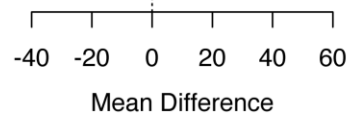
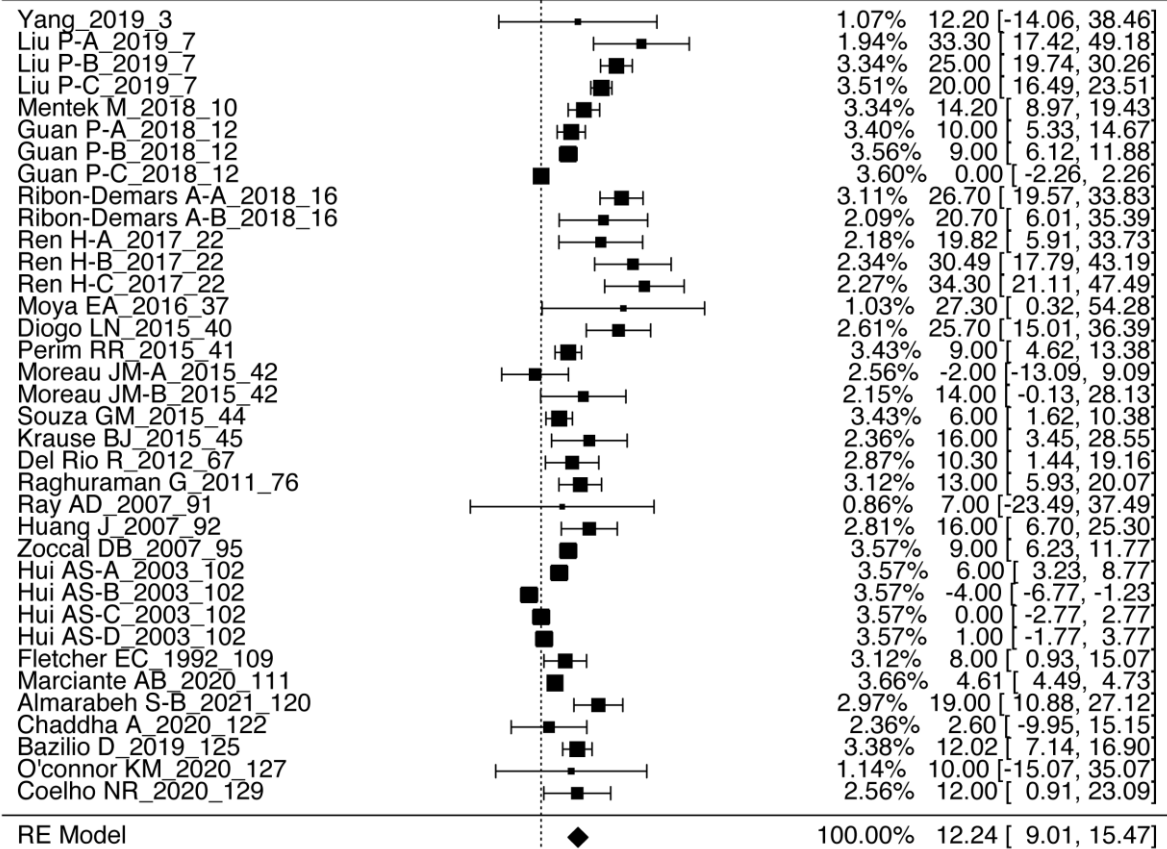


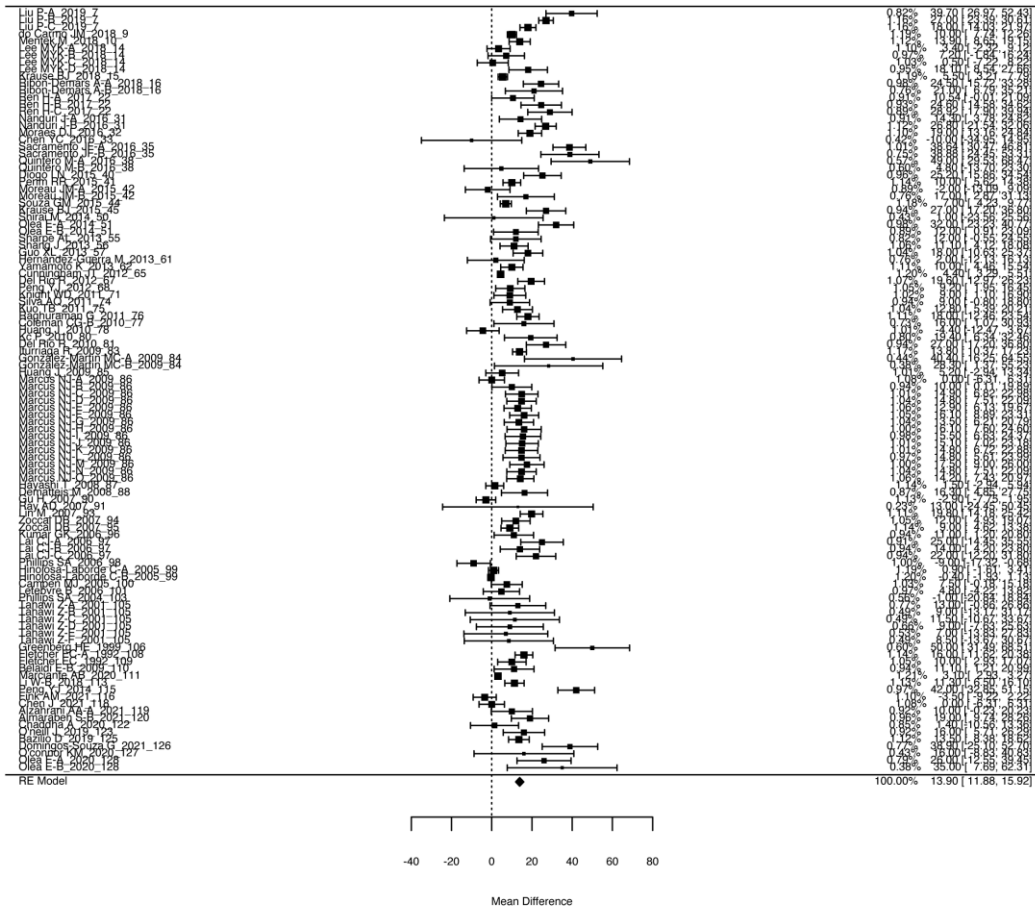
Supplementary Figure 1: Orchard plot example showing the meaning of the different parts of the plot.



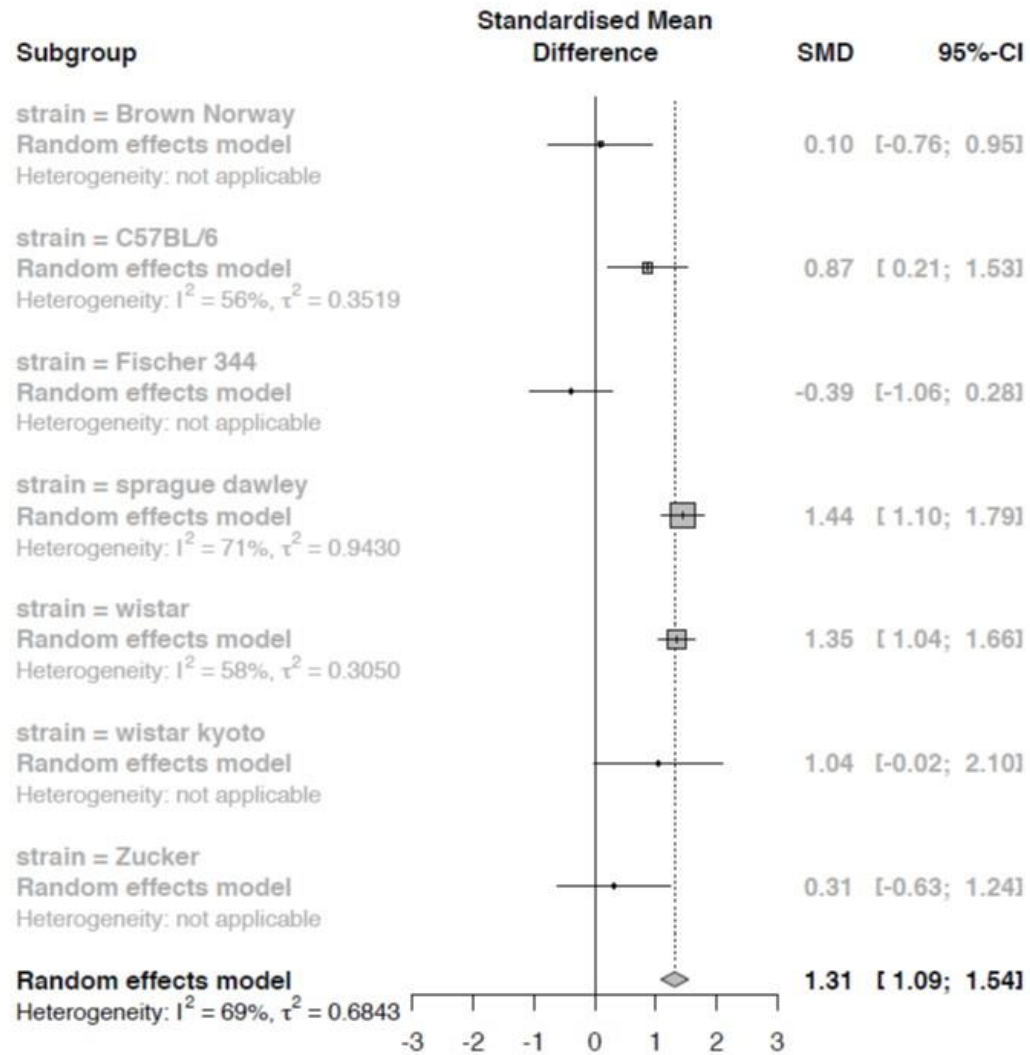
Supplementary Figure 2: Description of the number of studies included depending on four IH parameters: A) FiO₂ during hypoxic phase (in %), B) Duration of each hypoxic phase (in seconds), C) Total duration of exposure (in days), D) Duration of IH exposure per day (in hours).



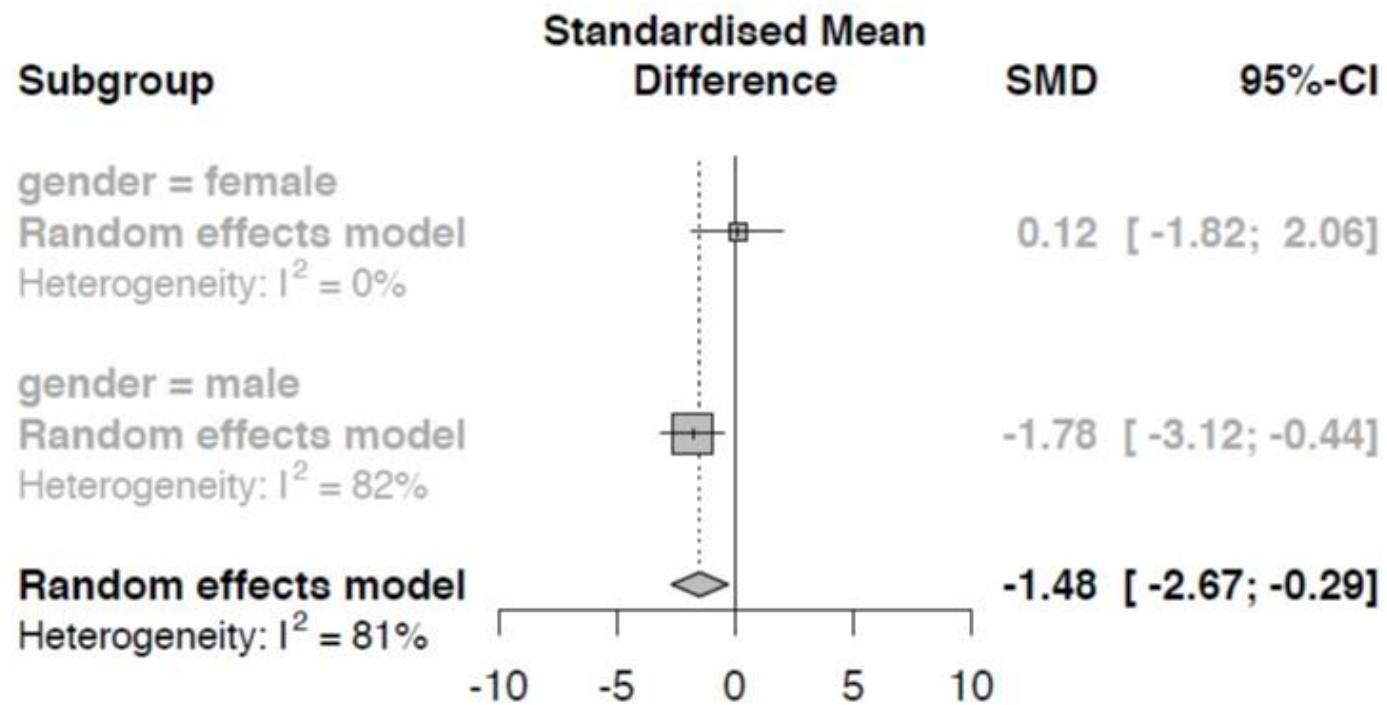




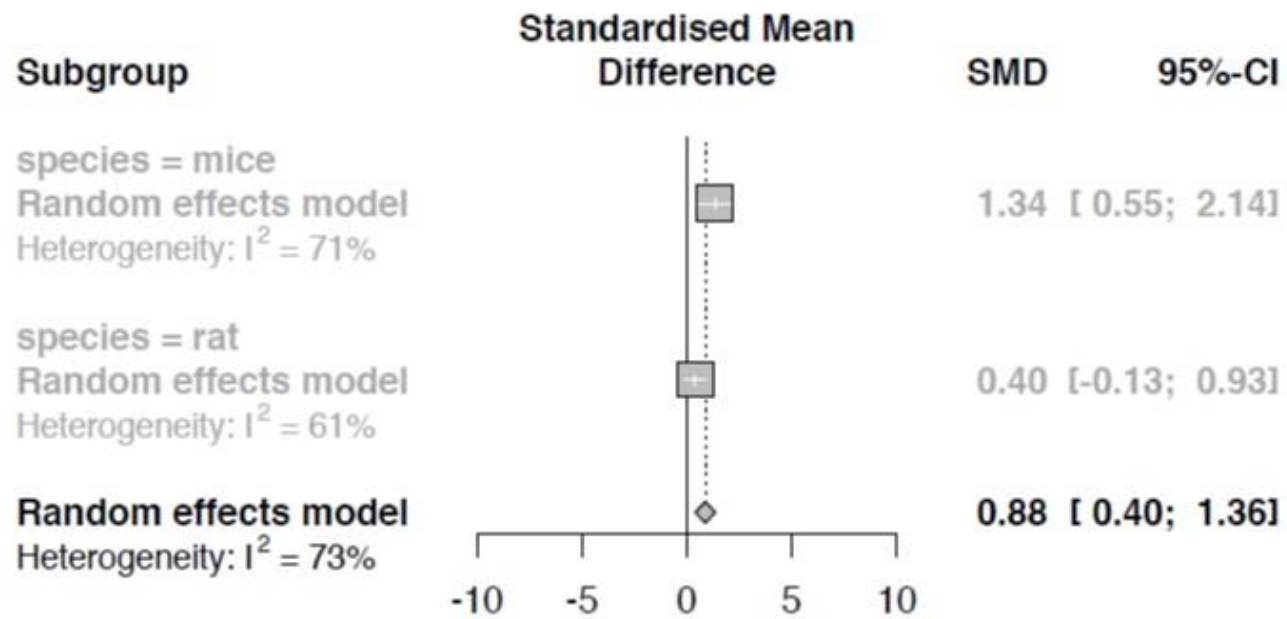
Supplementary Figure 3: Forest plots for Systolic Blood Pressure (A), Diastolic Blood Pressure (B) and Mean Arterial Pressure (C). Mean differences are expressed in mmHg with 95% CI.



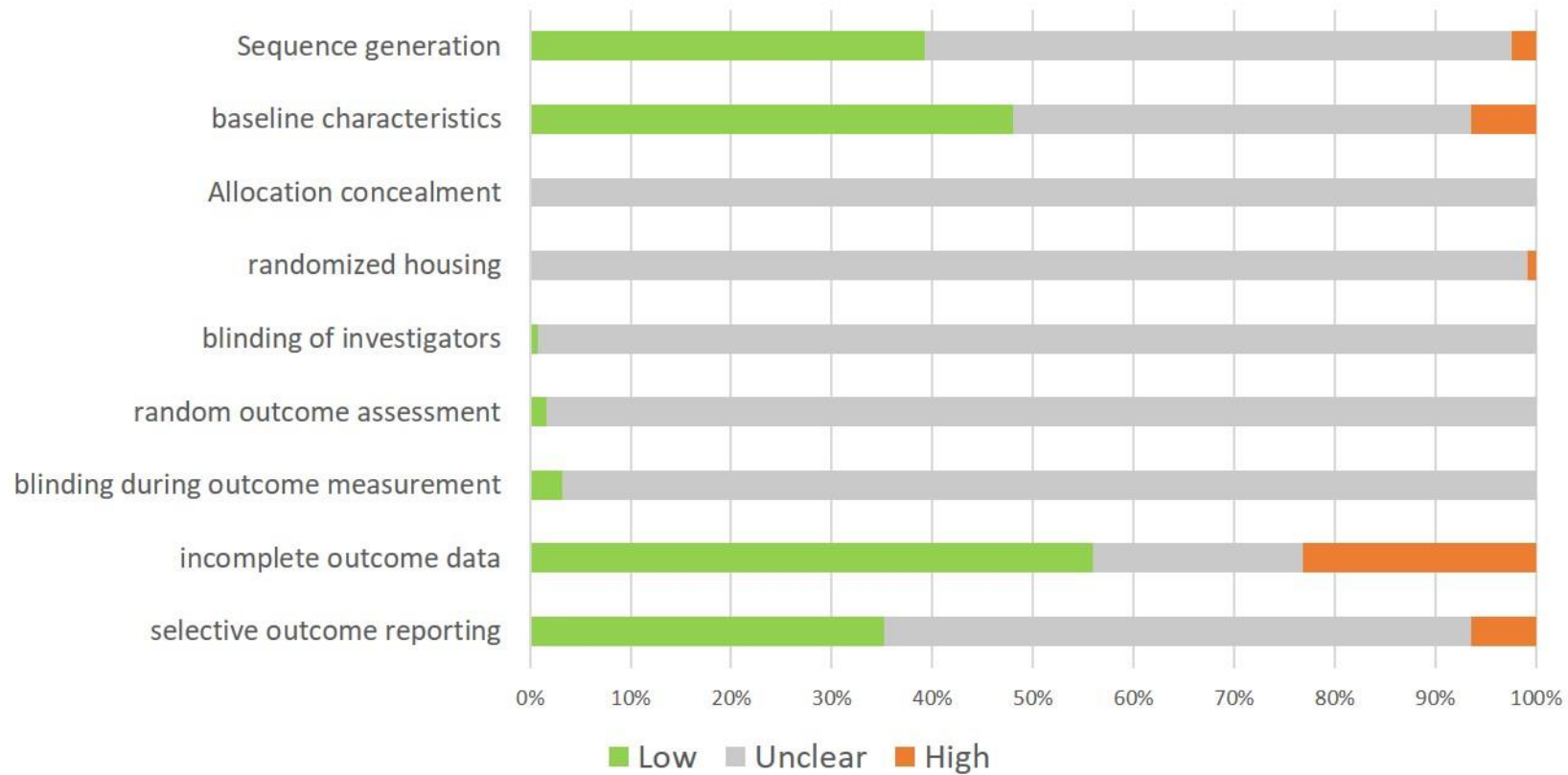
Supplementary Figure 4: Subgroup analysis for MAP according to the strain of wild-type animals. $p < 0.01$ for subgroup differences.



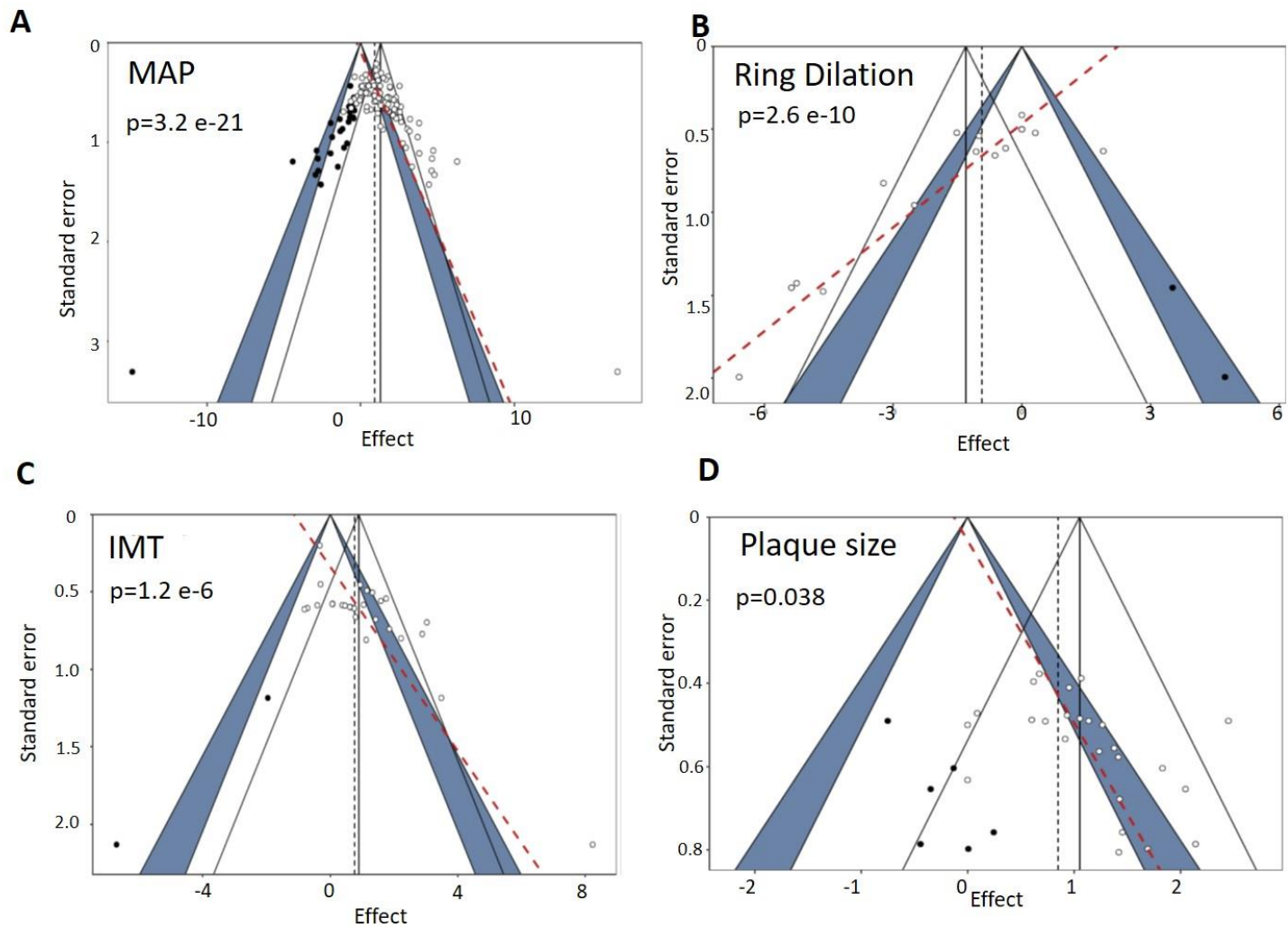
Supplementary Figure 5: Subgroup analyses for vessel ring dilation according to the gender of rodents. $p < 0.01$ for female vs male.



Supplementary Figure 6: Subgroup analysis for IMT according to the species of rodent. $p=0.05$ for mice vs rats.



Supplementary Figure 7: Risk of bias of studies assessed with the SYRCLE tool. For each item of the SYRCLE tool, the percentage of studies scored low/unclear/high risk of bias is shown.



Supplementary Figure 8: Funnel plots showing publication bias for the main outcomes: MAP (A), artery ring dilation (B), IMT (C), atherosclerosis lesions in ApoE^{-/-} mice (D).

Supplementary Table 1: Description of studies included in the meta-analysis. Abbreviations: nm non mentioned; m male; f female; HF High Fat diet.

Due to its large size, this table could not be embedded in the text. See excel file

Supplementary table 2: Risk of bias of studies, according to the 9 outcomes of the SYRCLE quality tool. L=Low, U= Unclear, H= High risk of bias.

Due to its large size, this table could not be embedded in the text. See excel file

Supplementary Table 3: Trim and Fill analysis for correction of small study effect. The table indicates the corrected SMD, confidence interval and I^2 after Trim and Fill analysis. All SMD remain significant after correction.

	Number of missing studies	Total number of studies	SMD	CI inf	CI sup	I^2
MAP	24	136	0.98	0.73	1.24	86%
RVD	0	16	-1.62	-2.71	-0.54	91%
IMT	0	28	0.94	0.51	1.37	77%
LESION	6	31	0.87	0.6	1.14	50%

5. Discussion

Effet de l'hypoxie intermittente sur les paramètres vasculaires sélectionnés

Notre étude est la première méta-analyse qui examine l'effet global de l'hypoxie intermittente sur la fonction et la structure des artères et décrypte les sources de l'importante hétérogénéité entre les études précliniques. Nous avons démontré que l'hypoxie intermittente altère fortement la structure et la fonction des vaisseaux avec une augmentation de la pression artérielle, des altérations de la réactivité vasculaire et des lésions d'athérosclérose. Certains de ces effets sont associés à la F_iO_2 durant la phase hypoxique et à la durée totale d'exposition.

L'effet de l'hypoxie intermittente chez les rongeurs est cohérent avec les effets vasculaires du SAOS (Lévy et al., 2015). Ceci étaye l'hypothèse suggérant que l'hypoxie intermittente est la composante du SAOS principalement responsable des complications cardiovasculaires, et aussi valide la pertinence de ces modèles expérimentaux dans l'étude de SAOS, car les études cliniques sont souvent difficiles à interpréter en raison des comorbidités.

Notre méta-analyse évoque aussi le fait que la sévérité de la phase hypoxique (F_iO_2) pourrait être associée à un risque accru d'hypertension artérielle. Des études cliniques épidémiologiques (Peppard et al., 2000; Young et al., 1997) suggèrent une association positive entre l'AHI, qui évalue la sévérité du SAOS, et l'hypertension artérielle. Ainsi, des paramètres tels que la saturation minimale en oxygène ou le temps passé à moins de 90 % de saturation en oxygène pourraient être plus pertinents que l'AHI pour définir plus précisément la gravité du SAOS et la charge hypoxique chez les patients.

L'altération de la réactivité vasculaire démontrée chez les rongeurs est conforme aux études cliniques qui suggèrent que le SAOS est un facteur de risque indépendant de dysfonction endothéliale et ainsi des événements cardiovasculaires qui en découlent (Bironneau et al., 2020). D'autres agents vasoconstricteurs (comme l'angiotensine II) ainsi que d'autres types de vaisseaux ont été étudiés, mais le faible nombre de données n'a pas permis une méta-analyse les concernant.

Notre méta-analyse confirme l'effet de l'hypoxie intermittente sur le remodelage vasculaire observé chez l'Homme (Farooqui et al., 2017; Zhou et al., 2017). Cependant, le diamètre interne des vaisseaux n'est pas modifié par l'hypoxie intermittente chez les rongeurs alors que, chez des patients SAOS une augmentation de diamètre a été observée (Kwon et al., 2019; Tachikawa et al., 2014). Cette incohérence pourrait s'expliquer par le fait que les rongeurs modèles d'hypoxie intermittente pourraient rapidement atteindre une phase tardive de l'épaississement de la média suite à des changements dans le diamètre interne des vaisseaux. La compliance vasculaire, un autre paramètre important de remodelage vasculaire, n'a pas pu être analysée en raison d'insuffisance des données.

Chez les souris ApoE^{-/-} modèle d'athérosclérose, nos résultats montrent un effet robuste de l'hypoxie intermittente favorisant les lésions d'athérosclérose indépendamment du régime alimentaire. Ceci est cohérent avec l'effet du SAOS chez l'Homme (Drager et al., 2005; Lévy et al., 2015).

Notre étude montre aussi un effet robuste de l'hypoxie intermittente sur les paramètres vasculaires analysés (pression, réactivité et remodelage artériels), indépendamment de la durée d'exposition ou de la gravité de l'hypoxie intermittente. Néanmoins, la FiO₂ était ≤ 10 % dans tous les articles inclus dans l'analyse, ce qui correspond à une hypoxie très sévère. Il serait donc intéressant d'étudier aussi les conséquences vasculaires d'une hypoxie légère à modérée (10% < FiO₂ < 20%) dans les futures études précliniques.

Impact du choix du modèle animal sur l'effet de l'hypoxie intermittente

Notre méta-analyse a montré que les caractéristiques de l'animal pourraient impacter l'effet de l'hypoxie intermittente sur les paramètres vasculaires. En effet, l'effet de l'hypoxie intermittente sur la pression artérielle moyenne est plus marqué chez les souris C57Bl/6 et les rats Sprague-Dawley ou Wistar par rapport aux rats Fischer, Wistar kyoto ou Zucker. L'effet sur le remodelage vasculaire est plus fort chez la souris que chez le rat, et chez les rongeurs jeunes. Le sexe de l'animal impacte la réponse vasodilatatrice des vaisseaux, les animaux mâles sont plus sensibles à l'effet de l'hypoxie intermittente que les femelles. Ainsi, le choix de l'espèce, de la souche, de l'âge ou du sexe des animaux est important lors de la conception d'une étude préclinique.

Cependant, notre méta-analyse révèle des limites dans les études précliniques. Premièrement, les animaux utilisés sont majoritairement jeunes (8-9 semaines), alors que le SAOS est prédominant chez les personnes âgées de plus de 50 ans et non chez les jeunes adultes (Benjafield et al., 2019). Deuxièmement, les animaux mâles sont plus représentés que les animaux femelles, alors que le sexe peut influencer la réponse à l'hypoxie intermittente pour certains paramètres. Enfin, d'autres composantes du SAOS n'ont pas été modélisées et/ou incluses dans notre étude comme la fragmentation du sommeil, les efforts respiratoires et l'hypercapnie. Il serait donc pertinent de mener des études supplémentaires sur des animaux âgés et femelles et de mimer aussi les autres composantes du SAOS.

Analyse du risque de biais

Le risque de biais évalué avec l'outil SYRCLE était assez élevé. En faisant ce constat, nous encourageons l'amélioration à venir des pratiques de recherche préclinique et des habitudes de publication ainsi que la mise en place généralisée des directives SYRCLE.

Les tests de régression d' Egger ont mis en évidence un effet des petites études (small-study effect, c'est un terme qui signifie en méta-analyse que les petites études sont susceptibles de montrer un effet différent souvent plus important que les grandes études) qui pourrait être dû à des biais (de déclaration ou de publication), une stratégie de recherche non-exhaustive, une mauvaise qualité méthodologique de ces études conduisant à une surestimation des résultats, une grande hétérogénéité des résultats ou au hasard (Page et al., 2021). Cependant, l'effet de l'hypoxie intermittente demeure significatif pour les quatre principaux critères de jugement après la correction des valeurs manquantes par l'analyse Trim et Fill, suggérant un impact limité de l'effet des petites études sur nos résultats.

Pour conclure, il s'agit de la première méta-analyse préclinique qui évalue l'effet global de l'hypoxie intermittente sur les paramètres vasculaires. Nous avons mis en évidence, à travers cette revue systématique de la littérature, un effet robuste de l'hypoxie intermittente sur la pression artérielle, la réactivité vasculaire, le remodelage vasculaire et l'athérosclérose, indépendamment des caractéristiques du protocole d'hypoxie intermittente utilisé. Cependant, certains paramètres, en particulier l'ampleur de la chute de la F_iO_2 pendant la phase hypoxique, sont parfois associés à un impact accru de l'hypoxie intermittente sur la

structure ou la fonction des vaisseaux. Le choix de l'animal (espèce, souche, âge et sexe) peut également influencer la réponse des vaisseaux à l'hypoxie intermittente.

En perspectives, cette étude sera complétée par une méta-analyse préclinique mécanistique dont l'objectif est de décrypter les mécanismes physiopathologiques expliquant l'effet de l'hypoxie intermittente sur la structure et la fonction vasculaire. En effet, certains résultats préliminaires montrent une augmentation significative de l'inflammation, de l'infiltration des leucocytes et du stress oxydatif en hypoxie intermittente. L'effet sur l'activation du système sympathique sera également étudié. En plus, une méta-analyse parallèle a été menée pour étudier l'effet de l'hypoxie intermittente sur la fonction cardiaque chez les rongeurs. Cette étude a démontré qu'il y a un remodelage cardiaque et une dysfonction contractile chez les rongeurs exposées à l'hypoxie intermittente, et que l'effet de l'ischémie-reperfusion sur la taille de l'infarctus de myocarde dépend du protocole de l'hypoxie intermittente. Cet article vient d'être accepté pour publication par l'European Respiratory Review (ERR) : **Belaidi E, Khouri C, Harki O, Baillieul S, Fauray G, Briançon-Marjollet A, Pépin JL, Arnaud C. Cardiac consequences of intermittent hypoxia: a matter of dose? A systematic review and meta-analysis in rodents.** (Voir la lettre d'acceptation en annexe 2).

III. Discussion générale et perspectives

Parmi les facteurs de risque de maladies cardiovasculaires, on trouve le syndrome d'apnées obstructives du sommeil (SAOS), qui est une pathologie très fréquente qui touche près d'un milliard de personnes dans le monde (Benjafield et al., 2019). Les complications cardiovasculaires qui en découlent posent un réel problème de santé publique, avec en particulier un risque accru d'athérosclérose menant à une prévalence élevée d'infarctus du myocarde et, *in fine*, à une mortalité élevée (Baguet et al., 2012). Le traitement standard du SAOS est l'utilisation, pendant le sommeil, d'un dispositif délivrant au patient de l'air sous une Pression Positive Continue (PPC), qui est efficace pour améliorer les symptômes et la qualité de vie des patients, mais dont le coût est très élevé (HAS, 2014) et qui de plus a un impact très limité sur la prévention des accidents cardiovasculaires (Drager et al., 2017). Ainsi, la vision moderne du traitement du SAOS est de combiner la PPC avec de nouvelles approches thérapeutiques permettant de mieux réduire le risque cardiovasculaire. Ceci nécessite l'identification des mécanismes qui sous-tendent les conséquences cardiovasculaires du SAOS, afin de proposer de nouvelles cibles thérapeutiques pour optimiser la prise en charge des patients SAOS.

Notre méta-analyse préclinique a démontré que l'hypoxie intermittente (HI), la composante majeure du SAOS, entraîne une dysfonction endothéliale qui favorise l'athérosclérose (Harki et al., 2021b). La perméabilité endothéliale est une étape clé et précoce dans le contrôle du processus d'athérogenèse car son augmentation pourrait faciliter l'infiltration des cellules inflammatoires et des lipides dans les parois des vaisseaux (Sarelius and Glading, 2015). Cependant, sa régulation dans le SAOS n'est pas bien étudiée jusqu'à présent, avec seulement quelques études réalisées sur des modèles expérimentaux d'HI *in vivo* (Arnaud et al., 2018) et *in vitro* (Khalyfa et al., 2018; Makarenko et al., 2014; Zychowski et al., 2016).

Il est donc important d'investiguer les mécanismes qui sous-tendent la dysfonction endothéliale induite par l'HI à travers l'étude de la régulation de la VE-cadhérine, une protéine des jonctions endothéliales clé dans la régulation de la perméabilité endothéliale, dans le SAOS et l'HI. En effet, les voies de signalisation impliquées dans le clivage de son domaine extracellulaire, telles que la voie du VEGF ou du TNF α , sont également activées par l'HI (Lévy et al., 2015; Polena et al., 2018; Sidibé et al., 2012).

Nous avons démontré pour la première fois que l'HI active le clivage de la VE-cadhérine, détectable par des taux sanguins élevés de sa partie extracellulaire clivée (sVE), dans 3 modèles d'HI : dans des surnageants de cellules endothéliales cultivées en HI, dans le sérum de souris modèles d'HI et chez des volontaires sains exposés à l'HI. Nous avons également détecté sVE à des niveaux élevés dans le sang des patients SAOS sans aucune comorbidité cardiovasculaire, chez qui le taux de sVE a été corrélé avec l'AHI et le VEGF sérique, et a été réduit par le traitement PPC notamment chez les patients les plus compliants.

Ensuite, en utilisant le modèle *in vitro* de culture des cellules endothéliales humaines en HI, nous avons démontré que le clivage de la VE-cadhérine est associé à une augmentation de la perméabilité endothéliale et du passage des LDLs et des monocytes à travers une monocouche de cellules endothéliales. Ceci suggère que sVE pourrait être un biomarqueur précoce d'une perméabilité endothéliale altérée qui serait à l'origine de l'initiation de l'athérosclérose induite par l'HI, en facilitant l'infiltration des lipides et des cellules inflammatoires dans la paroi des vaisseaux.

Nous avons également démontré que l'augmentation de perméabilité endothéliale médiée par le clivage de la VE-cadhérine implique des voies de signalisation qui peuvent dépendre de ROS, HIF-1, VEGF et des tyrosine-kinases. Nous avons ensuite démontré, par l'utilisation d'un modèle murin d'HI *in vivo*, que l'inhibition de ces voies de signalisation par l'acriflavine, le pazopanib et le saracatinib a prévenu la dysfonction endothéliale, l'athérosclérose et l'hypertension artérielle induites par l'HI (Harki et al., 2021b). Ces résultats suggèrent que l'athérosclérose induite par l'HI est initiée par l'hyper-perméabilité endothéliale provoquée par le clivage de la VE-cadhérine.

L'ensemble de ces résultats apportent de nouvelles connaissances fondamentales sur la physiopathologie de l'athérosclérose associée au SAOS; et proposent de potentielles cibles pour prévenir l'athérosclérose et les complications cardiovasculaires chez les patients SAOS et améliorer leur prise en charge.

Ce travail ouvre également de nouvelles perspectives :

- ❖ Notre cohorte de patients infraSAS était relativement saine, sans comorbidités cardiovasculaires et sans dysfonction endothéliale. Nous avons étudié une deuxième

cohorte de patients avec ou sans dysfonction endothéliale (traités par PPC sham ou efficace) pour leurs taux sériques de sVE. Nous n'avons pas réussi à démontrer une corrélation entre sVE et la dysfonction endothéliale. Ces patients étaient à un stade avancé de la maladie SAOS et certains d'eux développaient une hypertension artérielle. Notre hypothèse est que chez ces patients, les facteurs confondants associés au stade avancé de la maladie pourraient provoquer des variations de taux de sVE qui s'ajoutent à celles provoquées par le SAOS, masquant ces dernières. L'analyse comparée de ces 2 cohortes nous suggère donc que la sVE pourrait être un biomarqueur précoce détectable avant l'apparition de complications cardiovasculaires liées à la dysfonction endothéliale. Il serait intéressant d'étudier à long terme les événements cardiovasculaires chez les patients infraSAS (infarctus de myocarde, accidents ischémiques cérébraux, ischémie des membres inférieurs, etc.). Pour cela, un projet est en cours pour appeler ces patients et les questionner sur l'évolution de leur maladie depuis leur inclusion. Cela permettra d'étudier la corrélation entre le taux de sVE et la survenue ultérieure d'événements cardiovasculaires.

- ❖ La sVE peut avoir un effet physiopathologique qui devrait être investigué dans les futures études. Dans notre étude, il n'a pas été prévu de vérifier si l'apparition de sVE dans le sérum est seulement une conséquence du clivage de la VE-cadhérine ou si elle a une fonction physiologique propre. En effet, la sVE peut se lier à la VE-cadhérine entière exprimée sur les cellules endothéliales et perturber l'intégrité des jonctions endothéliales (Flemming et al., 2015) ou moduler l'adhésion endothéliale et l'angiogenèse (Seo et al., 2020). En perspective, on pourrait dans un premier temps étudier *in vitro* l'effet d'une sVE recombinante sur la perméabilité endothéliale au dextran et à des molécules ou cellules pro-athérogènes (LDL et monocytes). Dans un deuxième temps, l'effet de la sVE recombinante pourrait être étudié *in vivo* chez des souris ApoE^{-/-} pour vérifier si elle accélère le développement de l'athérosclérose. Ceci permettrait de proposer un nouvel élément physiopathologique expliquant le développement de l'athérosclérose chez les patients SAOS dont le taux de sVE est élevé.

- ❖ La perméabilité endothéliale est une étape clé dans notre hypothèse et son implication devrait être investiguée plus avant. En effet, nous avons mis en évidence *in vitro* une hyper-perméabilité endothéliale en HI. Nous avons essayé de vérifier cet effet *in vivo* par la méthode d'extravasation du bleu Evans qui consiste à injecter à des souris C57Bl/6 WT, après 2 semaines d'exposition à l'HI, une solution de bleu Evans à raison de 20mg/kg par injection intraveineuse. Trente minutes après l'injection, nous avons prélevé l'aorte, ainsi que les artères carotides, fémorales et mésentériques. Les vaisseaux ont été déshydratés pendant 24 h à l'air ambiant, puis mis dans du formamide à 60°C pendant 24h pour extraire le bleu Evans extravasé qui a été mesuré par spectrophotométrie visible (Densité Optique). Malheureusement, les résultats présentaient une forte variabilité, et nous n'avons pas pu les exploiter. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que le temps d'attente après l'injection de la solution de bleu Evans (30 min) est long et que le phénomène d'extravasation se produit très rapidement. Nous avons donc décidé d'étudier la perméabilité endothéliale par une autre méthode : le suivi en temps réel de l'extravasation de Dextran (40 et 70kDa) sur la plateforme d'imagerie du petit animal OPTIMAL (IAB, Grenoble, en collaboration avec Dr Véronique Josserand) chez des souris exposées à l'HI pendant 2 semaines. Cette méthode innovante consiste à enregistrer des séquences d'images de la fluorescence au cours du temps au niveau de l'artère fémorale chez des souris vivantes, ce qui permet d'étudier une cinétique de l'extravasation dès la première seconde d'injection du FITC-Dextran. Les expériences ont été réalisées mais, à cette heure, les résultats sont en cours d'analyse par l'équipe d'OPTIMAL.
- ❖ D'autres voies de signalisation activées dans le SAOS/HI, comme la voie de NF- κ B/TNF- α (Sidibé et al., 2012; Wu et al., 2018), peuvent interférer ou s'ajouter à la voie de signalisation que nous proposons et contribuer au clivage de la VE-cadhérine et ses conséquences décrites dans notre étude (perméabilité endothéliale accrue, dysfonction endothéliale et athérosclérose). Il serait donc intéressant d'étudier l'implication de la voie NF- κ B/TNF- α dans le clivage de la VE-cadhérine induit par l'HI et ses conséquences athérogènes, comme cela a été fait pour la voie HIF-1/VEGF /src-kinases dans la présente thèse.

- ❖ La VE-cadhérine n'est peut-être pas le seul acteur de la perméabilité endothéliale accrue induite par l'HI. Il serait donc intéressant d'étudier avec plus de spécificité le rôle du clivage de la VE-cadhérine dans la dysfonction endothéliale et l'athérosclérose induites par l'HI en utilisant des animaux résistants au clivage de la VE-cadhérine (souris mutées sur la tyr685 de la VE-cadhérine) (Wessel et al., 2014) exposés à l'HI. Si cette mutation prévenait la dysfonction endothéliale et l'athérosclérose induites par l'HI, ceci serait en faveur de l'implication majeure, voire exclusive, du clivage de la VE-cadhérine dans ces conséquences pathologiques.

- ❖ Plusieurs protéases peuvent être impliquées dans le clivage du domaine extracellulaire de la VE-cadhérine comme des MMPs (Polena et al., 2018; Sidibé et al., 2012; Vilgrain et al., 2013), ADAM-10 (Kabacik and Raj, 2017; Schulz et al., 2008), des élastases et la cathepsine G (Hermant et al., 2003). Il serait intéressant de faire un criblage des protéases sériques chez les patients SAOS afin d'identifier les protéases suractivées qui pourraient expliquer le clivage de la VE-cadhérine, et inhiber spécifiquement ces protéases en utilisant les modèles *in vitro* et *in vivo* murin d'HI (travail en cours dans notre laboratoire et faisant l'objet d'un sujet de recherche pour un stage M2).

- ❖ Nos résultats suggèrent que le clivage de la VE-cadhérine est déclenché par une cascade de phosphorylation (autophosphorylation du VEGFR, puis phosphorylation des src-kinases et enfin phosphorylation du domaine intracellulaire de la VE-cadhérine). Nous avons démontré une augmentation de la phosphorylation de la VE-cadhérine *in vitro* en HI. Il serait intéressant d'étudier les protéines phosphorylées (VEGFR, src-kinases, VE-cadhérine) *in vivo* chez les souris C57Bl/6 WT exposées à l'HI pour lesquelles nous disposons déjà du matériel biologique (aortes cryoconservées). Ceci permettrait de confirmer et généraliser *in vivo* nos hypothèses mécanistiques du clivage par phosphorylation de la VE-cadhérine induit par l'HI.

IV. Références bibliographiques

- Abu El-Asrar, A.M., Nawaz, M.I., De Hertogh, G., Al-Kharashi, A.S., Van den Eynde, K., Mohammad, G., and Geboes, K. (2015). The angiogenic biomarker endocan is upregulated in proliferative diabetic retinopathy and correlates with vascular endothelial growth factor. *Curr. Eye Res.* *40*, 321–331.
- Ait-Oufella, H., Maury, E., Guidet, B., and Offenstadt, G. (2008). L'endothélium : un nouvel organe. *Réanimation* *17*, 126–136.
- Alcaide, P., Martinelli, R., Newton, G., Williams, M.R., Adam, A., Vincent, P.A., and Lusinskas, F.W. (2012). p120-Catenin prevents neutrophil transmigration independently of RhoA inhibition by impairing Src dependent VE-cadherin phosphorylation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *303*, C385-395.
- Allagnat, F., Dubuis, C., Lambelet, M., Le Gal, L., Alonso, F., Corpataux, J.-M., Déglise, S., and Haefliger, J.-A. (2017). Connexin37 reduces smooth muscle cell proliferation and intimal hyperplasia in a mouse model of carotid artery ligation. *Cardiovasc. Res.* *113*, 805–816.
- Antic, N.A., Heeley, E., Anderson, C.S., Luo, Y., Wang, J., Neal, B., Grunstein, R., Barbe, F., Lorenzi-Filho, G., Huang, S., et al. (2015). The Sleep Apnea cardioVascular Endpoints (SAVE) Trial: Rationale, Ethics, Design, and Progress. *Sleep* *38*, 1247–1257.
- Arnaud, C., Beguin, P.C., Lantuejoul, S., Pepin, J.-L., Guillermet, C., Pelli, G., Burger, F., Buatois, V., Ribuot, C., Baguet, J.-P., et al. (2011a). The inflammatory preatherosclerotic remodeling induced by intermittent hypoxia is attenuated by RANTES/CCL5 inhibition. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *184*, 724–731.
- Arnaud, C., Poulain, L., Lévy, P., and Dematteis, M. (2011b). Inflammation contributes to the atherogenic role of intermittent hypoxia in apolipoprotein-E knock out mice. *Atherosclerosis* *219*, 425–431.
- Arnaud, C., Bouyon, S., Recoquillon, S., Brasseur, S., Lemarié, E., Briançon-Marjollet, A., Gonthier, B., Toral, M., Faury, G., Martinez, M.C., et al. (2018). Nonmuscle Myosin Light Chain Kinase: A Key Player in Intermittent Hypoxia-Induced Vascular Alterations. *J. Am. Heart Assoc.* *7*.
- Ba, J., Peng, H., Chen, Y., and Gao, Y. (2014). Effects and Mechanism Analysis of Vascular Endothelial Growth Factor and Salvianolic Acid B on 125I-Low Density Lipoprotein Permeability of the Rabbit Aortary Endothelial Cells. *Cell Biochem. Biophys.* *70*, 1533–1538.
- Baguet, J.-P., Hammer, L., Lévy, P., Pierre, H., Launois, S., Mallion, J.-M., and Pépin, J.-L. (2005). The Severity of Oxygen Desaturation Is Predictive of Carotid Wall Thickening and Plaque Occurrence. *Chest* *128*, 3407–3412.
- Baguet, J.-P., Barone-Rochette, G., Tamisier, R., Levy, P., and Pépin, J.-L. (2012). Mechanisms of cardiac dysfunction in obstructive sleep apnea. *Nat. Rev. Cardiol.* *9*, 679–688.
- Banse, C., Polena, H., Stidder, B., Khalil-Mgharbel, A., Houivet, E., Lequerré, T., Fardellone, P., Le-Loët, X., Philippe, P., Marcelli, C., et al. (2017). Soluble vascular endothelial (VE) cadherin and autoantibodies to VE-cadherin in rheumatoid arthritis patients treated with etanercept or adalimumab. *Joint Bone Spine* *84*, 685–691.

- Barceló, A., Miralles, C., Barbé, F., Vila, M., Pons, S., and Agustí, A.G. (2000). Abnormal lipid peroxidation in patients with sleep apnoea. *Eur. Respir. J.* *16*, 644–647.
- Bauer, H., Zweimueller-Mayer, J., Steinbacher, P., Lametschwandtner, A., and Bauer, H. (2010). The Dual Role of Zonula Occludens (ZO) Proteins.
- Benjafield, A.V., Ayas, N.T., Eastwood, P.R., Heinzer, R., Ip, M.S.M., Morrell, M.J., Nunez, C.M., Patel, S.R., Penzel, T., Pépin, J.-L.D., et al. (2019). Estimation of the global prevalence and burden of obstructive sleep apnoea: a literature-based analysis. *Lancet Respir. Med.* *7*, 687–698.
- Bian, F., Yang, X., Zhou, F., Wu, P.-H., Xing, S., Xu, G., Li, W., Chi, J., Ouyang, C., Zhang, Y., et al. (2014). C-reactive protein promotes atherosclerosis by increasing LDL transcytosis across endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.* *171*, 2671–2684.
- Bindke, G., Gehring, M., Wiczorek, D., Kapp, A., Buhl, T., and Wedi, B. (2021). Identification of novel biomarkers to distinguish bradykinin-mediated angioedema from mast cell-/histamine-mediated angioedema. *Allergy*.
- Bironneau, V., Tamisier, R., Trzepizur, W., Andriantsitohaina, R., Berger, M., Goupil, F., Joyeux-Faure, M., Jullian-Desayes, I., Launois, S., Le Vaillant, M., et al. (2020). Sleep apnoea and endothelial dysfunction: An individual patient data meta-analysis. *Sleep Med. Rev.* *52*, 101309.
- Birukova, A.A., Tian, Y., Dubrovskiy, O., Zebda, N., Sarich, N., Tian, X., Wang, Y., and Birukov, K.G. (2012). VE-cadherin trans-interactions modulate Rac activation and enhancement of lung endothelial barrier by iloprost. *J. Cell. Physiol.* *227*, 3405–3416.
- Blaise, S., Polena, H., and Vilgrain, I. (2015). Soluble vascular endothelial-cadherin and auto-antibodies to human vascular endothelial-cadherin in human diseases: Two new biomarkers of endothelial dysfunction. *Vasc. Med. Lond. Engl.* *20*, 557–565.
- Bouillet, L., Mannic, T., Arboleas, M.A., M, S., C, M., C, D., P, H., and I, V. (2011). Hereditary Angioedema: Key Role for Kallikrein and Bradykinin in Vascular Endothelial-Cadherin Cleavage and Edema Formation.
- Bouillet, L., Baudet, A.E., Deroux, A., Sidibé, A., Dumestre-Perard, C., Mannic, T., Treillard, B., Arboleas, M.A., Chiquet, C.A., Gulino-Debrac, D.G., et al. (2013). Auto-antibodies to vascular endothelial cadherin in humans: association with autoimmune diseases. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* *93*, 1194–1202.
- Bouillet, L., Sidibé, A., Polena, H., Mannic, T., Deroux, A., Stidder, B., Vittecoq, O., and Vilgrain, I. (2014). Instabilité des jonctions endothéliales : biomarqueurs du remodelage vasculaire. *médecine/sciences* *30*, 633–635.
- Bourghardt, J., Bergström, G., Krettek, A., Sjöberg, S., Borén, J., and Tivesten, A. (2007). The endogenous estradiol metabolite 2-methoxyestradiol reduces atherosclerotic lesion formation in female apolipoprotein E-deficient mice. *Endocrinology* *148*, 4128–4132.

Briançon-Marjollet, A., Henri, M., Pépin, J.-L., Lemarié, E., Lévy, P., and Tamisier, R. (2014). Altered in vitro endothelial repair and monocyte migration in obstructive sleep apnea: implication of VEGF and CRP. *Sleep* 37, 1825–1832.

Bridgewater, R.E., Streuli, C.H., and Caswell, P.T. (2017). Extracellular matrix promotes clathrin-dependent endocytosis of prolactin and STAT5 activation in differentiating mammary epithelial cells. *Sci. Rep.* 7, 4572.

Brunner, J., Ragupathy, S., and Borchard, G. (2021). Target specific tight junction modulators. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 171, 266–288.

Buckley, C.D., Tan, J., Anderson, K.L., Hanein, D., Volkmann, N., Weis, W.I., Nelson, W.J., and Dunn, A.R. (2014). The minimal cadherin-catenin complex binds to actin filaments under force. *Science* 346.

Cammaroto, G., Costa, F., Ruiz, M.V.G., Andò, G., Vicini, C., Montevercchi, F., Galletti, C., Galletti, F., and Valgimigli, M. (2019). Obstructive sleep apnoea syndrome and endothelial function: potential impact of different treatment strategies-meta-analysis of prospective studies. *Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryngol. Off. J. Eur. Fed. Oto-Rhino-Laryngol. Soc. EUFOS Affil. Ger. Soc. Oto-Rhino-Laryngol. - Head Neck Surg.* 276, 2331–2338.

Campbell, M., Kiang, A.-S., Kenna, P.F., Kerskens, C., Blau, C., O’Dwyer, L., Tivnan, A., Kelly, J.A., Brankin, B., Farrar, G.-J., et al. (2008). RNAi-mediated reversible opening of the blood-brain barrier. *J. Gene Med.* 10, 930–947.

Campbell, M., Hanrahan, F., Gobbo, O.L., Kelly, M.E., Kiang, A.-S., Humphries, M.M., Nguyen, A.T.H., Ozaki, E., Keaney, J., Blau, C.W., et al. (2012). Targeted suppression of claudin-5 decreases cerebral oedema and improves cognitive outcome following traumatic brain injury. *Nat. Commun.* 3, 849.

Carnethon, M.R., and Johnson, D.A. (2019). Sleep and Resistant Hypertension. *Curr. Hypertens. Rep.* 21, 34.

Casey, T.E., Harrison, A.C., Zimmerman, J.K., and Hilderman, R.H. (2000). Studies of L-arginine transport in bovine aortic endothelial cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 379, 283–291.

Chadjichristos, C.E., Scheckenbach, K.E.L., van Veen, T. a. B., Richani Saredidine, M.Z., de Wit, C., Yang, Z., Roth, I., Bacchetta, M., Viswambharan, H., Foglia, B., et al. (2010). Endothelial-specific deletion of connexin40 promotes atherosclerosis by increasing CD73-dependent leukocyte adhesion. *Circulation* 121, 123–131.

Chen, T., Guo, Z.-P., Cao, N., Qin, S., Li, M.-M., and Jia, R.-Z. (2014). Increased serum levels of soluble vascular endothelial-cadherin in patients with systemic vasculitis. *Rheumatol. Int.* 34, 1139–1143.

Chen, T., Guo, Z.-P., Wang, W.-J., Fu, L.-X., Sun, Q.-M., and Zhou, P.-M. (2017). Increased serum soluble vascular endothelial cadherin levels in patients with chronic spontaneous urticaria. *Ann. Allergy Asthma Immunol. Off. Publ. Am. Coll. Allergy Asthma Immunol.* 118, 704–709.

- Chen, X.L., Nam, J.-O., Jean, C., Lawson, C., Walsh, C.T., Goka, E., Lim, S.-T., Tomar, A., Tancioni, I., Uryu, S., et al. (2012). VEGF-induced vascular permeability is mediated by FAK. *Dev. Cell* 22, 146–157.
- Choueiri, T.K., and Kaelin, W.G. (2020). Targeting the HIF2-VEGF axis in renal cell carcinoma. *Nat. Med.* 26, 1519–1530.
- Christoph, M., Ibrahim, K., Hesse, K., Augstein, A., Schmeisser, A., Braun-Dullaeus, R.C., Simonis, G., Wunderlich, C., Quick, S., Strasser, R.H., et al. (2014). Local inhibition of hypoxia-inducible factor reduces neointima formation after arterial injury in ApoE^{-/-} mice. *Atherosclerosis* 233, 641–647.
- Clark, J.L., Taylor, C.G., and Zahradka, P. (2017). Exploring the Cardio-metabolic Relevance of T-cadherin: A Pleiotropic Adiponectin Receptor. *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets* 17, 200–206.
- Coon, B.G., Baeyens, N., Han, J., Budatha, M., Ross, T.D., Fang, J.S., Yun, S., Thomas, J.-L., and Schwartz, M.A. (2015). Intramembrane binding of VE-cadherin to VEGFR2 and VEGFR3 assembles the endothelial mechanosensory complex. *J. Cell Biol.* 208, 975–986.
- Corada, M., Zanetta, L., Orsenigo, F., Breviario, F., Lampugnani, mg, S, B., F, L., Dj, H., P, B., and E, D. (2002). A Monoclonal Antibody to Vascular Endothelial-Cadherin Inhibits Tumor Angiogenesis Without Side Effects on Endothelial Permeability.
- Cummins, P.M. (2012). Occludin: One Protein, Many Forms. *Mol. Cell. Biol.* 32, 242–250.
- Dai, H., Liu, C., Li, P., Mai, Z., Tan, X., Chen, S., Zhou, Z., Tang, Z., Miao, J., Liu, L., et al. (2020). Risk of Dyslipidemia Associated with VEGF/VEGFR Inhibitors: A Meta-Analysis. *Transl. Oncol.* 13, 100779.
- Dejana, E., Orsenigo, F., and Lampugnani, M.G. (2008). The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *J. Cell Sci.* 121, 2115–2122.
- Dejana, E., Orsenigo, F., Molendini, C., Baluk, P., and McDonald, D.M. (2009). Organization and signaling of endothelial cell-to-cell junctions in various regions of the blood and lymphatic vascular trees. *Cell Tissue Res.* 335, 17–25.
- Dematteis, M., Godin-Ribuot, D., Arnaud, C., Ribuot, C., Stanke-Labesque, F., Pépin, J.-L., and Lévy, P. (2009). Cardiovascular consequences of sleep-disordered breathing: contribution of animal models to understanding the human disease. *ILAR J.* 50, 262–281.
- Destors, M., Tamié, R., Galerneau, L.-M., Lévy, P., and Pepin, J.-L. (2017). Physiopathologie du syndrome d'apnées-hypopnées obstructives du sommeil et de ses conséquences cardio-métaboliques. *Presse Médicale* 46, 395–403.
- Drager, L.F., Bortolotto, L.A., Lorenzi, M.C., Figueiredo, A.C., Krieger, E.M., and Lorenzi-Filho, G. (2005). Early signs of atherosclerosis in obstructive sleep apnea. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 172, 613–618.

- Drager, L.F., Bortolotto, L.A., Figueiredo, A.C., Silva, B.C., Krieger, E.M., and Lorenzi-Filho, G. (2007). Obstructive sleep apnea, hypertension, and their interaction on arterial stiffness and heart remodeling. *Chest* *131*, 1379–1386.
- Drager, L.F., Drager, L., Polotsky, V.Y., and Polotsky, L. (2011). Lipid metabolism: a new frontier in sleep apnea research. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *184*, 288–290.
- Drager, L.F., Yao, Q., Hernandez, K.L., Shin, M.-K., Bevans-Fonti, S., Gay, J., Sussan, T.E., Jun, J.C., Myers, A.C., Olivecrona, G., et al. (2013). Chronic intermittent hypoxia induces atherosclerosis via activation of adipose angiopoietin-like 4. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *188*, 240–248.
- Drager, L.F., McEvoy, R.D., Barbe, F., Lorenzi-Filho, G., Redline, S., and 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.
- Duong, C.N., and Vestweber, D. (2020). Mechanisms Ensuring Endothelial Junction Integrity Beyond VE-Cadherin. *Front. Physiol.* *11*, 519.
- Dyugovskaya, L., Lavie, P., and Lavie, L. (2002). Increased adhesion molecules expression and production of reactive oxygen species in leukocytes of sleep apnea patients. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *165*, 934–939.
- Dyugovskaya, L., Lavie, P., and Lavie, L. (2003). Phenotypic and functional characterization of blood gammadelta T cells in sleep apnea. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *168*, 242–249.
- Ebrary Measurement of Transepithelial Electrical Resistance (TEER).
- Eissa, L.A., and Esmaeel, M.I. (2008). Relevance of some serum biomarkers (E cadherin, GAGs & MDA) in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Pak. J. Pharm. Sci.* *21*, 29–35.
- El-Sabban, M.E., Abi-Mosleh, L.F., and Talhouk, R.S. (2003). Developmental regulation of gap junctions and their role in mammary epithelial cell differentiation. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* *8*, 463–473.
- Farooqui, F.A., Sharma, S.K., Kumar, A., Soneja, M., Mani, K., Radhakrishnan, R., and Farooqui, N. (2017). Endothelial function and carotid intima media thickness in obstructive sleep apnea without comorbidity. *Sleep Breath. Schlaf Atm.* *21*, 69–76.
- Feldman, G.J., Mullin, J.M., and Ryan, M.P. (2005). Occludin: structure, function and regulation. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *57*, 883–917.
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Parkin, D.M., Piñeros, M., Znaor, A., and Bray, F. (2021). Cancer statistics for the year 2020: An overview. *Int. J. Cancer.*
- Fichtner, D., Lorenz, B., Engin, S., Deichmann, C., Oelkers, M., Janshoff, A., Menke, A., Wedlich, D., and Franz, C.M. (2014). Covalent and Density-Controlled Surface Immobilization of E-Cadherin for Adhesion Force Spectroscopy. *PLOS ONE* *9*, e93123.

- Fleming, I., Fisslthaler, B., Dixit, M., and Busse, R. (2005). Role of PECAM-1 in the shear-stress-induced activation of Akt and the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in endothelial cells. *J. Cell Sci.* *118*, 4103–4111.
- Flemming, S., Burkard, N., Renschler, M., Vielmuth, F., Meir, M., Schick, M.A., Wunder, C., Germer, C.-T., Spindler, V., Waschke, J., et al. (2015). Soluble VE-cadherin is involved in endothelial barrier breakdown in systemic inflammation and sepsis. *Cardiovasc. Res.* *107*, 32–44.
- Frye, M., Dierkes, M., Küppers, V., Vockel, M., Tomm, J., Zeuschner, D., Rossaint, J., Zarbock, A., Koh, G.Y., Peters, K., et al. (2015). Interfering with VE-PTP stabilizes endothelial junctions in vivo via Tie-2 in the absence of VE-cadherin. *J. Exp. Med.* *212*, 2267–2287.
- Fuhrman, C., Fleury, B., Nguyễn, X.-L., and Delmas, M.-C. (2012). Symptoms of sleep apnea syndrome: high prevalence and underdiagnosis in the French population. *Sleep Med.* *13*, 852–858.
- Fujishima, Y., Maeda, N., Matsuda, K., Masuda, S., Mori, T., Fukuda, S., Sekimoto, R., Yamaoka, M., Obata, Y., Kita, S., et al. (2017). Adiponectin association with T-cadherin protects against neointima proliferation and atherosclerosis. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *31*, 1571–1583.
- Furuse, M., and Tsukita, S. (2006). Claudins in occluding junctions of humans and flies. *Trends Cell Biol.* *16*, 181–188.
- Gautier-Veyret, E., Arnaud, C., Bäck, M., Pépin, J.-L., Petri, M.H., Baguet, J.-P., Tamisier, R., Lévy, P., and Stanke-Labesque, F. (2013). Intermittent hypoxia-activated cyclooxygenase pathway: role in atherosclerosis. *Eur. Respir. J.* *42*, 404.
- Gautier-Veyret, E., Bäck, M., Arnaud, C., Belaïdi, E., Tamisier, R., Lévy, P., Arnol, N., Perrin, M., Pépin, J.-L., and Stanke-Labesque, F. (2018). Cysteinyl-leukotriene pathway as a new therapeutic target for the treatment of atherosclerosis related to obstructive sleep apnea syndrome. *Pharmacol. Res.* *134*, 311–319.
- Gavard, J., and Gutkind, J.S. (2006). VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Nat. Cell Biol.* *8*, 1223–1234.
- Gimbrone, M.A., and García-Cardeña, G. (2016). Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ. Res.* *118*, 620–636.
- Gotsch, U., Borges, E., Bosse, R., Böggemeyer, E., Simon, M., Mossmann, H., and Vestweber, D. (1997). VE-cadherin antibody accelerates neutrophil recruitment in vivo. *J. Cell Sci.* *110* (Pt 5), 583–588.
- Gras, E., Belaïdi, E., Briançon-Marjollet, A., Pépin, J.-L., Arnaud, C., and Godin-Ribuot, D. (2016). Endothelin-1 mediates intermittent hypoxia-induced inflammatory vascular remodeling through HIF-1 activation. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985* *120*, 437–443.
- Guequén, A., Carrasco, R., Zamorano, P., Rebolledo, L., Burboa, P., Sarmiento, J., Boric, M.P., Korayem, A., Durán, W.N., and Sánchez, F.A. (2016). S-nitrosylation regulates VE-cadherin

phosphorylation and internalization in microvascular permeability. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 310, H1039-1044.

Guilleminault, C., Tilkian, A., and Dement, W.C. (1976). The sleep apnea syndromes. *Annu. Rev. Med.* 27, 465–484.

Harhaj, N., Felinski, A., Wolpert, A., Sundstrom, J., Gardner, T., and Antonetti, D. (2006). VEGF Activation of Protein Kinase C Stimulates Occludin Phosphorylation and Contributes to Endothelial Permeability.

Harki, O., Tamisier, R., Pépin, J.-L., Bailly, S., Mahmani, A., Gonthier, B., Salomon, A., Vilgrain, I., Faury, G., and Briançon-Marjollet, A. (2021a). VE-Cadherin cleavage in sleep apnoea: new insights into intermittent hypoxia-related endothelial permeability. *Eur. Respir. J.* 2004518.

Harki, O., Boete, Q., Pépin, J.-L., Arnaud, C., Belaidi, E., Faury, G., Khouri, C., and Briançon-Marjollet, A. (2021b). Intermittent hypoxia-related alterations in vascular structure and function: a systematic review and meta-analysis of rodent data. *Eur. Respir. J.*

HAS (2014). Évaluation clinique et économique des dispositifs médicaux et prestations associées pour prise en charge du syndrome d'apnées hypopnées obstructives du sommeil (SAHOS).

Hennequin, L.F., Allen, J., Breed, J., Curwen, J., Fennell, M., Green, T.P., Lambert-van der Brempt, C., Morgentin, R., Norman, R.A., Olivier, A., et al. (2006). N-(5-chloro-1,3-benzodioxol-4-yl)-7-[2-(4-methylpiperazin-1-yl)ethoxy]-5- (tetrahydro-2H-pyran-4-yloxy)quinazolin-4-amine, a novel, highly selective, orally available, dual-specific c-Src/Abl kinase inhibitor. *J. Med. Chem.* 49, 6465–6488.

Hermant, B., Bibert, S., Concord, E., Dublet, B., Weidenhaupt, M., Vernet, T., and Gulino-Debrac, D. (2003). Identification of proteases involved in the proteolysis of vascular endothelium cadherin during neutrophil transmigration. *J. Biol. Chem.* 278, 14002–14012.

Herren, B., Levkau, B., Raines, E.W., and Ross, R. (1998). Cleavage of beta-catenin and plakoglobin and shedding of VE-cadherin during endothelial apoptosis: evidence for a role for caspases and metalloproteinases. *Mol. Biol. Cell* 9, 1589–1601.

Hooijmans, C.R., Rovers, M.M., de Vries, R.B.M., Leenaars, M., Ritskes-Hoitinga, M., and Langendam, M.W. (2014). SYRCLE's risk of bias tool for animal studies. *BMC Med. Res. Methodol.* 14, 43.

Hoyos, C.M., Melehan, K.L., Liu, P.Y., Grunstein, R.R., and Phillips, C.L. (2015). Does obstructive sleep apnea cause endothelial dysfunction? A critical review of the literature. *Sleep Med. Rev.* 20, 15–26.

Huber, P. (1999). Les jonctions intercellulaires endothéliales : relation entre adhérence et morphogénèse vasculaires. *J. Société Biol.* 193, 181–187.

Hunyor, I., and Cook, K.M. (2018). Models of intermittent hypoxia and obstructive sleep apnea: molecular pathways and their contribution to cancer. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 315, R669–R687.

Javaheri, S., Barbe, F., Campos-Rodriguez, F., Dempsey, J.A., Khayat, R., Javaheri, S., Malhotra, A., Martinez-Garcia, M.A., Mehra, R., Pack, A.I., et al. (2017). Types, Mechanisms, and Clinical Cardiovascular Consequences. *J. Am. Coll. Cardiol.* *69*, 841–858.

Jelic, S., and Le Jemtel, T.H. (2008). Inflammation, oxidative stress, and the vascular endothelium in obstructive sleep apnea. *Trends Cardiovasc. Med.* *18*, 253–260.

Jelic, S., Lederer, D.J., Adams, T., Padeletti, M., Colombo, P.C., Factor, P., and Le Jemtel, T.H. (2009). Endothelial repair capacity and apoptosis are inversely related in obstructive sleep apnea. *Vasc. Health Risk Manag.* *5*, 909–920.

Jiang, H., Huang, S., Li, X., Li, X., Huang, S., Zhang, Y., and Chen, Z.-Y. (2015). Endothelial tyrosine kinase receptor B prevents VE-cadherin cleavage and protects against atherosclerotic lesion development in ApoE^{-/-} mice. *Oncotarget* *6*, 30640–30649.

Jordan, W., Reinbacher, A., Cohrs, S., Grunewald, R.W., Mayer, G., R  ther, E., and Rodenbeck, A. (2005). Obstructive sleep apnea: Plasma endothelin-1 precursor but not endothelin-1 levels are elevated and decline with nasal continuous positive airway pressure. *Peptides* *26*, 1654–1660.

Kabacik, S., and Raj, K. (2017). Ionising radiation increases permeability of endothelium through ADAM10-mediated cleavage of VE-cadherin. *Oncotarget* *8*, 82049–82063.

Kapur, V., Strohl, K.P., Redline, S., Iber, C., O’Connor, G., and Nieto, J. (2002). Underdiagnosis of sleep apnea syndrome in U.S. communities. *Sleep Breath. Schlaf Atm.* *6*, 49–54.

Keaney, J., Walsh, D.M., O’Malley, T., Hudson, N., Crosbie, D.E., Loftus, T., Sheehan, F., McDaid, J., Humphries, M.M., Callanan, J.J., et al. (2015). Autoregulated paracellular clearance of amyloid- β across the blood-brain barrier. *Sci. Adv.* *1*, e1500472.

Keiper, T., Al-Fakhri, N., Chavakis, E., Athanasopoulos, A.N., Isermann, B., Herzog, S., Saffrich, R., Hersemeyer, K., Bohle, R.M., Haendeler, J., et al. (2005). The role of junctional adhesion molecule-C (JAM-C) in oxidized LDL-mediated leukocyte recruitment. *FASEB J.* *19*, 2078–2080.

Khalyfa, A., Gozal, D., and Kheirandish-Gozal, L. (2018). Plasma Exosomes Disrupt the Blood–Brain Barrier in Children with Obstructive Sleep Apnea and Neurocognitive Deficits. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *197*, 1073–1076.

Khoy, K., Nguyen, M.V.C., Masson, D., Bardy, B., Drouet, C., and Paclet, M.-H. (2017). Transfusion-related acute lung injury: critical neutrophil activation by anti-HLA-A2 antibodies for endothelial permeability. *Transfusion (Paris)* *57*, 1699–1708.

Kobiyama, K., and Ley, K. (2018). Atherosclerosis. *Circ. Res.* *123*, 1118–1120.

Koenen, R.R., Pruessmeyer, J., Soehnlein, O., Fraemohs, L., Zerneck, A., Schwarz, N., Reiss, K., Sarabi, A., Lindbom, L., Hackeng, T.M., et al. (2009). Regulated release and functional modulation of junctional adhesion molecule A by disintegrin metalloproteinases. *Blood* *113*, 4799–4809.

Komarova, Y., and Malik, A.B. (2010). Regulation of endothelial permeability via paracellular and transcellular transport pathways. *Annu. Rev. Physiol.* *72*, 463–493.

- Komarova, Y.A., Kruse, K., Mehta, D., and Malik, A.B. (2017). Protein Interactions at Endothelial Junctions and Signaling Mechanisms Regulating Endothelial Permeability. *Circ. Res.* *120*, 179–206.
- Kribbs, N.B., Pack, A.I., Kline, L.R., Smith, P.L., Schwartz, A.R., Schubert, N.M., Redline, S., Henry, J.N., Getsy, J.E., and Dinges, D.F. (1993). Objective Measurement of Patterns of Nasal CPAP Use by Patients with Obstructive Sleep Apnea. *Am. Rev. Respir. Dis.* *147*, 887–895.
- Kwak, B.R., Mulhaupt, F., Veillard, N., Gros, D.B., and Mach, F. (2002). Altered pattern of vascular connexin expression in atherosclerotic plaques. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *22*, 225–230.
- Kwon, Y., Logan, J., Redline, S., Duprez, D., Jacobs Jr, D.R., Ouyang, P., Hundley, W.G., Lima, J., Bluemke, D.A., and Lutsey, P.L. (2019). Obstructive Sleep Apnea and Structural/Functional Properties of the Thoracic Ascending Aorta: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Cardiology* *142*, 180–188.
- Lambeng, N., Wallez, N., Rampon, C., Cand, Christé, G., Gulino-Debrac, D., Vilgrain, I., and Huber, P. (2005). Vascular Endothelial-Cadherin Tyrosine Phosphorylation in Angiogenic and Quiescent Adult Tissues.
- Lampugnani, M., Corada, M., Caveda, F., Ayalon, O., Geiger, B., and Dejana, E. (1995). The Molecular Organization of Endothelial Cell to Cell Junctions: Differential Association of Plakoglobin, Beta-Catenin, and Alpha-Catenin With Vascular Endothelial Cadherin (VE-cadherin).
- Lavie, L., Hefetz, A., Luboshitzky, R., and Lavie, P. (2003). Plasma levels of nitric oxide and L-arginine in sleep apnea patients: effects of nCPAP treatment. *J. Mol. Neurosci.* *MN 21*, 57–63.
- Lavie, L., Vishnevsky, A., and Lavie, P. (2004). Evidence for lipid peroxidation in obstructive sleep apnea. *Sleep* *27*, 123–128.
- Lavie, P., Herer, P., and Hoffstein, V. (2000). Obstructive sleep apnoea syndrome as a risk factor for hypertension: population study. *BMJ* *320*, 479–482.
- Lee, W., Nagubadi, S., Kryger, M.H., and Mokhlesi, B. (2008). Epidemiology of Obstructive Sleep Apnea: a Population-based Perspective. *Expert Rev. Respir. Med.* *2*, 349–364.
- Lefebvre, B., Godin-Ribuot, D., Joyeux-Faure, M., Caron, F., Bessard, G., Lévy, P., and Stanke-Labesque, F. (2006). Functional assessment of vascular reactivity after chronic intermittent hypoxia in the rat. *Respir. Physiol. Neurobiol.* *150*, 278–286.
- Léoni, J., and Daubrosse, E. (2001). Physiopathologie de l'athérosclérose: mécanismes et prévention de l'athérombose (Besançon - France: Université de Franche-Comté - UFR de Pharmacie).
- Lévy, P., Bonsignore, M.R., and Eckel, J. (2009). Sleep, sleep-disordered breathing and metabolic consequences. *Eur. Respir. J.* *34*, 243–260.
- Lévy, P., Kohler, M., McNicholas, W.T., Barbé, F., McEvoy, R.D., Somers, V.K., Lavie, L., and Pépin, J.-L. (2015). Obstructive sleep apnoea syndrome. *Nat. Rev. Dis. Primer* *1*, 15015.

- Li, R.C., Haribabu, B., Mathis, S.P., Kim, J., and Gozal, D. (2011). Leukotriene B4 receptor-1 mediates intermittent hypoxia-induced atherogenesis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *184*, 124–131.
- Li, S.Q., Lin, Y.N., and Li, Q.Y. (2021). Soluble VE-cadherin: not just a marker of endothelial permeability. *Eur. Respir. J.* 2102241.
- Liu, J., Guo, Z., Zhang, Y., Wu, T., Ma, Y., Lai, W., and Guo, Z. (2020). LCK inhibitor attenuates atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice via regulating T cell differentiation and reverse cholesterol transport. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *139*, 87–97.
- Lizák, B., Szarka, A., Kim, Y., Choi, K.-S., Németh, C.E., Marcolongo, P., Benedetti, A., Bánhegyi, G., and Margittai, É. (2019). Glucose Transport and Transporters in the Endomembranes. *Int. J. Mol. Sci.* *20*, E5898.
- Lui, M.M.-S., and Sau-Man, M. (2012). OSA and atherosclerosis. *J. Thorac. Dis.* *4*, 164–172.
- Luo, Y., and Radice, G.L. (2005). N-cadherin acts upstream of VE-cadherin in controlling vascular morphogenesis. *J. Cell Biol.* *169*, 29–34.
- Luo, Y., Yu, M., Li, P., Huang, L., Wu, J., Kong, M., Li, Y., Wu, Z., Kang, Z., Yi, L., et al. (2021). The Expression and Role of microRNA-133a in Plasma of Patients with Kawasaki Disease. *Immunol. Invest.* 1–13.
- Makarenko, V.V., Usatyuk, P.V., Yuan, G., Lee, M.M., Nanduri, J., Natarajan, V., Kumar, G.K., and Prabhakar, N.R. (2014). Intermittent hypoxia-induced endothelial barrier dysfunction requires ROS-dependent MAP kinase activation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *306*, C745-752.
- Manin, G., Pons, A., Baltzinger, P., Moreau, F., Iamandi, C., Wilhelm, J.M., Lenoble, P., Kessler, L., and Kessler, R. (2015). Obstructive sleep apnoea in people with Type 1 diabetes: prevalence and association with micro- and macrovascular complications. *Diabet. Med. J. Br. Diabet. Assoc.* *32*, 90–96.
- Manuneehi Cholan, P., Cartland, S.P., Dang, L., Rayner, B.S., Patel, S., Thomas, S.R., and Kavurma, M.M. (2018). TRAIL protects against endothelial dysfunction in vivo and inhibits angiotensin-II-induced oxidative stress in vascular endothelial cells in vitro. *Free Radic. Biol. Med.* *126*, 341–349.
- Marin, J.M., Carrizo, S.J., Vicente, E., and Agustí, A.G.N. (2005). Long-term cardiovascular outcomes in men with obstructive sleep apnoea-hypopnoea with or without treatment with continuous positive airway pressure: an observational study. *Lancet Lond. Engl.* *365*, 1046–1053.
- Marín, N., Zamorano, P., Carrasco, R., Mujica, P., González, F.G., Quezada, C., Meininger, C.J., Boric, M.P., Durán, W.N., and Sánchez, F.A. (2012). S-Nitrosation of β -Catenin and p120 Catenin. *Circ. Res.* *111*, 553–563.
- McEvoy, R.D., Antic, N.A., Heeley, E., Luo, Y., Ou, Q., Zhang, X., Mediano, O., Chen, R., Drager, L.F., Liu, Z., et al. (2016). CPAP for Prevention of Cardiovascular Events in Obstructive Sleep Apnea. *N. Engl. J. Med.* *375*, 919–931.

- Mehta, D., and Malik, A.B. (2006). Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol. Rev.* *86*, 279–321.
- Millán, J., Hewlett, L., Glyn, M., Toomre, D., Clark, P., and Ridley, A.J. (2006). Lymphocyte transcellular migration occurs through recruitment of endothelial ICAM-1 to caveola- and F-actin-rich domains. *Nat. Cell Biol.* *8*, 113–123.
- Minoves, M., Morand, J., Perriot, F., Chatard, M., Gonthier, B., Lemarié, E., Menut, J.-B., Polak, J., Pépin, J.-L., Godin-Ribuot, D., et al. (2017). An innovative intermittent hypoxia model for cell cultures allowing fast Po₂ oscillations with minimal gas consumption. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *313*, C460–C468.
- Miyazaki, T., Taketomi, Y., Takimoto, M., Lei, X.-F., Arita, S., Kim-Kaneyama, J., Arata, S., Ohata, H., Ota, H., Murakami, M., et al. (2011). m-Calpain induction in vascular endothelial cells on human and mouse atheromas and its roles in VE-cadherin disorganization and atherosclerosis. *Circulation* *124*, 2522–2532.
- Morel, S., Chanson, M., Nguyen, T.D., Glass, A.M., Richani Saredidine, M.Z., Meens, M.J., Burnier, L., Kwak, B.R., and Taffet, S.M. (2014). Titration of the gap junction protein Connexin43 reduces atherogenesis. *Thromb. Haemost.* *112*, 390–401.
- Morini, M.F., Giampietro, C., Corada, M., Pisati, F., Lavarone, E., Cunha, S.I., Conze, L.L., O’Reilly, N., Joshi, D., Kjaer, S., et al. (2018). VE-Cadherin-Mediated Epigenetic Regulation of Endothelial Gene Expression. *Circ. Res.* *122*, 231–245.
- Mundi, S., Massaro, M., Scoditti, E., Carluccio, M.A., van Hinsbergh, V.W.M., Iruela-Arispe, M.L., and De Caterina, R. (2018). Endothelial permeability, LDL deposition, and cardiovascular risk factors—a review. *Cardiovasc. Res.* *114*, 35–52.
- Nakamura, K., and Ascoli, M. (1999). A dileucine-based motif in the C-terminal tail of the lutropin/choriogonadotropin receptor inhibits endocytosis of the agonist-receptor complex. *Mol. Pharmacol.* *56*, 728–736.
- Nakase, T., Ishikawa, T., and Miyata, H. (2017). Protective effects of connexins in atheromatous plaques in patients of carotid artery stenosis. *Neuropathol. Off. J. Jpn. Soc. Neuropathol.* *37*, 97–104.
- Nelson, W.J. (2008). Regulation of cell-cell adhesion by the cadherin-catenin complex. *Biochem. Soc. Trans.* *36*, 149–155.
- Nielsen, M.S., Axelsen, L.N., Sorgen, P.L., Verma, V., Delmar, M., and Holstein-Rathlou, N.-H. (2012). Gap Junctions. *Compr. Physiol.* *2*, 10.1002/cphy.c110051.
- Nieto, F.J., Young, T.B., Lind, B.K., Shahar, E., Samet, J.M., Redline, S., D’Agostino, R.B., Newman, A.B., Lebowitz, M.D., Pickering, T.G., et al. (2000). Association of Sleep-Disordered Breathing, Sleep Apnea, and Hypertension in a Large Community-Based Study. *JAMA* *283*, 1829–1836.
- Ning, Y., Zhang, T.-S., Wen, W.-W., Li, K., Yang, Y.-X., Qin, Y.-W., Zhang, H.-N., Du, Y.-H., Li, L.-Y., Yang, S., et al. (2019). Effects of continuous positive airway pressure on cardiovascular biomarkers

in patients with obstructive sleep apnea: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Sleep Breath. Schlaf Atm.* 23, 77–86.

Odile (2017). L'histoire de l'apnée du sommeil en bref.

Orsenigo, F., Giampietro, C., Ferrari, A., Corada, M., Galaup, A., Sigismund, S., Ristagno, G., Maddaluno, L., Koh, G.Y., Franco, D., et al. (2012). Phosphorylation of VE-cadherin is modulated by haemodynamic forces and contributes to the regulation of vascular permeability in vivo. *Nat. Commun.* 3, 1208.

Page, M.J., Sterne, J.A.C., Higgins, J.P.T., and Egger, M. (2021). Investigating and dealing with publication bias and other reporting biases in meta-analyses of health research: A review. *Res. Synth. Methods* 12, 248–259.

Pépin, J.L., Krieger, J., Rodenstein, D., Cornette, A., Sforza, E., Delguste, P., Deschaux, C., Grillier, V., and Lévy, P. (1999). Effective compliance during the first 3 months of continuous positive airway pressure. A European prospective study of 121 patients. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 160, 1124–1129.

Pépin, J.-L., Timsit, J.-F., Tamisier, R., and Lévy, P. (2014). Is CPAP effective in reducing blood pressure in minimally symptomatic obstructive sleep apnoea? *Thorax* 69, 1068–1070.

Peppard, P.E., Young, T., Palta, M., and Skatrud, J. (2000). Prospective study of the association between sleep-disordered breathing and hypertension. *N. Engl. J. Med.* 342, 1378–1384.

Pepper, M. (2000). Angiogenèse et morphogenèse de l'arbre vasculaire : de la biologie cellulaire à la clinique. *médecine/sciences* 16, 1378.

Philibert, C., Bouillot, S., Huber, P., and Faury, G. (2012). Protocadherin-12 deficiency leads to modifications in the structure and function of arteries in mice. *Pathol. Biol. (Paris)* 60, 34–40.

Pinet, F. (2004). À quoi sert le système endothéline ? *médecine/sciences* 20, 339–345.

Piotti, A., Novelli, D., Meessen, J.M.T.A., Ferlicca, D., Coppolecchia, S., Marino, A., Salati, G., Savioli, M., Grasselli, G., Bellani, G., et al. (2021). Endothelial damage in septic shock patients as evidenced by circulating syndecan-1, sphingosine-1-phosphate and soluble VE-cadherin: a substudy of ALBIOS. *Crit. Care Lond. Engl.* 25, 113.

Polena, H., Creuzet, J., Dufies, M., Sidibé, A., Khalil-Mgharbel, A., Salomon, A., Deroux, A., Quesada, J.-L., Roelants, C., Filhol, O., et al. (2018). The tyrosine-kinase inhibitor sunitinib targets vascular endothelial (VE)-cadherin: a marker of response to antitumoural treatment in metastatic renal cell carcinoma. *Br. J. Cancer* 118, 1179–1188.

Poulain, L., Richard, V., Lévy, P., Dematteis, M., and Arnaud, C. (2015). Toll-like receptor-4 mediated inflammation is involved in the cardiometabolic alterations induced by intermittent hypoxia. *Mediators Inflamm.* 2015, 620258.

Puissant, C., Abraham, P., Durand, S., Humeau-Heurtier, A., Faure, S., Rousseau, P., and Mahé, G. (2014). La fonction endothéliale : rôle, méthodes d'évaluation et limites. *J. Mal. Vasc.* 39, 47–56.

- Qi, J.-C., Zhang, L., Li, H., Zeng, H., Ye, Y., Wang, T., Wu, Q., Chen, L., Xu, Q., Zheng, Y., et al. (2019). Impact of continuous positive airway pressure on vascular endothelial growth factor in patients with obstructive sleep apnea: a meta-analysis. *Sleep Breath. Schlaf Atm.* 23, 5–12.
- Rabiet, M., Plantier, J., Rival, Y., Genoux, Y., Lampugnani, M., and Dejana, E. (1996). Thrombin-induced Increase in Endothelial Permeability Is Associated With Changes in Cell-To-Cell Junction Organization.
- Rea, D., Mirault, T., Cluzeau, T., Gautier, J.-F., Guilhot, F., Dombret, H., and Messas, E. (2014). Early onset hypercholesterolemia induced by the 2nd-generation tyrosine kinase inhibitor nilotinib in patients with chronic phase-chronic myeloid leukemia. *Haematologica* 99, 1197–1203.
- Riddell, D.R., and Owen, J.S. (1999). Nitric oxide and platelet aggregation. *Vitam. Horm.* 57, 25–48.
- Rocheftort, P., Chabaud, S., Pierga, J.-Y., Tredan, O., Brain, E., Bidard, F.-C., Schiffler, C., Polena, H., Khalil-Mgharbel, A., Vilgrain, I., et al. (2017). Soluble VE-cadherin in metastatic breast cancer: an independent prognostic factor for both progression-free survival and overall survival. *Br. J. Cancer* 116, 356–361.
- Russwurm, M., and Koesling, D. (2004). NO activation of guanylyl cyclase. *EMBO J.* 23, 4443–4450.
- Saitou, M., Furuse, M., Sasaki, H., Schulzke, J.-D., Fromm, M., Takano, H., Noda, T., and Tsukita, S. (2000). Complex Phenotype of Mice Lacking Occludin, a Component of Tight Junction Strands. *Mol. Biol. Cell* 11, 4131–4142.
- Salman, L.A., Shulman, R., and Cohen, J.B. (2020). Obstructive Sleep Apnea, Hypertension, and Cardiovascular Risk: Epidemiology, Pathophysiology, and Management. *Curr. Cardiol. Rep.* 22, 6.
- Sanner, B.M., Konermann, M., Tepel, M., Groetz, J., Mummenhoff, C., and Zidek, W. (2000). Platelet function in patients with obstructive sleep apnoea syndrome. *Eur. Respir. J.* 16, 648–652.
- Sarelius, I.H., and Glading, A.J. (2015). Control of vascular permeability by adhesion molecules. *Tissue Barriers* 3, e985954.
- Schmitt, M.M.N., Megens, R.T.A., Zerneck, A., Bidzhekov, K., van den Akker, N.M., Rademakers, T., van Zandvoort, M.A., Hackeng, T.M., Koenen, R.R., and Weber, C. (2014). Endothelial junctional adhesion molecule-a guides monocytes into flow-dependent predilection sites of atherosclerosis. *Circulation* 129, 66–76.
- Schober, A.-K., Neurath, M.F., and Harsch, I.A. (2011). Prevalence of sleep apnoea in diabetic patients. *Clin. Respir. J.* 5, 165–172.
- Schulz, B., Pruessmeyer, J., Maretzky, T., Ludwig, A., Blobel, C.P., Saftig, P., and Reiss, K. (2008). Disintegrin Metalloprotease (ADAM) 10 Regulates Endothelial Permeability and T Cell Transmigration by Proteolysis of Vascular Endothelial Cadherin. *Circ. Res.* 102, 1192–1201.
- Schwarz, E.I., Puhan, M.A., Schlatzer, C., Stradling, J.R., and 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.

Seo, H.-J., Lee, S., Kim, J.-E., and Jang, J.-H. (2020). Behavior of Human Umbilical Vein Endothelial Cells on Titanium Surfaces Functionalized with VE-Cadherin Extracellular 1-4 Domains. *Protein Pept. Lett.* *27*, 895–903.

Sidibé, A., Mannic, T., Arboleas, M., Subileau, M., Gulino-Debrac, D., Bouillet, L., Jan, M., Vandhuick, T., Le Loët, X., Vittecoq, O., et al. (2012). Soluble VE-cadherin in rheumatoid arthritis patients correlates with disease activity: evidence for tumor necrosis factor α -induced VE-cadherin cleavage. *Arthritis Rheum.* *64*, 77–87.

Simionescu, M., and Simionescu, N. (1991). Endothelial Transport of Macromolecules: Transcytosis and Endocytosis. *A Look From Cell Biology.*

Simionescu, M., Gafencu, A., and Antohe, F. (2002). Transcytosis of plasma macromolecules in endothelial cells: a cell biological survey. *Microsc. Res. Tech.* *57*, 269–288.

Sitia, S., Tomasoni, L., Atzeni, F., Ambrosio, G., Cordiano, C., Catapano, A., Tramontana, S., Perticone, F., Naccarato, P., Camici, P., et al. (2010). From endothelial dysfunction to atherosclerosis. *Autoimmun. Rev.* *9*, 830–834.

Six, I., Chillon, J.M., and Kamel, S. (2020). La structure et la fonction vasculaires. *Rev. Francoph. Lab.* *2020*, 30–39.

Soeki, T., Tamura, Y., Shinohara, H., Sakabe, K., Onose, Y., and Fukuda, N. (2004). Elevated concentration of soluble vascular endothelial cadherin is associated with coronary atherosclerosis. *Circ. J. Off. J. Jpn. Circ. Soc.* *68*, 1–5.

Song, D., Fang, G., Mao, S.-Z., Ye, X., Liu, G., Miller, E.J., Greenberg, H., and Liu, S.F. (2018). Selective inhibition of endothelial NF- κ B signaling attenuates chronic intermittent hypoxia-induced atherosclerosis in mice. *Atherosclerosis* *270*, 68–75.

SPLF, S. (2010). Recommandations pour la pratique clinique (RPC) du syndrome d'apnées hypopnées obstructives du sommeil SAHOS de l'adulte (Document de travail- SPLF-SFRMS).

Stan, R.V. (2006). Endocytosis pathways in endothelium: how many? *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* *290*, L806–L808.

Študentová, H., Indráková, J., Petrová, P., Kamínek, M., Kalábová, H., Šrámek, V., Adam, T., and Melichar, B. (2016). Risk factors of atherosclerosis during systemic therapy targeting vascular endothelial growth factor. *Oncol. Lett.* *11*, 939–944.

Su, W., and Kowalczyk, A.P. (2017). The VE-cadherin cytoplasmic domain undergoes proteolytic processing during endocytosis. *Mol. Biol. Cell* *28*, 76–84.

Subbarao, K., Jala, V.R., Mathis, S., Suttles, J., Zacharias, W., Ahamed, J., Ali, H., Tseng, M.T., and Haribabu, B. (2004). Role of leukotriene B4 receptors in the development of atherosclerosis: potential mechanisms. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *24*, 369–375.

- Tachikawa, R., Hamada, S., Azuma, M., Toyama, Y., Murase, K., Tanizawa, K., Inouchi, M., Handa, T., Oga, T., Mishima, M., et al. (2014). Impact of obstructive sleep apnea on abdominal aortic diameters. *Am. J. Cardiol.* *114*, 618–623.
- Tamisier, R., Gilmartin, G.S., Launois, S.H., Pépin, J.L., Nespoulet, H., Thomas, R., Lévy, P., and Weiss, J.W. (2009). A new model of chronic intermittent hypoxia in humans: effect on ventilation, sleep, and blood pressure. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* *107*, 17–24.
- Tamisier, R., Pépin, J.L., Rémy, J., Baguet, J.P., Taylor, J.A., Weiss, J.W., and Lévy, P. (2011). 14 nights of intermittent hypoxia elevate daytime blood pressure and sympathetic activity in healthy humans. *Eur. Respir. J.* *37*, 119–128.
- Tamisier, R., Tan, C.O., Pepin, J.-L., Levy, P., and Taylor, J.A. (2015). Blood Pressure Increases in OSA due to Maintained Neurovascular Sympathetic Transduction: Impact of CPAP. *Sleep* *38*, 1973–1980.
- Telo', P., Breviario, F., Huber, P., Panzeri, C., and Dejana, E. (1998). Identification of a Novel Cadherin (Vascular Endothelial Cadherin-2) Located at Intercellular Junctions in Endothelial Cells *. *J. Biol. Chem.* *273*, 17565–17572.
- Theorell-Haglöw, J., Hoyos, C.M., Phillips, C.L., Yee, B.J., Melehan, K.L., Liu, P.Y., Cistulli, P.A., and Grunstein, R.R. (2019). Associations Between Obstructive Sleep Apnea and Measures of Arterial Stiffness. *J. Clin. Sleep Med. JCSM Off. Publ. Am. Acad. Sleep Med.* *15*, 201–206.
- Thibeault, S., Rautureau, Y., Oubaha, M., Faubert, D., Wilkes, B.C., Delisle, C., and Gratton, J.-P. (2010). S-nitrosylation of beta-catenin by eNOS-derived NO promotes VEGF-induced endothelial cell permeability. *Mol. Cell* *39*, 468–476.
- Thompson, S.R., Ackermann, U., and Horner, R.L. (2001). Sleep as a teaching tool for integrating respiratory physiology and motor control. *Adv. Physiol. Educ.* *25*, 101–116.
- Tran, K.A., Zhang, X., Predescu, D., Huang, X., Machado, R.F., Göthert, J.R., Malik, A.B., Valyi-Nagy, T., and Zhao, Y.-Y. (2016). Endothelial β -Catenin Signaling Is Required for Maintaining Adult Blood-Brain Barrier Integrity and Central Nervous System Homeostasis. *Circulation* *133*, 177–186.
- Treps, L., and Gavard, J. (2015). L'angiogenèse tumorale: Quand l'arbre de vie tourne mal. *médecine/sciences* *31*, 989–995.
- Tuma, P.L., and Hubbard, A.L. (2003). Transcytosis: crossing cellular barriers. *Physiol. Rev.* *83*, 871–932.
- Van Itallie, C.M., and Anderson, J.M. (2014). Architecture of tight junctions and principles of molecular composition. *Semin. Cell Dev. Biol.* *36*, 157–165.
- Vandenbroucke St Amant, E., Tauseef, M., Vogel, S.M., Gao, X.-P., Mehta, D., Komarova, Y.A., and Malik, A.B. (2012). PKC α Activation of p120-Catenin Serine 879 Phospho-Switch Disassembles VE-Cadherin Junctions and Disrupts Vascular Integrity. *Circ. Res.* *111*, 739–749.

- Vermette, D., Hu, P., Canarie, M.F., Funaro, M., Glover, J., and Pierce, R.W. (2018). Tight junction structure, function, and assessment in the critically ill: a systematic review. *Intensive Care Med. Exp.* 6, 37.
- Vilaseca, A., Campillo, N., Torres, M., Musquera, M., Gozal, D., Montserrat, J.M., Alcaraz, A., Touijer, K.A., Farré, R., and Almendros, I. (2017). Intermittent hypoxia increases kidney tumor vascularization in a murine model of sleep apnea. *PLoS One* 12, e0179444.
- Vilgrain, I., Sidibé, A., Polena, H., Cand, F., Mannic, T., Arboleas, M., Boccard, S., Baudet, A., Gulino-Debrac, D., Bouillet, L., et al. (2013). Evidence for post-translational processing of vascular endothelial (VE)-cadherin in brain tumors: towards a candidate biomarker. *PLoS One* 8, e80056.
- Villasante, A., Pacheco, A., Pau, E., Ruiz, A., Pellicer, A., and Garcia-Velasco, J.A. (2008). Soluble vascular endothelial-cadherin levels correlate with clinical and biological aspects of severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 23, 662–667.
- Vlachantoni, I.-T., Dikaiakou, E., Antonopoulos, C.N., Stefanadis, C., Daskalopoulou, S.S., and Petridou, E.T. (2013). Effects of continuous positive airway pressure (CPAP) treatment for obstructive sleep apnea in arterial stiffness: a meta-analysis. *Sleep Med. Rev.* 17, 19–28.
- Wallez, Y., and Huber, P. (2008). Endothelial adherens and tight junctions in vascular homeostasis, inflammation and angiogenesis. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1778, 794–809.
- Wallez, Y., Vilgrain, I., and Huber, P. (2006). Angiogenesis: The VE-cadherin Switch.
- Wallez, Y., Cand, F., Cruzalegui, F., Wernstedt, C., Souchelnytskyi, S., Vilgrain, I., and Huber, P. (2007). Src kinase phosphorylates vascular endothelial-cadherin in response to vascular endothelial growth factor: identification of tyrosine 685 as the unique target site. *Oncogene* 26, 1067–1077.
- Wang, J., Yu, W., Gao, M., Zhang, F., Gu, C., Yu, Y., and 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. Cardiovasc. Cerebrovasc. Dis.* 4, e002454.
- Wang, Y., Xu, H., Qian, Y., Guan, J., Yi, H., and Yin, S. (2017). Patients with Obstructive Sleep Apnea Display Decreased Flow-Mediated Dilatation: Evidence from a Meta-Analysis. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* 23, 1069–1082.
- Watson, N.F. (2016). Health Care Savings: The Economic Value of Diagnostic and Therapeutic Care for Obstructive Sleep Apnea. *J. Clin. Sleep Med. JCSM Off. Publ. Am. Acad. Sleep Med.* 12, 1075–1077.
- Weaver, T.E., Maislin, G., Dinges, D.F., Bloxham, T., George, C.F.P., Greenberg, H., Kader, G., Mahowald, M., Younger, J., and Pack, A.I. (2007). Relationship Between Hours of CPAP Use and Achieving Normal Levels of Sleepiness and Daily Functioning. *Sleep* 30, 711–719.
- Weber, C., Fraemohs, L., and Dejana, E. (2007). The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 467–477.

- Weiss, N., Miller, F., Cazaubon, S., and Couraud, P.-O. (2009). Biologie de la barrière hématoencéphalique : Partie I. *Rev. Neurol. (Paris)* 165, 863–874.
- Wessel, F., Winderlich, M., Holm, M., Frye, M., Rivera-Galdos, R., Vockel, M., Linnepe, R., Ipe, U., Stadtmann, A., Zarbock, A., et al. (2014). Leukocyte extravasation and vascular permeability are each controlled in vivo by different tyrosine residues of VE-cadherin. *Nat. Immunol.* 15, 223–230.
- van Wetering, S., van Buul, J.D., Quik, S., Mul, F.P.J., Anthony, E.C., Klooster, J.-P. ten, Collard, J.G., and Hordijk, P.L. (2002). Reactive oxygen species mediate Rac-induced loss of cell-cell adhesion in primary human endothelial cells. *J. Cell Sci.* 115, 1837–1846.
- Wong, C.W., Christen, T., Roth, I., Chadjichristos, C.E., Derouette, J.-P., Foglia, B.F., Chanson, M., Goodenough, D.A., and Kwak, B.R. (2006). Connexin37 protects against atherosclerosis by regulating monocyte adhesion. *Nat. Med.* 12, 950–954.
- Wrobel, T., Mazur, G., Wolowiec, D., Jazwiec, B., Sowinska, E., and Kuliczowski, K. (2006). sVE-cadherin and sCD146 serum levels in patients with multiple myeloma. *Clin. Lab. Haematol.* 28, 36–39.
- Wu, Y., Wang, F., Fan, L., Zhang, W., Wang, T., Du, Y., and Bai, X. (2018). Baicalin alleviates atherosclerosis by relieving oxidative stress and inflammatory responses via inactivating the NF- κ B and p38 MAPK signaling pathways. *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* 97, 1673–1679.
- Xiao, K., Garner, J., Buckley, K.M., Vincent, P.A., Chiasson, C.M., Dejana, E., Faundez, V., and Kowalczyk, A.P. (2005). p120-Catenin Regulates Clathrin-dependent Endocytosis of VE-Cadherin. *Mol. Biol. Cell* 16, 5141–5151.
- Xie, C., Zhu, R., Tian, Y., and Wang, K. (2017). Association of obstructive sleep apnoea with the risk of vascular outcomes and all-cause mortality: a meta-analysis. *BMJ Open* 7, e013983.
- Young, T., Peppard, P., Palta, M., Hla, K.M., Finn, L., Morgan, B., and Skatrud, J. (1997). Population-based study of sleep-disordered breathing as a risk factor for hypertension. *Arch. Intern. Med.*
- Yu, L., Liu, J., Huang, X., and Jiang, Q. (2019a). Adverse effects of dasatinib on glucose-lipid metabolism in patients with chronic myeloid leukaemia in the chronic phase. *Sci. Rep.* 9, 17601.
- Yu, W.-K., McNeil, J.B., Wickersham, N.E., Shaver, C.M., Bastarache, J.A., and Ware, L.B. (2019b). Vascular endothelial cadherin shedding is more severe in sepsis patients with severe acute kidney injury. *Crit. Care Lond. Engl.* 23, 18.
- Zhang, R.-Y., Liu, Y.-Y., Li, L., Cui, W., Zhao, K.-J., Huang, W.-C., Gu, X.-W., Liu, W., Wu, J., Min, D., et al. (2010). Increased levels of soluble vascular endothelial cadherin are associated with poor outcome in severe sepsis. *J. Int. Med. Res.* 38, 1497–1506.
- Zhang, Y., Li, L., You, J., Cao, J., and Fu, X. (2013). Effect of 7-difluoromethyl-5, 4'-dimethoxygenistein on aorta atherosclerosis in hyperlipidemia ApoE(-/-) mice induced by a cholesterol-rich diet. *Drug Des. Devel. Ther.* 7, 233–242.

Zhao, Z., Mu, H., Li, Y., Liu, Y., Zou, J., and Zhu, Y. (2020). Clinicopathological and prognostic value of hypoxia-inducible factor-1 α in breast cancer: a meta-analysis including 5177 patients. *Clin. Transl. Oncol. Off. Publ. Fed. Span. Oncol. Soc. Natl. Cancer Inst. Mex.* 22, 1892–1906.

Zhou, M., Guo, B., Wang, Y., Yan, D., Lin, C., and Shi, Z. (2017). The Association Between Obstructive Sleep Apnea and Carotid Intima-Media Thickness: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Angiology* 68, 575–583.

Zhou, S., Wang, Y., Tan, Y., Cai, X., Cai, L., Cai, J., and Zheng, Y. (2014). Deletion of Metallothionein Exacerbates Intermittent Hypoxia-Induced Oxidative and Inflammatory Injury in Aorta. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2014, e141053.

Zuraw, B.L., and Christiansen, S.C. (2016). HAE Pathophysiology and Underlying Mechanisms. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 51, 216–229.

Zychowski, K.E., Sanchez, B., Pedrosa, R.P., Lorenzi-Filho, G., Drager, L.F., Polotsky, V.Y., and Campen, M.J. (2016). Serum from obstructive sleep apnea patients induces inflammatory responses in coronary artery endothelial cells. *Atherosclerosis* 254, 59–66.

V. Annexes

1. **Annexe 1 : Revue sur le rôle des fibres élastiques dans la structure et la fonction artérielle et perspectives thérapeutiques des maladies liées à leurs altérations.**

Journal Pre-proof

Rise and fall of elastic fibers from development to aging. Consequences on arterial structure-function and therapeutical perspectives

Wassim Fhayli, Quentin Boëté, Olfa Harki, Anne Briançon-Marjollet, Marie-Paule Jacob, Gilles Faury



PII: S0945-053X(19)30199-4

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2019.08.005>

Reference: MATBIO 1591

To appear in: *Matrix Biology*

Received date: 6 May 2019

Revised date: 3 August 2019

Accepted date: 26 August 2019

Please cite this article as: W. Fhayli, Q. Boëté, O. Harki, et al., Rise and fall of elastic fibers from development to aging. Consequences on arterial structure-function and therapeutical perspectives, *Matrix Biology*(2019), <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2019.08.005>

This is a PDF file of an article that has undergone enhancements after acceptance, such as the addition of a cover page and metadata, and formatting for readability, but it is not yet the definitive version of record. This version will undergo additional copyediting, typesetting and review before it is published in its final form, but we are providing this version to give early visibility of the article. Please note that, during the production process, errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

© 2019 Published by Elsevier.

Rise and fall of elastic fibers from development to aging. Consequences on arterial structure-function and therapeutical perspectives.

Wassim Fhayli*[@], Quentin Boëté*[@], Olfa Harki*[@], Anne Briançon-Marjollet[@], Marie-Paule Jacob[§],
Gilles Faury^{@#}

*contributed equally

[@] Univ. Grenoble Alpes, Inserm U1042, CHU Grenoble Alpes, HP2, 38000 Grenoble, France.

[§] INSERM, U1148, and Hopital Bichat-Claude Bernard, 46 rue Henri Huchard, 75877 Paris, France.

[#]corresponding author: Pr. Gilles Faury. Laboratoire HP2 - INSERM U1042 - Université Grenoble Alpes - Bâtiment Jean Roget - Facultés de Médecine et de Pharmacie Domaine de La Merci - 38706 La Tronche Cedex - FRANCE ; Tel: (33) 4 76 63 75 39 ; Fax: (33) 4 76 63 71 78 ; E-mail: Gilles.Faury@univ-grenoble-alpes.fr

ABSTRACT

In the arteries of vertebrates, evolution has given rise to resilient macromolecular structures, elastin and elastic fibers, capable of sustaining an elevated blood pressure and smoothing the discontinuous blood flow and pressure generated by the heart. Elastic fibers are produced only during development and childhood, before being progressively degraded by mechanical stress and enzymatic activities during adulthood and aging. During this period, arterial elastic fiber calcification and loading of lipids also occur, all of these events conducting to arteriosclerosis. This leads to a progressive dysfunction of the large elastic arteries inducing elevated blood pressure as well as altered hemodynamics and organ perfusion, which induce more global malfunctions of the body during normal aging. Additionally, some arterial conditions occur more frequently with advancing age, such as atherosclerosis or aneurysms, which are called age-related diseases or pathological aging. The physiological or pathological degradation of elastic fibers and function of elastic arteries seemed to be rather inevitable over time. However, during the recent years, different molecules - including several ATP-dependent potassium channel openers - have been shown to re-induce elastin production and elastic fiber assembly, leading to improvements in the arterial structure and function or in organ perfusion. This review summarizes the changes in the arterial elastic fibers and structure from development until aging, and presents some of the potential pharmacotherapies leading to elastic fiber neosynthesis and arterial function improvement.

KEYWORDS

elastin - elastic fibers, arteries, signaling, biomechanics, development, aging

INTRODUCTION

The extensible tissues, such as blood vessels, lungs and skin, contain elastic fibers which endow them with elasticity. The arteries are biological tubes, conducting blood from the heart to other organs. They have complex histological structures with varying functions, sizes and anatomical locations, although their walls are all composed of three layers, from the lumen to the exterior: the intima, media and adventitia. In the mature artery, the intima is mainly composed of endothelial cells (constituting the interface between the blood and the vascular wall) adhering to a basement membrane, a few fibroblasts, smooth muscle cells and sparse elastic fibers. The media is mainly made of smooth muscle cells interspersed with various amounts of elastic fibers or, in large arteries, nicely organized concentric elastic lamellae alternating with smooth muscle cell layers with sparse microfibrils and collagen fibers. The first elastic lamella, called the internal elastic lamina, separates the intima from the media, while the more external elastic lamella, called the external elastic lamina, separates the media from the adventitia, all the elastic lamellae accounting for elasticity and resistance to stretch of the wall [1,2]. Collagen fibers and fibroblasts are the major components of the adventitia, which also contains a few microfibrils and elastic fibers [3].

According to their distance from the heart and subsequent decreasing diameters, arteries are divided into large elastic arteries (the aorta and its proximal branches), medium-sized muscular arteries, and smaller distal arterioles [4]. Arteries, especially large arteries, have elastic properties related to their elastic fiber content (and organization) in the media, which decreases with the distance from the heart. The elastic fiber core consists of elastin (90%), which is a polymer of the monomeric precursor tropoelastin and the dominant contributor to the elastic fiber property of elasticity, while the peripheral parts of the elastic fibers are made of fibrillin-rich microfibrils (10%) [5–7]. Elastin and, to a lesser extent, microfibrils provide the elastic fibers and the large elastic arteries with elasticity [8–10], allowing for distention, storage of energy and stroke volume when distended during systole, then discharge of energy and stored blood volume when they return to their initial dimensions during

diastole. This phenomenon, known as the Windkessel effect, helps to decrease the load on the heart and smoothens the arterial blood pressure and flow by minimizing the systolic flow and maximizing the diastolic flow in the arterioles [10–13].

Elastin is synthesized from the second half of gestation until the end of childhood, and the maximum elastin quantity in the body is reached before adulthood [12]. During vessel development, elastin and microfibrils are essentially synthesized by vascular smooth muscle cells (VSMC) to form the elastic fibers through complex multistep processes. In the large artery wall, the elastic fibers are then arranged into concentric elastic lamellae alternating with layers of circumferentially-oriented smooth muscle cells or are present in the interlamellar spaces, an elastic lamella and its adjacent VSMC layer forming a lamellar unit [14].

Elastic fibers are progressively altered by mechanical and enzymatic processes during adulthood and aging. Actually, several age-dependent mechanisms contribute to the arterial stiffening, including medial calcification and lipid deposition [15], as well as elastic fiber disruptions due to the increased activity of elastin-degrading enzymes, such as several matrix metalloproteases (MMP), including MMP-2 and MMP-9 [5,16]. As elastic fibers are gradually damaged, their load-bearing function is presumably taken over by collagen which renders the vessel wall less elastic and more rigid, as observed in the aging process [17]. The loss of elastin and elastic fibers leads to a decrease in the elastin/collagen ratio, resulting in increased arterial stiffness and decreased arterial distensibility [16]. Many studies have also shown that diabetes mellitus and arterial hypertension are important risk factors for functional and structural damages to the arterial wall, resulting in early arterial stiffening [18]. Increased arterial stiffness causes arterial wall wave reflections at the end of the systole rather than during diastole, which increase systolic and decrease diastolic blood pressures, thus increase pulse pressure [19]. The increase in systolic arterial blood pressure increases the systolic workload of the left ventricle (LV), leading to increased oxygen consumption of the heart, LV hypertrophy and interstitial fibrosis. All of these events related to the increase in arterial stiffness favor cardiovascular

morbidity and mortality [20] and predispose to the development of aging-heart failure [21,22]. Arterial stiffness increases with age in both men and women, as measured by carotid to femoral pulse-wave velocity (PWV), a biomarker of arterial stiffness [23,24], although vascular aging does not follow the same chronology in both sexes [25]. Prepuberal females present higher arterial stiffness than boys whereas, during their fertile years, females exhibit equal (central large elastic arteries) or lower (peripheral muscular arteries) arterial stiffness and reduced risk of cardiovascular disease, compared to males [26,27]. This female-related cardiovascular protection might be due to the presence of different isoforms of collagen and sex hormones - mainly estrogens [21]. Estrogens protect the endothelium by increasing endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression and NO production, and modulating prostacyclin and thromboxane A₂ releases [25]. Later on, during the post-menopausal phase, female aortic distensibility declines sharply and becomes similar to that of males by the age of 60, correlating with hypertension and increased cardiovascular risk in older women [27–30].

This review presents the major determinants of an appropriate structure and function of elastic fibers in large arteries during development and normal aging, as well as two major age-related vascular diseases, i.e. atherosclerosis and aneurysms. The perspective of pharmacotherapies aiming at repairing the damaged elastic fibers is also illustrated.

FROM DEVELOPMENT UNTIL MATURITY - ROLE OF ELASTIC FIBERS IN THE ARTERIAL STRUCTURE AND FUNCTION.

In mammals, the systemic blood pressure is regularly increasing with the developmental stage, from - for instance in sheeps, rats or humans- a few mmHg during early gestation to several dozens of mmHg at birth, and around 100 mmHg or above during adulthood [11]. On the contrary, the blood pressure in the pulmonary circulation decreases at birth from, for example in humans and pigs, a

foetal blood pressure of 40-60 mm Hg, to 20-30 mmHg one day after birth and 10-15 mm Hg a few days after birth and until adulthood [11].

In order to sustain these developmental blood pressure changes, which modify the mechanical stresses applied to the blood vessel and stimulating the vascular cells by mechanosensing / mechanotransduction [31], the arteries undergo a progressive remodeling throughout the developmental process, until adulthood. These changes include an increase in diameter and wall thickness of the systemic arteries [32] and, conversely, a decrease in wall thickness at birth regarding the pulmonary arteries [33].

During the development of most mammals, transcription factors such as SOX7 trigger the constitution of the aorta [34], which is first an endothelium-based tube supported by extracellular matrix (ECM), before being surrounded by mesenchymal cells, myoblasts then smooth muscle cells, under the influence of major factors and pathways, including EphB/ephrin-B2 signaling [35]. Around mid-gestation, the elastogenic vascular cells (mainly VSMCs in the media) then produce microfibril-based fibers rich in fibrillins associated to numerous proteins which are important for the structure and function of these fibers. Arterial microfibril assembly requires fibronectin, integrins and heparan sulphate proteoglycans, and starts with the N- and C-terminal processing -by furin- of fibrillins, which then homotypically interact to form microfibrils. Microfibril-associated proteins, most of them presenting different isoforms, then bind to this initial structure, including in particular: latent TGF- β -binding proteins (LTBPs, implicated in microfibrillar latent TGF- β sequestration), microfibril-associated glycoproteins (MAGPs, participating to elastin deposition onto microfibrils and binding TGF- β and fibronectin) and a disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin-type) with thrombospondin type-I motif-like (ADAMTSL, involved at least in fibrillin-1 biogenesis, deposition or assembly) [7]. Some of these constituents are, however, not essential for elastic fiber assembly and function. It is the case for MAGP-1 and -2, although they are more generally regulators of normal vascular development. and their mutation or deficiency is associated with arterial dilation/aneurysm

[36]. Microfibril fibers possess elastic properties and are sufficient to smoothen the blood flow and pressure and bear the limited stress applied by a low blood pressure during early gestation [11]. However, they are unable to exert these functions under stresses of higher amplitude, when the blood pressure increases throughout the gestation. Therefore, during the last third of gestation and under the influence of different factors, including TGF- β [37], VSMCs synthesize and secrete tropoelastin, the precursor of elastin. Tropoelastin is extracellularly assembled with microfibrils to form mature elastic fibers, which are able to accommodate the forces applied to the arterial wall by higher blood pressures [6,7,12,38]. After exportation, tropoelastin may bind to integrins, at least of the $\alpha_v\beta_3$ type, and self-associates to form microaggregates that are then cross-linked (between lysine residues) by lysyl oxydase (LOX). At this stage, fibulin-5 contributes to the limitation of the size of the microaggregates, while fibulin-4 allows for elastin cross-linking by LOX. The microaggregates are later deposited onto microfibrils, where they first align and self-assemble (through a reversible process called coalescence) before being cross-linked by LOX or lysyl oxidase-like-1 (LOXL1), which stabilizes the structure. Fibulin-5 is again involved in this process since it facilitates elastin microaggregate deposition onto microfibrils and, together with fibulin-4, elastin cross-linking. The completion of this step leads to stable and insoluble elastin polymers, which will be the major component of the mature elastic fiber, composed of an elastin core (90%) surrounded by microfibrils (10%) [7].

The major part of the elastic fibers are ultimately structured, in the arterial wall, into thicker concentric elastic lamellae before birth [39,40], resembling in some ways to the elastic lamina present in the pleura of the developing lung [41]. The interplay between VSMCs and elastin/elastic fibers is of major importance in the arterial development since VSMCs produce elastin, which has been shown to be an important regulator of VSMC proliferation as well as intracellular (contractile components) and extracellular (migration) organization [42–44]. After birth, with the continuing augmentation of the blood pressure, elastin and, more slowly, collagen contents increase, together with elastic fiber

thickness and the number of elastic lamellae [45]. Collagen I and elastin expressions peak during post-natal growth then return to low levels, while elastin content reaches a plateau before the end of growth [6,12]. Conversely, despite cell proliferation and because of the increase in elastin and collagen contents, the cellularity (= relative cell content) of the large artery wall decreases during the postnatal period [46–48].

The remodeling of the developing elastic artery wall results in a modification of its mechanical properties, which need to be adapted to the increasing blood pressure and, subsequently, the augmented forces applied to the wall, to permit an appropriate hemodynamics. For instance, the large arteries of the developing sheep are less distensible at low pressure, as compared to vessels from adults [46], whereas the wall thickness and stiffness increase from the prenatal life until adulthood at the corresponding physiological blood pressures or above. On the contrary, by comparison with the situation in the fetus, it has been shown in the pig that the pulmonary arteries become less distensible while their walls are thinning during the period following birth, concomitantly with the postnatal decrease in blood pressure [49].

All the structural components of the arterial wall and their organization account for the mechanical properties of the artery. The endothelial cells do not have a clear direct or structural role in the arterial mechanics. However, they indirectly impact the mechanical properties of the arteries through the secretion of different mediators which modulate the VSMC function. Besides regulating the contraction of VSMCs, therefore vasomotricity, endothelium-derived agents such as NO also stimulate the production of elastin by VSMCs, therefore impacting the arterial mechanics [50,51]. In resting conditions, VSMCs do not seem to account -as structural components- for much of the elastic properties of elastic and muscular arteries, except in the microcirculation [52–55]. However, they are able to regulate the arterial mechanics, resistance and capacity, through their ability to constrict [52,54] as well as to produce and organize extracellular matrix components, like elastin and collagen [56].

Regarding the extracellular matrix components, the poorly distensible collagen fibers (elastic modulus, indicative of stiffness, ~1 GPa) are a major contributor to the arterial wall mechanics. Their resilience and stiffness confer to the arterial wall their resistance to over-extension and therefore protects them against alterations at high strains [12,53]. Vascular microfibrils, mainly made of fibrillins - especially fibrillin-1 - [7], also play a role in the arterial wall mechanics. Their removal from the pig aorta induces stiffness reduction at low strain and increase at high strain [9]. Elastin is present in substantial amounts in the elastic fibers of the elastic lamellae and interlamellar spaces of the large artery walls (>50 % of the proximal aorta dry weight), endowing them with elastic properties [12,57]. The elastic fiber can extend up to ~140%, with an elastic modulus of ~0.4 MPa [53,58], ~1000 times lower than that of collagen fibers, while the lamellar unit, which is the functional unit of the wall from a mechanical point of view, presents a slightly higher elastic modulus of 0.5-0.7 MPa because of the minor contribution of VSMCs. The elastic fibers have been shown to impart a compressive stress on the collagen, the interplay between these two components explaining the mechanical properties of the composite arterial wall [59]. The mechanical properties of the elastic fibers and lamellar units below or in the physiological blood pressure range explain the ability of the large arteries to smoothen the blood pressure and flow by maintaining a high blood pressure during the diastole [53,60].

The number of concentric elastic lamellae/lamellar units in the arterial wall is also adapted to sustain the mechanical stress imposed by the blood pressure, to maintain the tension per lamella around 1-3 N.m⁻¹ [14]. Therefore, the number of elastic lamellae decreases downstream the vascular tree (from the elastic to the muscular arteries), when the blood pressure, vessel diameter and subsequent mechanical stress imposed to the arterial wall decrease. For instance, in the rat, 10-13 concentric lamellar units are present in the ascending aorta, 1-3 in the iliac-femoral arteries and 0 in smaller arteries [61]. It has also been shown that lamellar and interlamellar elastic fibers might contribute differentially to the arterial wall mechanical properties [57,62].

During adulthood, the elastic fibers exert their action despite progressive degradation by different enzymes, such as matrix metalloproteinases-2 and -9 (MMP-2 and MMP-9) [5], leading to the release of elastin peptides in tissues and the circulation [63]. These peptides bind to high affinity receptors in many cell types [64] and, in particular, trigger signals leading to intracellular calcium elevation in VSMCs and endothelial cells, and subsequent endothelium- and NO-dependent vasodilation [65–68]. Finally, genetic deficiency in the major components of elastic fibers results in discontinuous and irregular elastic fibers, as well as alterations of the arterial wall in mouse models and humans. In the arteries, genetic deficiency in elastin leads to VSMC proliferation, increased number of elastic lamellae and/or stenotic remodeling (Supravalvular aortic stenosis or Williams syndrome) [42,69–72] whereas deficiency in fibrillin-1 leads to aneurysmal pathologies (Marfan syndrome) [73,74].

NORMAL ARTERIAL AGING AND ELASTIC FIBERS

Age-related alterations of elastic fibers lead to impairments of the vessel mechanical properties and have profound effects on the morbidity and mortality in humans [16,75,76].

Elastic fibers are extremely stable over time (elastin half-life of several decades) [77] and particularly resistant to chemical and physical attacks (pH changes, heat, stretching) [78,79]. For these reasons, despite the end of their synthesis after adolescence and their slow alteration throughout adulthood and aging, elastic fibers can endow the arteries with some elasticity until an advanced age [30]. However, the high resistance of elastic fibers is not sufficient to ensure their optimal function throughout life, since the gradual deterioration of these fibers during normal aging progressively alters their elastic properties. Three main alteration mechanisms are involved:

I) The cyclic mechanical strain imposed over a lifetime by about 3 billions cardiac cycles induces a progressive accumulation of molecular ruptures which progressively modify the elastic fiber structure and lower its elasticity (arterial fatigue) [80],

II) The binding of several environmental factors (mainly glucose, lipids and calcium) over time modifies the molecular arrangement and interactions, and stiffens the elastic fibers [16]. The progressive calcification of the arterial wall elastin during aging [5] has a potentiating effect on the retention and fixation of cholesterol on the surface of elastic fibers. This contributes to the loss of elasticity of the arterial wall and constitutes an important risk factor involved in atherosclerosis and myocardial infarction [81,82]. Also, non-enzymatic glycation, during which glucose slowly and spontaneously reacts over time with the free $-NH_2$ groups of the amino-acids, generates Advanced Glycation End products (AGEs) which bridge the residues, therefore altering the protein structure-function. Also, AGE-mediated crosslinking between adjacent proteins leads to the lysis of elastic fibers and their replacement by other matrix components, especially collagen. This phenomenon, particularly affecting the proteins with a long half-life -such as collagen and elastin- which becomes more rigid, participates in the alteration of the cellular responses and leads to arterial stiffening [83–86]. Aging also increases the contents of Milk fat globule-EGF-8 (MFG-E8), a highly glycosylated protein, and its fragment, medin, in the arterial wall. Medin strongly binds to elastic fibers and induces elastolysis and amyloidosis in the arterial wall, affecting vascular elasticity and increasing stiffness and calcification [87].

III) The dysregulation of the balance between elastic fibers homeostasis and degradation [88]. Actually, elastin and the other components of elastic fibers can be degraded by elastase-type proteases belonging to different classes of proteolytic enzymes (matrix metalloproteinases - MMPs-, as well as serine-, cysteine- and aspartyl-proteases) whose syntheses and activations are modulated by many intrinsic and extrinsic factors [77,88]. In particular, the elastase activity is normally counterbalanced by the constitutive presence of inhibitors in the vascular wall, like the tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs), which limit the degradation of elastic fibers [89,90]. However, during aging, the progressive imbalance between proteases and protease inhibitors contributes to increased elastolysis in the arterial wall, inducing a decrease in the elastin/collagen ratio and rigidification [5].

Elastic fibers appear gradually disorganized, thinner and frequently fragmented, which leads to arterial enlargement under the influence of blood pressure as well as parietal thickening because of, at least in part, compensatory collagen production, and decreased elasticity [62,88,91–93].

Furthermore, the degradation of elastin releases elastin peptides, some of them reaching the circulation and being measurable in the serum [63]. Elastin peptides are able to induce multiple biological effects on various cellular targets through their binding to the elastin receptor complex (ERC) [64,94], such as vasodilation when binding to the endothelial ERC [66–68,95]. The number of these receptors does not vary with age [96], but a decoupling of some of their downstream signaling pathways progressively occurs during aging [97]. This phenomenon also contributes to the alteration of the vascular functions, in particular vasomotricity [98] as well as modulation by the extracellular glucose level of calcium homeostasis- and/or NO-related vasodilation and signaling pathways [99]. Nevertheless, during aging, the activation of ERC by elastin peptide continues to trigger the production of elastase and free radicals, enhancing the alteration of the tissues [97,100].

All the above-described age-related changes in the arterial structure, called arteriosclerosis, increase the heart afterload, therefore heart work, and result in left ventricular hypertrophy, possibly fatigue and ultimately failure, in parallel to chronic ischemia of the peripheral tissues, causing a progressive deterioration of the organic functions [80,81,101]. These features of normal cardiovascular aging are rather universal, although a change in the initial availability of the elastic fiber component could modify some main consequences of physiological aging or lead to alternative aging. For instance, mice presenting an heterozygous deletion in the fibrillin-1 gene (Fib-1 $+/\text{mg}\Delta$) undergo premature aortic aging, including decreased elastin/collagen ratio and increased stiffness [102]. Also, surprisingly, heterozygous mice genetically deficient for elastin (Eln $+/-$) exhibit some signs of premature aging in adults, such as early increased aortic stiffness, together with the absence -in aged animals- of some other main features of aging, such as aorta wall thickening [103].

Besides normal aging, some deleterious arterial changes appear more frequently with age in some individuals of a given species only, under the influence of environmental factors or genetic predisposition. Two of these age-related diseases will be presented below.

ALTERATION OF ELASTIC FIBER STRUCTURE AND FUNCTION DURING PATHOLOGICAL AGING OF ARTERIES: THE EXAMPLES OF ATHEROSCLEROSIS AND ANEURYSMS AS MAJOR AGE-RELATED DISEASES.

Aging is considered as an evident risk factor of cardiovascular diseases due to the physiological alteration of the arterial structure. However, some people are more susceptible to the occurrence of additional arterial or venous diseases in an early "chronological" age [104]. The existence of such a pathological vascular aging suggests that there is a dissociation between biological and chronological age of vessels. In some patients, an "early vascular aging" (EVA) could take place because of genetic defects or exposure, at an early age, to environmental events triggering oxidative stress and inflammation [105,106]. Multiple blood vessel pathologies which present a serious public health problem are related to elastic fiber degradation and have a prevalence / incidence which is clearly increasing with age, such as varicose veins [107], aneurysms [108–110], and atherosclerosis [111], the latter being a major cause of coronary disease and stroke [112]. These two atherosclerosis-related cardiovascular diseases, involving substantial elastic fiber degradation, are the first and third causes of death worldwide, respectively. They nearly cause 250 deaths/100,000 persons/year, which is about 85% of cardiovascular and 28% of total mortality [111]. Aneurysms are caused by elastic fiber degradation and are a major threat to life, i.e. the 18th cause of death in the general population (15th cause of death in people older than 65) in the USA, with about 3 fatal ruptured aneurysms per 100,000 persons per year [110] Because of their important morbidities, increased occurrence and aggravation during aging, severe impact on public health and close relation

to arterial elastic fiber degradation, atherosclerosis and aneurysms will be further described in the following sections.

Atherosclerosis

Atherosclerosis is characterized by the formation, in large and medium-sized arteries, of plaques composed of lipids, calcified regions, immune and foam cells, together with vascular smooth muscle and endothelial cells. Plaque formation starts with circulating LDL-cholesterol diffusion and accumulation in the arterial wall, due to endothelial dysfunction. These lipids are oxidized and subsequently stimulate vascular inflammation and monocyte recruitment in the vascular wall. The monocytes then load the oxidized lipids to form foam cells. Further, accumulation of necrotic debris and ECM components, together with VSMC migration and formation of a fibrous cap, cause the plaque progression. Ultimately, under the influence of the forces applied by the blood flow, plaques can rupture, resulting in thrombus formation and clinical manifestations such as tissue hypoxia and acute ischemic events (e.g. myocardial infarction and stroke) [113]. Conversely, intermittent hypoxia, the major consequence of obstructive sleep apnea, induces oxidative stress elevation, sympathetic activation and inflammation, which favor endothelial dysfunction, elastic fiber disorganization, hypertension and atherosclerosis [114,115]. Structural and physiological changes related to aging of the arterial wall also predispose to or favor atherosclerosis. Some of these major modifications are inflammation, oxidative stress, endothelial dysfunction, formation of collagen bridges, disorganization of elastic fibers and decrease in the elastin/collagen ratio [106,116–118].

The most described event involving the elastic fibers in atherosclerosis is the alteration of the elastin/collagen ratio, due to elastic fiber degradation under the atheroma plaque by elevated elastase-type protease levels [119]. Also, age related-interlamellar collagen accumulation and -elastin association with insoluble fibrillar material promote arterial stiffening [92], the intimal rigidification inducing a disruption of endothelial barrier integrity and increasing endothelial permeability. This

enhances the transmigration of inflammatory molecules, monocytes and lipids, promoting the development of atherosclerotic lesions [120]. Besides, collagen I, a prominent participant to the aging processes, seems to be involved in endothelial dysfunction, by decreasing NO synthesis [121], as well as in leukocytes recruitment, by increasing SMC expression of vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1 [122]. Furthermore, elastin peptides released during age-related elastolysis by overactive elastases could initiate atherogenesis process through several mechanisms. They modulate intracellular calcium level and NO liberation in endothelial cells, promote LDL oxidation, monocyte and leucocyte recruitment through a chemoattractive effect, and modulate the differentiation of lymphocytes present in the plaques [94,123,124]. In parallel, tropoelastin is re-expressed and accumulates in atheroma plaques, and has recently been suggested to be a biomarker for atherosclerotic plaque progression and instability [125]. Finally, in the context of the atherosclerotic plaque, the combined stimulations of VSMCs by disturbed hemodynamic forces applied to the wall, oxidized LDLs and proinflammatory molecules such as IL-1 β and TNF- α induce a phenotypic switch of these cells, from quiescent and contractile to a dedifferentiated proliferative, proinflammatory, migratory and synthetic state. VSMCs then produce different ECM proteins as well as tissue inhibitor of MMP (TIMP) and MMPs, including MMP-2 and MMP-9. The inflammatory cells present in the plaque also produces MMPs and other elastases which, together with the MMPs released by VSMCs, contribute to the remodelling of the extracellular matrix, including elastic fiber degradation [126,127]. The age-related activation of MMP-2 and MMP-9, two key enzymes that enhance the destabilization of atheromatous plaques, is a major aggravating factor for atherosclerosis progression [128,129].

Aneurysms

An aneurysm is a permanent and localized dilation of an artery presenting at least a 50% increase in diameter compared to the expected normal diameter of the artery [130]. In the large elastic arteries, abdominal aorta aneurysm (AAA) is much more common than thoracic aorta aneurysm (TAA), the

prevalence of AAA being 0-5% in females, and between 1-12% in males [109]. The associated mortality is high due to aneurysm rupture and subsequent hemorrhage [131], the mortality rate of ruptured AAA being five times higher than that of ruptured TAA [110]. TAAs are often caused by rare gene mutations (see below) with an occurrence early in life (30% of all cases), sporadic with an occurrence increased with aging, or associated with bicuspid aortic valves. The etiology of AAAs, occurring mostly in later life, is related to both environmental factors (smoking habit, older age, male gender, coronary heart disease, hyperlipidemia, hypertension and chronic obstructive pulmonary disease (COPD)) and familial genetic factors different from the rare gene mutations cited for TAAs [132,133].

An aneurysm is not a simple passive dilation, it is rather resulting from an active multifactorial process whose development is triggered by a dynamic wall remodeling. This involves inflammation, oxidative stress, VSMC apoptosis or switch from the differentiated contractile state to an undifferentiated synthetic state. In TAAs, the TGF- β stimulation of VSMCs enhances the synthesis of fibrillar ECM, antiproteases, proteases (such as MMP-9) as well as clearance of protease/antiprotease complexes. In AAAs, switched VSMCs also secrete MMPs (such as MMP-2 and -9) whose proteolytic activities are combined with those from MMPs and other elastolytic proteases secreted by immune cells (leukocyte elastase) or exfiltrated from the circulation (plasmin, MMP-8, MMP-9) [132–135]. The changes in VSMC synthesis of ECM and the proteases present in the aneurysmal wall induce major extracellular matrix modifications, which include elevated collagen deposition and an extensive destruction of elastic fibers [136,137]. MMPs activation, in particular of MMP-2, MMP-9 and MMP-12, induces substantial elastic fiber degradation in aneurysmal aortic tissues [136] and other organs, such as the emphysematous lung [138]. Aneurysmal regions of the artery present a wall stiffening which results from early ECM disorganization, including elastin and elastic fiber damage, enhanced collagen deposition and disruption of elastin-contractile units. However, the wall elastic modulus (i.e. stiffness) in arterial aneurysms decreases with age [139]. These structural modifications

of the arterial wall seem to precede the aneurysmal dilation [137,140,141] and are enhanced by aging, which explains the significant influence of age on aneurysm risk [139,142,143], in addition to genetic predisposition [141]. In particular, genetic deficiencies in some microfibril components have been linked to altered elastic fibers and aneurysmal syndromes, especially TAA in the ascending aorta. For instance, patients with Marfan syndrome -caused by mutations in fibrillin-1 [7,74]- and mice genetically altered for the fibrillin-1 gene develop ascending aorta aneurysms, which even worsen during aging [74,102,144]. Similar aneurysms have also been found in syndromes involving mutations in other microfibril components, such as fibulin-4 or LTBP-4 (cutis laxa), or elastic fiber assembly-related molecules such as LOX, while the corresponding murine models feature similar arterial aneurysms [145–148]. Thoracic aneurysmal pathologies has also been linked to abnormalities in TGF- β signalling, including mutations in the TGF- β 2 (TGFB2), TGF- β 3 (TGFB3), TGF- β receptor 1 (TGFR1) and TGF- β receptor 2 (TGFB2) (Loeys-Dietz syndrome) [147]. Because microfibrils are a TGF- β reservoir, the occurrence of aneurysms in humans or mice presenting mutations in microfibrillar components, therefore microfibrillar abnormalities, may be due to a dysregulation of TGF- β signalling. However, a recent work has shown that mice genetically deficient for fibrillin-1 (*Fbn1*^{C1039G/+}) present thoracic aorta aneurysms that are unrelated to TGF- β signaling, which indicates that the onset of thoracic aorta aneurysms might have more complex origins [149].

PHARMACOLOGICAL REINITIATION OF ELASTIN OR ELASTIC FIBER SYNTHESIS IN AGED PATIENTS OR ANIMALS

The challenge of restoring or increasing the elastic fiber content in aged patients or animals (or in pathological conditions) is of particular importance and consists in stimulating the production of the elastic fiber components at a time when the synthesis of several of them is very low.

Tropoelastin, the soluble precursor of elastin, and other elastic fiber components are synthesized in the skin by dermal fibroblasts and in vessels by medial VSMCs. The synthesis of tropoelastin is

regulated by numerous chemokines and growth factors [150] and also by potassium (K^+) and calcium (Ca^{2+}) ions. Indeed, K^+ excess in the extracellular medium induces the depolarization of the plasma membrane, which causes the opening of voltage-dependent calcium channels (CaV) and leads to an increase in $[Ca^{2+}]_i$ and a decrease in elastin synthesis [151,152]. Such a decrease in elastin synthesis was also shown in VSMCs incubated with the calcium ionophore A23187, which trigger Ca^{2+} influx and $[Ca^{2+}]_i$ elevation [152,153]. On the contrary, K^+ efflux from cells leads to an increase in elastin synthesis due to membrane hyperpolarization and CaV closing. This has been shown in experiments using the ATP-dependent K^+ (K_{ATP}) channel opener, minoxidil, a potent arterial vasodilator which has long been used to treat hypertension. Minoxidil-induced K^+ efflux leads to enhancement of elastin synthesis in cultured VSMCs and skin fibroblasts [151,154]. *In vivo* studies have also demonstrated that the elastin content and/or thickness of elastic lamellae are increased by minoxidil treatment in several animal models: Spontaneously Hypertensive Rats (SHR) [155], Brown Norway (BN) rats [156], old C57Bl/6J mice [157] and *Eln*^{+/-} mice [158]. Chronic treatment of mice with minoxidil also results in improvements of the arterial mechanics and cerebral perfusion and, at least in aged animals, in neosynthesis of elastic fibers and protection of pre-existing elastic fibers [157–159]. Other K_{ATP} channel openers, like diazoxide or nicorandil, exert an effect on *in vivo* elastin synthesis similar to those induced by minoxidil [156,160], while pinacidil and some cromakalim or diazoxide derivatives have also been shown to induce elastin production by cultured VSMCs in rats [156,161,162]. However, treatment of animals with other antihypertensive drugs, either angiotensin-II type 1 receptor blocker, beta blocker or calcium channel blocker, does not modify the elastin content in arteries [163].

Numerous cytokines which inhibit tropoelastin transcription act through the activation of the Ras/MEK/ERK signalling pathway [150]. The increase in $[Ca^{2+}]_i$ in VSMCs also stimulates ERK1/2 phosphorylation. The inhibition of this signalling pathway could thus be a strategy to increase the elastin content in arteries. Actually, by performing *in vitro* and *in vivo* experiments in rats, it has been

demonstrated that inhibition of the ERK1/2 phosphorylation leads to increases in elastin synthesis by VSMCs and elastin content in the aorta [153]. The importance of this pathway in elastin metabolism has been confirmed by the demonstration that cortistatin reduces elastin degradation, MMP-2 and -9 expressions and aneurysm progression through the inhibition of the ERK1/2 signaling pathways [164]. Of importance, it has also previously been shown that ERK1/2 signaling is involved in elastin peptide signaling through the elastin receptor complex (ERC) [94].

The general impact of the pharmacological treatments modulating the K_{ATP} channels- Ca^{2+} channels-ERK1/2 pathways described above is illustrated in Figure 1.

MEK inhibitors have also been used in order to stimulate elastin synthesis by cells isolated from patients with Costello syndrome, a developmental disorder characterized by hyper-activation of the mitogenic Ras-Raf-MEK/ERK pathway and inhibition of elastogenesis. The treatment of dermal fibroblasts derived from these patients with the MEK inhibitor PD98059 leads to the concomitant inhibition of cell proliferation and recovery of elastin production [165].

Completely different therapeutic strategies have also been tested to stimulate elastin synthesis using *in vitro* or *in vivo* models. Cenizo and colleagues have used a dill extract to induce LOXL gene expression in dermal fibroblasts, resulting in elastin content increase in dermal and skin equivalents as well as skin elasticity elevation *in vivo* in humans [166,167].

In addition, based on a previous work which has shown that microRNA (miR)-29 mimics downregulate the expression of elastin (ELN) as well as parts of collagen type I (COL1A1) and collagen type III (COL3A1) genes, the team of William C. Sessa has demonstrated that inhibition of miR-29a can increase ELN expression in human cells (skin fibroblasts, VSMCs, bioengineered vessels) and in cells from patients with ELN haploinsufficiencies (supravalvular aortic stenosis or Williams-Beuren syndrome). Using the same *in vitro* models, it was also demonstrated that engineered zinc-finger protein transcription factors that target the ELN gene can also be used to

stimulate the expression of elastin [168,169]. However, these potential therapeutic molecules have not been tested *in vivo* yet and need additional investigations for validation of their therapeutic potential.

CONCLUSION

Elastic fibers represent a major innovation in the course of the evolution of species. Their mechanical properties of resilience and elasticity under relatively high strain-stress, together with the protective action of collagen fibers, have permitted the emergence of large arteries adapted for the efficient but demanding close circulation of vertebrates. During development, the progressive expression and assembly of the elastic fiber components adapt the structure-function of the arteries to the changing mechanical requirements imposed by the constitution of the complex cardiovascular system. The stopping of the production of the main constituent of elastic fibers, elastin, during childhood, therefore preventing further assembly of elastic fibers, results in the presence of a limited and non-reconstitutable stock of elastic fibers at the end of growth. During adulthood, the activity of proteolytic enzymes progressively degrades the existing elastic fibers and the arterial function, progressively leading to the deleterious elevated blood pressure, increased pulse pressure and altered hemodynamics observed during aging (Figure 2). The impossibility to physiologically replace the degraded elastic fibers, i.e. repair the arterial wall and re-establish a normal function of elastic arteries, questions the reasons for the limitation in time of the elastic fiber production. Is it a simple illustration of the disposable soma theory of aging, postulating that our bodies are important only until transmission of the genes to the next generation, then become unimportant? The answer is possibly more complex and could rely on the fact that elastic fibers are assembled during development and, later on, are extended by the growth of the organs, which could be necessary for reaching their mature mechanical properties [31]. A production of arterial elastic fibers after the end of growth could result in permanently unextended fibers which would not present normal elastic properties, then would not

be completely efficient for endowing the large arteries with the needed mechanical properties. This hypothesis is supported by the fact that pharmacological reinduction of the expression of elastin and enzymes required for elastic fiber assembly, in the aorta of aged animals, results in the neosynthesis of elastic fibers that are not all normally arranged and oriented (figure 2). This has contrasted functional consequences: the important return of the aorta stress-strain relation closer to that of young adults, although with no significant impact on aorta distensibility and, surprisingly, a slight increase in aorta stiffness [157]. The search for new conditions allowing for elastic fiber arrangement and function optimization after elastin synthesis reinduction could be a future challenge in order to substantially improve the elasticity of large arteries in aged animals.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. Ladislav Robert for his advices and decisive findings that he made in the field. Thanks also to the Association Autour des Williams (France), the Region Rhône-Alpes (France), the European Commission (grants TELASTAR, 5th PCRD, No. QLK6-CT-2001-00332 and ELAST-AGE, 6th PCRD, No. LSHM-CT-2005-018960) and the Agence Nationale de la Recherche (ANR, France, grant Arterylastic: ANR-18-CE18-0001) for fundings.

REFERENCES

- [1] T.A. Cook, N.A. Salmo, P.O. Yates, The elasticity of the internal lamina, *J. Pathol.* 117 (1975) 253–258. doi:10.1002/path.1711170408.
- [2] M.R. Roach, A.C. Burton, The reason for the shape of the distensibility curves of arteries, *Can. J. Biochem. Physiol.* 35 (1957) 681–690.
- [3] H. Wolinsky, S. Glagov, STRUCTURAL BASIS FOR THE STATIC MECHANICAL PROPERTIES OF THE AORTIC MEDIA, *Circ. Res.* 14 (1964) 400–413.
- [4] W.D. Tucker, K. Mahajan, *Anatomy, Blood Vessels*, in: StatPearls, StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2019. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470401/> (accessed April 25, 2019).

- [5] M.P. Jacob, Extracellular matrix remodeling and matrix metalloproteinases in the vascular wall during aging and in pathological conditions, *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* 57 (2003) 195–202.
- [6] C.M. Kelleher, S.E. McLean, R.P. Mecham, Vascular extracellular matrix and aortic development, *Curr. Top. Dev. Biol.* 62 (2004) 153–188. doi:10.1016/S0070-2153(04)62006-0.
- [7] A.K. Baldwin, A. Simpson, R. Steer, S.A. Cain, C.M. Kielty, Elastic fibres in health and disease, *Expert Rev. Mol. Med.* 15 (2013) e8. doi:10.1017/erm.2013.9.
- [8] L. Debelle, A.M. Tamburro, Elastin: molecular description and function, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31 (1999) 261–272.
- [9] M.A. Lillie, G.J. David, J.M. Gosline, Mechanical role of elastin-associated microfibrils in pig aortic elastic tissue, *Connect. Tissue Res.* 37 (1998) 121–141.
- [10] H. Yanagisawa, J. Wagenseil, Elastic fibers and biomechanics of the aorta: Insights from mouse studies, *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* (2019). doi:10.1016/j.matbio.2019.03.001.
- [11] G. Faury, Function-structure relationship of elastic arteries in evolution: from microfibrils to elastin and elastic fibres, *Pathol. Biol. (Paris)*. 49 (2001) 310–325.
- [12] J.E. Wagenseil, R.P. Mecham, Vascular extracellular matrix and arterial mechanics, *Physiol. Rev.* 89 (2009) 957–989. doi:10.1152/physrev.00041.2008.
- [13] S. Laurent, J. Cockcroft, L. Van Bortel, P. Boutouyrie, C. Giannattasio, D. Hayoz, B. Pannier, C. Vlachopoulos, I. Wilkinson, H. Struijker-Boudier, European Network for Non-invasive Investigation of Large Arteries, Expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues and clinical applications, *Eur. Heart J.* 27 (2006) 2588–2605. doi:10.1093/eurheartj/ehl254.
- [14] H. Wolinsky, S. Glagov, A lamellar unit of aortic medial structure and function in mammals, *Circ. Res.* 20 (1967) 99–111.
- [15] D.M. Basalyga, D.T. Simionescu, W. Xiong, B.T. Baxter, B.C. Starcher, N.R. Vyavahare, Elastin degradation and calcification in an abdominal aorta injury model: role of matrix metalloproteinases, *Circulation.* 110 (2004) 3480–3487. doi:10.1161/01.CIR.0000148367.08413.E9.
- [16] S.E. Greenwald, Ageing of the conduit arteries, *J. Pathol.* 211 (2007) 157–172. doi:10.1002/path.2101.
- [17] S. Hodis, M. Zamir, Mechanical events within the arterial wall: The dynamic context for elastin fatigue, *J. Biomech.* 42 (2009) 1010–1016. doi:10.1016/j.jbiomech.2009.02.010.
- [18] L. de R. Mikael, A.M.G. de Paiva, M.M. Gomes, A.L.L. Sousa, P.C.B.V. Jardim, P.V. de O. Vitorino, M.B. Euzébio, W. de M. Sousa, W.K.S. Barroso, Vascular Aging and Arterial Stiffness, *Arq. Bras. Cardiol.* 109 (2017) 253–258. doi:10.5935/abc.20170091.
- [19] M. Janić, M. Lunder, M. Sabovič, Arterial stiffness and cardiovascular therapy, *BioMed Res. Int.* 2014 (2014) 621437. doi:10.1155/2014/621437.
- [20] M. Cecelja, P. Chowienczyk, Role of arterial stiffness in cardiovascular disease, *JRSM Cardiovasc. Dis.* 1 (2012). doi:10.1258/cvd.2012.012016.
- [21] H. Astrand, J. Stalhand, J. Karlsson, M. Karlsson, B. Sonesson, T. Länne, In vivo estimation of the contribution of elastin and collagen to the mechanical properties in the human abdominal aorta: effect of age and sex, *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985. 110 (2011) 176–187. doi:10.1152/jappphysiol.00579.2010.
- [22] S. Bonapace, A. Rossi, M. Cicoira, G. Targher, F. Valbusa, A. Benetos, C. Vassanelli, Increased aortic pulse wave velocity as measured by echocardiography is strongly associated with poor prognosis in patients with heart failure, *J. Am. Soc. Echocardiogr. Off. Publ. Am. Soc. Echocardiogr.* 26 (2013) 714–720. doi:10.1016/j.echo.2013.03.022.
- [23] M. Husmann, V. Jacomella, C. Thalhammer, B.R. Amann-Vesti, Markers of arterial

- stiffness in peripheral arterial disease, *VASA Z. Gefasskrankheiten*. 44 (2015) 341–348. doi:10.1024/0301-1526/a000452.
- [24] M. Kozakova, C. Morizzo, D. Guarino, G. Federico, M. Miccoli, C. Giannattasio, C. Palombo, The impact of age and risk factors on carotid and carotid-femoral pulse wave velocity, *J. Hypertens*. 33 (2015) 1446–1451. doi:10.1097/HJH.0000000000000582.
- [25] S. Novella, A.P. Dantas, G. Segarra, P. Medina, C. Hermenegildo, Vascular Aging in Women: is Estrogen the Fountain of Youth?, *Front. Physiol*. 3 (2012) 165. doi:10.3389/fphys.2012.00165.
- [26] B. Jani, C. Rajkumar, Ageing and vascular ageing, *Postgrad. Med. J.* 82 (2006) 357–362. doi:10.1136/pgmj.2005.036053.
- [27] A.A. Ahimastos, M. Formosa, A.M. Dart, B.A. Kingwell, Gender differences in large artery stiffness pre- and post puberty, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88 (2003) 5375–5380. doi:10.1210/jc.2003-030722.
- [28] H.-Y. Lee, B.-H. Oh, Aging and arterial stiffness, *Circ. J. Off. J. Jpn. Circ. Soc.* 74 (2010) 2257–2262.
- [29] R.B. Hickler, Aortic and large artery stiffness: current methodology and clinical correlations, *Clin. Cardiol.* 13 (1990) 317–322.
- [30] T.K. Waddell, A.M. Dart, C.D. Gatzka, J.D. Cameron, B.A. Kingwell, Women exhibit a greater age-related increase in proximal aortic stiffness than men, *J. Hypertens*. 19 (2001) 2205–2212.
- [31] J.D. Humphrey, E.R. Dufresne, M.A. Schwartz, Mechanotransduction and extracellular matrix homeostasis, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15 (2014) 802–812. doi:10.1038/nrm3896.
- [32] H. van Meurs-van Woezik, H.W. Klein, L. Markus-Silvis, P. Krediet, Comparison of the growth of the tunica media of the ascending aorta, aortic isthmus and descending aorta in infants and children, *J. Anat.* 136 (1983) 273–281.
- [33] S. Basu, B.N. Datta, N. Khandelwal, Morphologic changes in pulmonary vasculature with arteriographic correlation, *Angiology*. 47 (1996) 375–380. doi:10.1177/000331979604700408.
- [34] A.J. Lilly, A. Mazan, D.A. Scott, G. Lacaud, V. Kouskoff, SOX7 expression is critically required in FLK1-expressing cells for vasculogenesis and angiogenesis during mouse embryonic development, *Mech. Dev.* 146 (2017) 31–41. doi:10.1016/j.mod.2017.05.004.
- [35] Y. Oike, Y. Ito, K. Hamada, X.-Q. Zhang, K. Miyata, F. Arai, T. Inada, K. Araki, N. Nakagata, M. Takeya, Y.Y. Kisanuki, M. Yanagisawa, N.W. Gale, T. Suda, Regulation of vasculogenesis and angiogenesis by EphB/ephrin-B2 signaling between endothelial cells and surrounding mesenchymal cells, *Blood*. 100 (2002) 1326–1333.
- [36] C.S. Craft, T.J. Broekelmann, R.P. Mecham, Microfibril-associated glycoproteins MAGP-1 and MAGP-2 in disease, *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* 71–72 (2018) 100–111. doi:10.1016/j.matbio.2018.03.006.
- [37] M. Sauvage, N. Hinglais, C. Mandet, C. Badier, F. Deslandes, J.B. Michel, M.P. Jacob, Localization of elastin mRNA and TGF-beta1 in rat aorta and caudal artery as a function of age, *Cell Tissue Res*. 291 (1998) 305–314.
- [38] J.E. Wagenseil, R.P. Mecham, New insights into elastic fiber assembly, *Birth Defects Res. Part C Embryo Today Rev.* 81 (2007) 229–240. doi:10.1002/bdrc.20111.
- [39] H. Nakamura, Electron microscopic study of the prenatal development of the thoracic aorta in the rat, *Am. J. Anat.* 181 (1988) 406–418. doi:10.1002/aja.1001810409.
- [40] Y. Fukuda, V.J. Ferrans, R.G. Crystal, Development of elastic fibers of nuchal ligament, aorta, and lung of fetal and postnatal sheep: an ultrastructural and electron microscopic immunohistochemical study, *Am. J. Anat.* 170 (1984) 597–629. doi:10.1002/aja.1001700407.
- [41] R.P. Mecham, Elastin in lung development and disease pathogenesis, *Matrix Biol. J. Int.*

- Soc. Matrix Biol. 73 (2018) 6–20. doi:10.1016/j.matbio.2018.01.005.
- [42] D.Y. Li, B. Brooke, E.C. Davis, R.P. Mecham, L.K. Sorensen, B.B. Boak, E. Eichwald, M.T. Keating, Elastin is an essential determinant of arterial morphogenesis, *Nature*. 393 (1998) 276–280. doi:10.1038/30522.
- [43] S.K. Karnik, B.S. Brooke, A. Bayes-Genis, L. Sorensen, J.D. Wythe, R.S. Schwartz, M.T. Keating, D.Y. Li, A critical role for elastin signaling in vascular morphogenesis and disease, *Dev. Camb. Engl.* 130 (2003) 411–423.
- [44] S.K. Karnik, J.D. Wythe, L. Sorensen, B.S. Brooke, L.D. Urness, D.Y. Li, Elastin induces myofibrillogenesis via a specific domain, VGVAPG, *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* 22 (2003) 409–425.
- [45] M. Gabriela Espinosa, M. Catalin Staiculescu, J. Kim, E. Marin, J.E. Wagenseil, Elastic Fibers and Large Artery Mechanics in Animal Models of Development and Disease, *J. Biomech. Eng.* 140 (2018). doi:10.1115/1.4038704.
- [46] S.M. Wells, B.L. Langille, S.L. Adamson, In vivo and in vitro mechanical properties of the sheep thoracic aorta in the perinatal period and adulthood, *Am. J. Physiol.* 274 (1998) H1749-1760. doi:10.1152/ajpheart.1998.274.5.H1749.
- [47] S.M. Wells, B.L. Langille, J.M. Lee, S.L. Adamson, Determinants of mechanical properties in the developing ovine thoracic aorta, *Am. J. Physiol.* 277 (1999) H1385-1391. doi:10.1152/ajpheart.1999.277.4.H1385.
- [48] C.L. Berry, T. Looker, J. Germain, Nucleic acid and scleroprotein content of the developing human aorta, *J. Pathol.* 108 (1972) 265–274. doi:10.1002/path.1711080402.
- [49] S.E. Greenwald, C.L. Berry, S.G. Haworth, Changes in the distensibility of the intrapulmonary arteries in the normal newborn and growing pig, *Cardiovasc. Res.* 16 (1982) 716–725.
- [50] P.M. Vanhoutte, H. Shimokawa, M. Feletou, E.H.C. Tang, Endothelial dysfunction and vascular disease - a 30th anniversary update, *Acta Physiol. Oxf. Engl.* 219 (2017) 22–96. doi:10.1111/apha.12646.
- [51] H. Sugitani, H. Wachi, S. Tajima, Y. Seyama, Nitric oxide stimulates elastin expression in chick aortic smooth muscle cells, *Biol. Pharm. Bull.* 24 (2001) 461–464.
- [52] H.Y. Qiu, B. Valtier, H.A. Struyker-Boudier, B.I. Levy, Mechanical and contractile properties of in situ localized mesenteric arteries in normotensive and spontaneously hypertensive rats, *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 33 (1995) 159–170.
- [53] F.L. Wuyts, V.J. Vanhuyse, G.J. Langewouters, W.F. Decraemer, E.R. Raman, S. Buyle, Elastic properties of human aortas in relation to age and atherosclerosis: a structural model, *Phys. Med. Biol.* 40 (1995) 1577–1597.
- [54] P.B. Dobrin, A.A. Rovick, Influence of vascular smooth muscle on contractile mechanics and elasticity of arteries, *Am. J. Physiol.* 217 (1969) 1644–1651. doi:10.1152/ajplegacy.1969.217.6.1644.
- [55] G. Faury, G.M. Maher, D.Y. Li, M.T. Keating, R.P. Mecham, W.A. Boyle, Relation between outer and luminal diameter in cannulated arteries, *Am. J. Physiol.* 277 (1999) H1745-1753. doi:10.1152/ajpheart.1999.277.5.H1745.
- [56] J.M. Davidson, O. Zoia, J.M. Liu, Modulation of transforming growth factor-beta 1 stimulated elastin and collagen production and proliferation in porcine vascular smooth muscle cells and skin fibroblasts by basic fibroblast growth factor, transforming growth factor-alpha, and insulin-like growth factor-I, *J. Cell. Physiol.* 155 (1993) 149–156. doi:10.1002/jcp.1041550119.
- [57] T.E. Clark, M.A. Lillie, A.W. Vogl, J.M. Gosline, R.E. Shadwick, Mechanical contribution of lamellar and interlamellar elastin along the mouse aorta, *J. Biomech.* 48 (2015) 3599–3605. doi:10.1016/j.jbiomech.2015.08.004.
- [58] B.B. Aaron, J.M. Gosline, Elastin as a random-network elastomer: A mechanical and

- optical analysis of single elastin fibers, *Biopolymers*. 20 (1981) 1247–1260. doi:10.1002/bip.1981.360200611.
- [59] M.-J. Chow, R. Turcotte, C.P. Lin, Y. Zhang, Arterial extracellular matrix: a mechanobiological study of the contributions and interactions of elastin and collagen, *Biophys. J.* 106 (2014) 2684–2692. doi:10.1016/j.bpj.2014.05.014.
- [60] J. Rosenbloom, W.R. Abrams, R. Mecham, Extracellular matrix 4: the elastic fiber, *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 7 (1993) 1208–1218.
- [61] M.A. Awal, M. Matsumoto, H. Nishinakagawa, Morphometrical changes of the arterial walls of main arteries from heart to the abdomino-inguinal mammary glands of rat from virgin through pregnancy, lactation and post-weaning, *J. Vet. Med. Sci.* 57 (1995) 251–256.
- [62] O. Fritze, B. Romero, M. Schleicher, M.P. Jacob, D.-Y. Oh, B. Starcher, K. Schenke-Layland, J. Bujan, U.A. Stock, Age-related changes in the elastic tissue of the human aorta, *J. Vasc. Res.* 49 (2012) 77–86. doi:10.1159/000331278.
- [63] T. Fülöp, S.M. Wei, L. Robert, M.P. Jacob, Determination of elastin peptides in normal and arteriosclerotic human sera by ELISA, *Clin. Physiol. Biochem.* 8 (1990) 273–282.
- [64] G. Faury, Role of the elastin-laminin receptor in the cardiovascular system, *Pathol. Biol. (Paris)*. 46 (1998) 517–526.
- [65] G. Faury, Y. Usson, M. Robert-Nicoud, L. Robert, J. Verdeti, Nuclear and cytoplasmic free calcium level changes induced by elastin peptides in human endothelial cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (1998) 2967–2972.
- [66] A. Ostuni, M.D. Lograno, A.R. Gasbarro, F. Bisaccia, A.M. Tamburro, Novel properties of peptides derived from the sequence coded by exon 26A of human elastin, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34 (2002) 130–135.
- [67] M.D. Lograno, F. Bisaccia, A. Ostuni, E. Daniele, A.M. Tamburro, Identification of elastin peptides with vasorelaxant activity on rat thoracic aorta, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 30 (1998) 497–503.
- [68] G. Faury, M.T. Ristori, J. Verdeti, M.P. Jacob, L. Robert, Effect of elastin peptides on vascular tone, *J. Vasc. Res.* 32 (1995) 112–119. doi:10.1159/000159084.
- [69] M.E. Curran, D.L. Atkinson, A.K. Ewart, C.A. Morris, M.F. Leppert, M.T. Keating, The elastin gene is disrupted by a translocation associated with supraaortic stenosis, *Cell*. 73 (1993) 159–168.
- [70] A.K. Ewart, C.A. Morris, D. Atkinson, W. Jin, K. Sternes, P. Spallone, A.D. Stock, M. Leppert, M.T. Keating, Hemizygoty at the elastin locus in a developmental disorder, Williams syndrome, *Nat. Genet.* 5 (1993) 11–16. doi:10.1038/ng0993-11.
- [71] G. Faury, M. Pezet, R.H. Knutsen, W.A. Boyle, S.P. Heximer, S.E. McLean, R.K. Minkes, K.J. Blumer, A. Kovacs, D.P. Kelly, D.Y. Li, B. Starcher, R.P. Mecham, Developmental adaptation of the mouse cardiovascular system to elastin haploinsufficiency, *J. Clin. Invest.* 112 (2003) 1419–1428. doi:10.1172/JCI19028.
- [72] M.L. Duque Lasio, B.A. Kozel, Elastin-driven genetic diseases, *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* 71–72 (2018) 144–160. doi:10.1016/j.matbio.2018.02.021.
- [73] H.C. Dietz, G.R. Cutting, R.E. Pyeritz, C.L. Maslen, L.Y. Sakai, G.M. Corson, E.G. Puffenberger, A. Hamosh, E.J. Nanthakumar, S.M. Curristin, Marfan syndrome caused by a recurrent de novo missense mutation in the fibrillin gene, *Nature*. 352 (1991) 337–339. doi:10.1038/352337a0.
- [74] F. Ramirez, C. Caescu, E. Wondimu, J. Galatioto, Marfan syndrome; A connective tissue disease at the crossroads of mechanotransduction, TGF β signaling and cell stemness, *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* 71–72 (2018) 82–89. doi:10.1016/j.matbio.2017.07.004.
- [75] G.F. Mitchell, Effects of central arterial aging on the structure and function of the

- peripheral vasculature: implications for end-organ damage, *J. Appl. Physiol.* Bethesda Md 1985. 105 (2008) 1652–1660. doi:10.1152/jappphysiol.90549.2008.
- [76] M.F. O'Rourke, J. Hashimoto, Mechanical factors in arterial aging: a clinical perspective, *J. Am. Coll. Cardiol.* 50 (2007) 1–13. doi:10.1016/j.jacc.2006.12.050.
- [77] M.J. Sherratt, Tissue elasticity and the ageing elastic fibre, *Age.* 31 (2009) 305–325. doi:10.1007/s11357-009-9103-6.
- [78] J. Labat-Robert, M. Bihari-Varga, L. Robert, Extracellular matrix, *FEBS Lett.* 268 (1990) 386–393.
- [79] M.A. Lillie, G.W. Chalmers, J.M. Gosline, The effects of heating on the mechanical properties of arterial elastin, *Connect. Tissue Res.* 31 (1994) 23–35.
- [80] N. Thorin-Trescases, E. Thorin, Lifelong Cyclic Mechanical Strain Promotes Large Elastic Artery Stiffening: Increased Pulse Pressure and Old Age-Related Organ Failure, *Can. J. Cardiol.* 32 (2016) 624–633. doi:10.1016/j.cjca.2015.12.022.
- [81] C. Palombo, M. Kozakova, Arterial stiffness, atherosclerosis and cardiovascular risk: Pathophysiologic mechanisms and emerging clinical indications, *Vascul. Pharmacol.* 77 (2016) 1–7. doi:10.1016/j.vph.2015.11.083.
- [82] M.E. Safar, Arterial aging—hemodynamic changes and therapeutic options, *Nat. Rev. Cardiol.* 7 (2010) 442–449. doi:10.1038/nrcardio.2010.96.
- [83] D.R. Sell, V.M. Monnier, Molecular basis of arterial stiffening: role of glycation - a mini-review, *Gerontology.* 58 (2012) 227–237. doi:10.1159/000334668.
- [84] G.L. Bakris, A.J. Bank, D.A. Kass, J.M. Neutel, R.A. Preston, S. Oparil, Advanced glycation end-product cross-link breakers. A novel approach to cardiovascular pathologies related to the aging process, *Am. J. Hypertens.* 17 (2004) 23S-30S. doi:10.1016/j.amjhyper.2004.08.022.
- [85] M. Kosmopoulos, D. Drekolias, P.D. Zavras, C. Piperi, A.G. Papavassiliou, Impact of advanced glycation end products (AGEs) signaling in coronary artery disease, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* 1865 (2019) 611–619. doi:10.1016/j.bbadis.2019.01.006.
- [86] C. Cantini, P. Kieffer, B. Corman, P. Limiñana, J. Atkinson, I. Lartaud-Idjouadiene, Aminoguanidine and aortic wall mechanics, structure, and composition in aged rats, *Hypertens. Dallas Tex* 1979. 38 (2001) 943–948.
- [87] S. Peng, J. Glennert, P. Westermark, Medin-amyloid: a recently characterized age-associated arterial amyloid form affects mainly arteries in the upper part of the body, *Amyloid Int. J. Exp. Clin. Investig. Off. J. Int. Soc. Amyloidosis.* 12 (2005) 96–102. doi:10.1080/13506120500107006.
- [88] L. Robert, A.M. Robert, T. Fülöp, Rapid increase in human life expectancy: will it soon be limited by the aging of elastin?, *Biogerontology.* 9 (2008) 119–133. doi:10.1007/s10522-007-9122-6.
- [89] S. Chakraborti, M. Mandal, S. Das, A. Mandal, T. Chakraborti, Regulation of matrix metalloproteinases: an overview, *Mol. Cell. Biochem.* 253 (2003) 269–285.
- [90] E. Allaire, B. Muscatelli-Groux, C. Mandet, A.-M. Guinault, P. Bruneval, P. Desgranges, A. Clowes, D. Méllière, J.-P. Becquemin, Paracrine effect of vascular smooth muscle cells in the prevention of aortic aneurysm formation, *J. Vasc. Surg.* 36 (2002) 1018–1026.
- [91] M.A. Cattell, J.C. Anderson, P.S. Hasleton, Age-related changes in amounts and concentrations of collagen and elastin in normotensive human thoracic aorta, *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* 245 (1996) 73–84.
- [92] H. Taghizadeh, M. Tafazzoli-Shadpour, Characterization of mechanical properties of lamellar structure of the aortic wall: Effect of aging, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 65 (2017) 20–28. doi:10.1016/j.jmbbm.2016.08.011.
- [93] A. Schmidt-Trucksäss, D. Grathwohl, A. Schmid, R. Boragk, C. Upmeier, J. Keul, M.

- Huonker, Structural, functional, and hemodynamic changes of the common carotid artery with age in male subjects, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19 (1999) 1091–1097.
- [94] A. Wahart, T. Hocine, C. Albrecht, A. Henry, T. Sarazin, L. Martiny, H. El Btaouri, P. Maurice, A. Bennisroune, B. Romier-Crouzet, S. Blaise, L. Duca, Role of elastin peptides and elastin receptor complex in metabolic and cardiovascular diseases, *FEBS J.* (2019). doi:10.1111/febs.14836.
- [95] G. Faury, S. Garnier, A.S. Weiss, J. Wallach, T. Fülöp, M.P. Jacob, R.P. Mecham, L. Robert, J. Verdetti, Action of tropoelastin and synthetic elastin sequences on vascular tone and on free Ca²⁺ level in human vascular endothelial cells, *Circ. Res.* 82 (1998) 328–336.
- [96] Z. Varga, M.P. Jacob, L. Robert, J. Csongor, T. Fulop, Age-dependent changes of K-elastin stimulated effector functions of human phagocytic cells: relevance for atherogenesis, *Exp. Gerontol.* 32 (1997) 653–662.
- [97] T. Fülöp, N. Douziech, M.P. Jacob, M. Hauck, J. Wallach, L. Robert, Age-related alterations in the signal transduction pathways of the elastin-laminin receptor, *Pathol. Biol. (Paris)*. 49 (2001) 339–348.
- [98] G. Faury, A. Chabaud, M.T. Ristori, L. Robert, J. Verdetti, Effect of age on the vasodilatory action of elastin peptides, *Mech. Ageing Dev.* 95 (1997) 31–42.
- [99] G. Faury, L. Robert, J. Verdetti, The age-dependent vasodilatation and endothelial calcium influx induced by elastin peptides are modulated by extracellular glucose level, *Biomed. Pharmacother.* 57 (2003) 216–222. doi:10.1016/S0753-3322(03)00053-2.
- [100] L. Robert, Aging of the vascular wall and atherogenesis: role of the elastin-laminin receptor, *Atherosclerosis*. 123 (1996) 169–179.
- [101] J. Ferruzzi, M.R. Bersi, R.P. Mecham, F. Ramirez, H. Yanagisawa, G. Tellides, J.D. Humphrey, Loss of Elastic Fiber Integrity Compromises Common Carotid Artery Function: Implications for Vascular Aging, *Artery Res.* 14 (2016) 41–52. doi:10.1016/j.artres.2016.04.001.
- [102] B. Mariko, M. Pezet, B. Escoubet, S. Bouillot, J.-P. Andrieu, B. Starcher, D. Quaglino, M.-P. Jacob, P. Huber, F. Ramirez, G. Faury, Fibrillin-1 genetic deficiency leads to pathological ageing of arteries in mice, *J. Pathol.* 224 (2011) 33–44. doi:10.1002/path.2840.
- [103] M. Pezet, M.-P. Jacob, B. Escoubet, D. Gheduzzi, E. Tillet, P. Perret, P. Huber, D. Quaglino, R. Vranckx, D.Y. Li, B. Starcher, W.A. Boyle, R.P. Mecham, G. Faury, Elastin haploinsufficiency induces alternative aging processes in the aorta, *Rejuvenation Res.* 11 (2008) 97–112. doi:10.1089/rej.2007.0587.
- [104] A. Doyon, D. Kracht, A.K. Bayazit, M. Deveci, A. Duzova, R.T. Krmar, M. Litwin, A. Niemirska, B. Oguz, B.M.W. Schmidt, B. Sözeri, U. Querfeld, A. Melk, F. Schaefer, E. Wühl, 4C Study Consortium, Carotid artery intima-media thickness and distensibility in children and adolescents: reference values and role of body dimensions, *Hypertens. Dallas Tex* 1979. 62 (2013) 550–556. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01297.
- [105] D.H.J. Thijssen, S.E. Carter, D.J. Green, Arterial structure and function in vascular ageing: are you as old as your arteries?, *J. Physiol.* 594 (2016) 2275–2284. doi:10.1113/JP270597.
- [106] P.M. Nilsson, P. Boutouyrie, P. Cunha, V. Kotsis, K. Narkiewicz, G. Parati, E. Rietzschel, A. Scuteri, S. Laurent, Early vascular ageing in translation: from laboratory investigations to clinical applications in cardiovascular prevention, *J. Hypertens.* 31 (2013) 1517–1526. doi:10.1097/HJH.0b013e328361e4bd.
- [107] A.H. Davies, The Seriousness of Chronic Venous Disease: A Review of Real-World Evidence, *Adv. Ther.* 36 (2019) 5–12. doi:10.1007/s12325-019-0881-7.
- [108] J.A. Elefteriades, E.A. Farkas, Thoracic aortic aneurysm clinically pertinent controversies and uncertainties, *J. Am. Coll. Cardiol.* 55 (2010) 841–857.

- doi:10.1016/j.jacc.2009.08.084.
- [109] E. Altobelli, L. Rapacchietta, V.F. Profeta, R. Fagnano, Risk Factors for Abdominal Aortic Aneurysm in Population-Based Studies: A Systematic Review and Meta-Analysis, *Int. J. Environ. Res. Public. Health.* 15 (2018). doi:10.3390/ijerph15122805.
- [110] H. Abdulameer, H. Al Taii, S.G. Al-Kindi, R. Milner, Epidemiology of fatal ruptured aortic aneurysms in the United States (1999-2016), *J. Vasc. Surg.* 69 (2019) 378-384.e2. doi:10.1016/j.jvs.2018.03.435.
- [111] S. Barquera, A. Pedroza-Tobías, C. Medina, L. Hernández-Barrera, K. Bibbins-Domingo, R. Lozano, A.E. Moran, Global Overview of the Epidemiology of Atherosclerotic Cardiovascular Disease, *Arch. Med. Res.* 46 (2015) 328–338. doi:10.1016/j.arcmed.2015.06.006.
- [112] E.G. Lakatta, D. Levy, Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part I: aging arteries: a “set up” for vascular disease, *Circulation.* 107 (2003) 139–146. doi:10.1161/01.cir.0000048892.83521.58.
- [113] G.K. Hansson, Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease, *N. Engl. J. Med.* 352 (2005) 1685–1695. doi:10.1056/NEJMra043430.
- [114] P. Lévy, M. Kohler, W.T. McNicholas, F. Barbé, R.D. McEvoy, V.K. Somers, L. Lavie, J.-L. Pépin, Obstructive sleep apnoea syndrome, *Nat. Rev. Dis. Primer.* 1 (2015) 15015. doi:10.1038/nrdp.2015.15.
- [115] C. Arnaud, P.C. Beguin, S. Lantuejoul, J.-L. Pepin, C. Guillermet, G. Pelli, F. Burger, V. Buatois, C. Ribuot, J.-P. Baguet, F. Mach, P. Levy, M. Dematteis, The inflammatory preatherosclerotic remodeling induced by intermittent hypoxia is attenuated by RANTES/CCL5 inhibition, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 184 (2011) 724–731. doi:10.1164/rccm.201012-2033OC.
- [116] S. Iurciuc, A.M. Cimpan, F. Mitu, R. Heredeia, M. Iurciuc, Vascular aging and subclinical atherosclerosis: why such a “never ending” and challenging story in cardiology?, *Clin. Interv. Aging.* 12 (2017) 1339–1345. doi:10.2147/CIA.S141265.
- [117] M. Wang, R.E. Monticone, K.R. McGraw, Proinflammatory Arterial Stiffness Syndrome: A Signature of Large Arterial Aging, *J. Vasc. Res.* 55 (2018) 210–223. doi:10.1159/000490244.
- [118] L. Rodríguez-Mañas, M. El-Assar, S. Vallejo, P. López-Dóriga, J. Solís, R. Petidier, M. Montes, J. Nevado, M. Castro, C. Gómez-Guerrero, C. Peiró, C.F. Sánchez-Ferrer, Endothelial dysfunction in aged humans is related with oxidative stress and vascular inflammation, *Aging Cell.* 8 (2009) 226–238. doi:10.1111/j.1474-9726.2009.00466.x.
- [119] G.K. Sukhova, G.P. Shi, D.I. Simon, H.A. Chapman, P. Libby, Expression of the elastolytic cathepsins S and K in human atheroma and regulation of their production in smooth muscle cells, *J. Clin. Invest.* 102 (1998) 576–583. doi:10.1172/JCI181.
- [120] J. Huynh, N. Nishimura, K. Rana, J.M. Peloquin, J.P. Califano, C.R. Montague, M.R. King, C.B. Schaffer, C.A. Reinhart-King, Age-related intimal stiffening enhances endothelial permeability and leukocyte transmigration, *Sci. Transl. Med.* 3 (2011) 112ra122. doi:10.1126/scitranslmed.3002761.
- [121] L. González-Santiago, S. López-Ongil, M. Rodríguez-Puyol, D. Rodríguez-Puyol, Decreased nitric oxide synthesis in human endothelial cells cultured on type I collagen, *Circ. Res.* 90 (2002) 539–545. doi:10.1161/01.res.0000012445.68979.9d.
- [122] A.W. Orr, M.Y. Lee, J.A. Lemmon, A. Yurdagul, M.F. Gomez, P.D.S. Bortz, B.R. Wamhoff, Molecular mechanisms of collagen isotype-specific modulation of smooth muscle cell phenotype, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29 (2009) 225–231. doi:10.1161/ATVBAHA.108.178749.
- [123] T. Fulop, A. Larbi, A. Fortun, L. Robert, A. Khalil, Elastin peptides induced oxidation of LDL by phagocytic cells, *Pathol. Biol. (Paris).* 53 (2005) 416–423.

- doi:10.1016/j.patbio.2004.12.023.
- [124] P. Maurice, S. Blaise, S. Gayral, L. Debelle, M. Laffargue, W. Hornebeck, L. Duca, Elastin fragmentation and atherosclerosis progression: the elastokine concept, *Trends Cardiovasc. Med.* 23 (2013) 211–221. doi:10.1016/j.tcm.2012.12.004.
- [125] A. Phinikaridou, S. Lacerda, B. Lavin, M.E. Andia, A. Smith, P. Saha, R.M. Botnar, Tropoelastin: A novel marker for plaque progression and instability, *Circ. Cardiovasc. Imaging.* 11 (2018). doi:10.1161/CIRCIMAGING.117.007303.
- [126] D.A. Chistiakov, A.N. Orekhov, Y.V. Bobryshev, Vascular smooth muscle cell in atherosclerosis, *Acta Physiol. Oxf. Engl.* 214 (2015) 33–50. doi:10.1111/apha.12466.
- [127] A.J. Cocciolone, J.Z. Hawes, M.C. Staiculescu, E.O. Johnson, M. Murshed, J.E. Wagenseil, Elastin, arterial mechanics, and cardiovascular disease, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 315 (2018) H189–H205. doi:10.1152/ajpheart.00087.2018.
- [128] M. Wang, L. Jiang, R.E. Monticone, E.G. Lakatta, Proinflammation: the key to arterial aging, *Trends Endocrinol. Metab. TEM.* 25 (2014) 72–79. doi:10.1016/j.tem.2013.10.002.
- [129] M. Wang, E.G. Lakatta, Altered regulation of matrix metalloproteinase-2 in aortic remodeling during aging, *Hypertens. Dallas Tex* 1979. 39 (2002) 865–873. doi:10.1161/01.hyp.0000014506.13322.66.
- [130] K.W. Johnston, R.B. Rutherford, M.D. Tilson, D.M. Shah, L. Hollier, J.C. Stanley, Suggested standards for reporting on arterial aneurysms. Subcommittee on Reporting Standards for Arterial Aneurysms, Ad Hoc Committee on Reporting Standards, Society for Vascular Surgery and North American Chapter, International Society for Cardiovascular Surgery, *J. Vasc. Surg.* 13 (1991) 452–458.
- [131] E.L. Verhoeven, M.R. Kapma, H. Groen, I.F. Tielliu, C.J. Zeebregts, F. Bekkema, J.J. van den Dungen, Mortality of ruptured abdominal aortic aneurysm treated with open or endovascular repair, *J. Vasc. Surg.* 48 (2008) 1396–1400. doi:10.1016/j.jvs.2008.07.054.
- [132] N. Sakalihasan, J.-B. Michel, A. Katsargyris, H. Kuivaniemi, J.-O. Defraigne, A. Nchimi, J.T. Powell, K. Yoshimura, R. Hultgren, Abdominal aortic aneurysms, *Nat. Rev. Dis. Primer.* 4 (2018) 34. doi:10.1038/s41572-018-0030-7.
- [133] J.-B. Michel, G. Jondeau, D.M. Milewicz, From genetics to response to injury: vascular smooth muscle cells in aneurysms and dissections of the ascending aorta, *Cardiovasc. Res.* 114 (2018) 578–589. doi:10.1093/cvr/cvy006.
- [134] A. Malashicheva, D. Kostina, A. Kostina, O. Irtyuga, I. Voronkina, L. Smagina, E. Ignatieva, N. Gavriiliuk, V. Uspensky, O. Moiseeva, J. Vaage, A. Kostareva, Phenotypic and Functional Changes of Endothelial and Smooth Muscle Cells in Thoracic Aortic Aneurysms, *Int. J. Vasc. Med.* 2016 (2016) 3107879. doi:10.1155/2016/3107879.
- [135] S.W. Rabkin, The Role Matrix Metalloproteinases in the Production of Aortic Aneurysm, *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 147 (2017) 239–265. doi:10.1016/bs.pmbts.2017.02.002.
- [136] G. Ailawadi, J.L. Eliason, G.R. Upchurch, Current concepts in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysm, *J. Vasc. Surg.* 38 (2003) 584–588.
- [137] U. Raaz, A.M. Zöllner, I.N. Schellinger, R. Toh, F. Nakagami, M. Brandt, F.C. Emrich, Y. Kayama, S. Eken, M. Adam, L. Maegdefessel, T. Hertel, A. Deng, A. Jagger, M. Buerke, R.L. Dalman, J.M. Spin, E. Kuhl, P.S. Tsao, Segmental aortic stiffening contributes to experimental abdominal aortic aneurysm development, *Circulation.* 131 (2015) 1783–1795. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.114.012377.
- [138] S.A. Gharib, A.M. Manicone, W.C. Parks, Matrix metalloproteinases in emphysema, *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* 73 (2018) 34–51. doi:10.1016/j.matbio.2018.01.018.
- [139] A. Ferrara, S. Morganti, P. Totaro, A. Mazzola, F. Auricchio, Human dilated ascending aorta: Mechanical characterization via uniaxial tensile tests, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 53 (2016) 257–271. doi:10.1016/j.jmbbm.2015.08.021.

- [140] C.J. Goergen, J. Azuma, K.N. Barr, L. Magdefessel, D.Y. Kallop, A. Gogineni, A. Grewall, R.M. Weimer, A.J. Connolly, R.L. Dalman, C.A. Taylor, P.S. Tsao, J.M. Greve, Influences of aortic motion and curvature on vessel expansion in murine experimental aneurysms, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31 (2011) 270–279. doi:10.1161/ATVBAHA.110.216481.
- [141] A. Karimi, D.M. Milewicz, Structure of the Elastin-Contractile Units in the Thoracic Aorta and How Genes That Cause Thoracic Aortic Aneurysms and Dissections Disrupt This Structure, *Can. J. Cardiol.* 32 (2016) 26–34. doi:10.1016/j.cjca.2015.11.004.
- [142] A. Tsamis, J.T. Krawiec, D.A. Vorp, Elastin and collagen fibre microstructure of the human aorta in ageing and disease: a review, *J. R. Soc. Interface.* 10 (2013) 20121004. doi:10.1098/rsif.2012.1004.
- [143] D.C. Iliopoulos, E.P. Kritharis, A.T. Giagini, S.A. Papadodima, D.P. Sokolis, Ascending thoracic aortic aneurysms are associated with compositional remodeling and vessel stiffening but not weakening in age-matched subjects, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 137 (2009) 101–109. doi:10.1016/j.jtcvs.2008.07.023.
- [144] L. Pereira, K. Andrikopoulos, J. Tian, S.Y. Lee, D.R. Keene, R. Ono, D.P. Reinhardt, L.Y. Sakai, N.J. Biery, T. Bunton, H.C. Dietz, F. Ramirez, Targetting of the gene encoding fibrillin-1 recapitulates the vascular aspect of Marfan syndrome, *Nat. Genet.* 17 (1997) 218–222. doi:10.1038/ng1097-218.
- [145] D. Guo, E.S. Regalado, L. Gong, X. Duan, R.L.P. Santos-Cortez, P. Arnaud, Z. Ren, B. Cai, E.M. Hostetler, R. Moran, D. Liang, A. Estrera, H.J. Safi, University of Washington Center for Mendelian Genomics, S.M. Leal, M.J. Bamshad, J. Shendure, D.A. Nickerson, G. Jondeau, C. Boileau, D.M. Milewicz, LOX Mutations Predispose to Thoracic Aortic Aneurysms and Dissections, *Circ. Res.* 118 (2016) 928–934. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.307130.
- [146] V.S. Lee, C.M. Halabi, E.P. Hoffman, N. Carmichael, I. Leshchiner, C.G. Lian, A.J. Bierhals, D. Vuzman, Brigham Genomic Medicine, R.P. Mecham, N.Y. Frank, N.O. Stitzel, Loss of function mutation in LOX causes thoracic aortic aneurysm and dissection in humans, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113 (2016) 8759–8764. doi:10.1073/pnas.1601442113.
- [147] M.-J. Goumans, P. Ten Dijke, TGF- β Signaling in Control of Cardiovascular Function, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 10 (2018). doi:10.1101/cshperspect.a022210.
- [148] C.L. Papke, H. Yanagisawa, Fibulin-4 and fibulin-5 in elastogenesis and beyond: Insights from mouse and human studies, *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* 37 (2014) 142–149. doi:10.1016/j.matbio.2014.02.004.
- [149] H. Wei, J.H. Hu, S.N. Angelov, K. Fox, J. Yan, R. Enstrom, A. Smith, D.A. Dichek, Aortopathy in a Mouse Model of Marfan Syndrome Is Not Mediated by Altered Transforming Growth Factor β Signaling, *J. Am. Heart Assoc.* 6 (2017). doi:10.1161/JAHA.116.004968.
- [150] E.P. Sproul, W.S. Argraves, A cytokine axis regulates elastin formation and degradation, *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* 32 (2013) 86–94. doi:10.1016/j.matbio.2012.11.004.
- [151] A. Hayashi, T. Suzuki, H. Wachi, S. Tajima, T. Nishikawa, S. Murad, S.R. Pinnell, Minoxidil stimulates elastin expression in aortic smooth muscle cells, *Arch. Biochem. Biophys.* 315 (1994) 137–141. doi:10.1006/abbi.1994.1482.
- [152] I. Tokimitsu, S. Tajima, Inhibition of elastin synthesis by high potassium salt is mediated by Ca²⁺ influx in cultured smooth muscle cells in vitro: reciprocal effects of K⁺ on elastin and collagen synthesis, *J. Biochem. (Tokyo)*. 115 (1994) 536–539.
- [153] M. Lannoy, S. Slove, L. Louedec, C. Choqueux, C. Journé, J.-B. Michel, M.-P. Jacob, Inhibition of ERK1/2 phosphorylation: a new strategy to stimulate elastogenesis in the

- aorta, *Hypertens. Dallas Tex* 1979. 64 (2014) 423–430. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.03352.
- [154] S. Tajima, A. Hayashi, T. Suzuki, T. Nishikawa, Stimulation of elastin expression by minoxidil in chick skin fibroblasts, *Arch. Dermatol. Res.* 287 (1995) 494–497.
- [155] J. Tsoporis, F.W. Keeley, R.M. Lee, F.H. Leenen, Arterial vasodilation and vascular connective tissue changes in spontaneously hypertensive rats, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 31 (1998) 960–962. doi:10.1097/00005344-199806000-00022.
- [156] S. Slove, M. Lannoy, J. Behmoaras, M. Pezet, N. Sloboda, P. Lacolley, B. Escoubet, J. Buján, M.-P. Jacob, Potassium channel openers increase aortic elastic fiber formation and reverse the genetically determined elastin deficit in the BN rat, *Hypertens. Dallas Tex* 1979. 62 (2013) 794–801. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01379.
- [157] M. Coquand-Gandit, M.-P. Jacob, W. Fhayli, B. Romero, M. Georgieva, S. Bouillot, E. Estève, J.-P. Andrieu, S. Brasseur, S. Bouyon, N. Garcia-Honduvilla, P. Huber, J. Buján, M. Atanasova, G. Faury, Chronic Treatment with Minoxidil Induces Elastic Fiber Neosynthesis and Functional Improvement in the Aorta of Aged Mice, *Rejuvenation Res.* 20 (2017) 218–230. doi:10.1089/rej.2016.1874.
- [158] R.H. Knutsen, S.C. Beeman, T.J. Broekelmann, D. Liu, K.M. Tsang, A. Kovacs, L. Ye, J.R. Danback, A. Watson, A. Wardlaw, J.E. Wagenseil, J.R. Garbow, M. Shoykhet, B.A. Kozel, Minoxidil improves vascular compliance, restores cerebral blood flow, and alters extracellular matrix gene expression in a model of chronic vascular stiffness, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 315 (2018) H18–H32. doi:10.1152/ajpheart.00683.2017.
- [159] W. Fhayli, M. Boyer, Z. Ghandour, M.P. Jacob, J.P. Andrieu, B.C. Starcher, E. Estève, G. Faury, Chronic administration of minoxidil protects elastic fibers and stimulates their neosynthesis with improvement of the aorta mechanics in mice, *Cell. Signal.* 62 (2019) 109333. doi:10.1016/j.cellsig.2019.05.018.
- [160] S. Raveaud, P. Mezin, N. Lavanchy, B. Starcher, R.P. Mecham, J. Verdetti, G. Faury, Effects of chronic treatment with a low dose of nicorandil on the function of the rat aorta during ageing, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 36 (2009) 988–994. doi:10.1111/j.1440-1681.2009.05174.x.
- [161] M. Bouhedja, B. Peres, W. Fhayli, Z. Ghandour, A. Boumendjel, G. Faury, S. Khelili, Design, synthesis and biological evaluation of novel ring-opened cromakalim analogues with relaxant effects on vascular and respiratory smooth muscles and as stimulators of elastin synthesis, *Eur. J. Med. Chem.* 144 (2018) 774–796. doi:10.1016/j.ejmech.2017.12.071.
- [162] N. Bouider, W. Fhayli, Z. Ghandour, M. Boyer, K. Harrouche, X. Florence, B. Pirotte, P. Lebrun, G. Faury, S. Khelili, Design and synthesis of new potassium channel activators derived from the ring opening of diazoxide: study of their vasodilatory effect, stimulation of elastin synthesis and inhibitory effect on insulin release, *Bioorg. Med. Chem.* 23 (2015) 1735–1746. doi:10.1016/j.bmc.2015.02.043.
- [163] C.M. Halabi, T.J. Broekelmann, R.H. Knutsen, L. Ye, R.P. Mecham, B.A. Kozel, Chronic antihypertensive treatment improves pulse pressure but not large artery mechanics in a mouse model of congenital vascular stiffness, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 309 (2015) H1008-1016. doi:10.1152/ajpheart.00288.2015.
- [164] H. Chai, Z. Tao, W. Chen, Y. Xu, F. Huang, C. Su, X. Chen, Cortistatin attenuates angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm through inactivation of the ERK1/2 signaling pathways, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 495 (2018) 1801–1806. doi:10.1016/j.bbrc.2017.12.033.
- [165] S. Sen, S. Bunda, J. Shi, A. Wang, T.F. Mitts, A. Hinek, Retinoblastoma protein modulates the inverse relationship between cellular proliferation and elastogenesis, *J.*

- Biol. Chem. 286 (2011) 36580–36591. doi:10.1074/jbc.M111.269944.
- [166] V. Cenizo, V. André, C. Reymermier, P. Sommer, O. Damour, E. Perrier, LOXL as a target to increase the elastin content in adult skin: a dill extract induces the LOXL gene expression, *Exp. Dermatol.* 15 (2006) 574–581. doi:10.1111/j.1600-0625.2006.00442.x.
- [167] B. Sohm, V. Cenizo, V. André, H. Zahouani, C. Pailler-Mattei, B. Vogelgesang, Evaluation of the efficacy of a dill extract in vitro and in vivo, *Int. J. Cosmet. Sci.* 33 (2011) 157–163. doi:10.1111/j.1468-2494.2010.00606.x.
- [168] P. Zhang, A. Huang, J. Ferruzzi, R.P. Mecham, B.C. Starcher, G. Tellides, J.D. Humphrey, F.J. Giordano, L.E. Niklason, W.C. Sessa, Inhibition of microRNA-29 enhances elastin levels in cells haploinsufficient for elastin and in bioengineered vessels--brief report, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 32 (2012) 756–759. doi:10.1161/ATVBAHA.111.238113.
- [169] P. Zhang, A. Huang, M. Morales-Ruiz, B.C. Starcher, Y. Huang, W.C. Sessa, L.E. Niklason, F.J. Giordano, Engineered zinc-finger proteins can compensate genetic haploinsufficiency by transcriptional activation of the wild-type allele: application to Willams-Beuren syndrome and supravalvular aortic stenosis, *Hum. Gene Ther.* 23 (2012) 1186–1199. doi:10.1089/hum.2011.201.

FIGURE LEGENDS:

Figure 1: Cellular events and signaling pathways involved in elastic fiber neosynthesis induced by pharmacological treatments.

Application of potassium channel openers to VSMCs leads to cell membrane hyperpolarization and calcium channel blockade. This induces a drop in intracellular Ca^{2+} concentration and inhibition of the ERK 1/2 pathway, resulting in the activation of the production of mRNAs involved in elastic fiber synthesis (tropoelastin, TE ; fibulin-5, FBLN-5 ; lysyl-oxidase, LOX ; fibrillin-1, FBN-1 ; ...) and secretion of the corresponding proteins. Treatment of the cells with an inhibitor of ERK 1/2 phosphorylation produces the same effect regarding elastin. Elastic fiber neosynthesis then precedes their integration/aggregation into pre-existing elastic fibers and elastic lamellae. Regarding the effect of minoxidil, a limitation of elastic fiber ruptures and AGE formation is also observed.

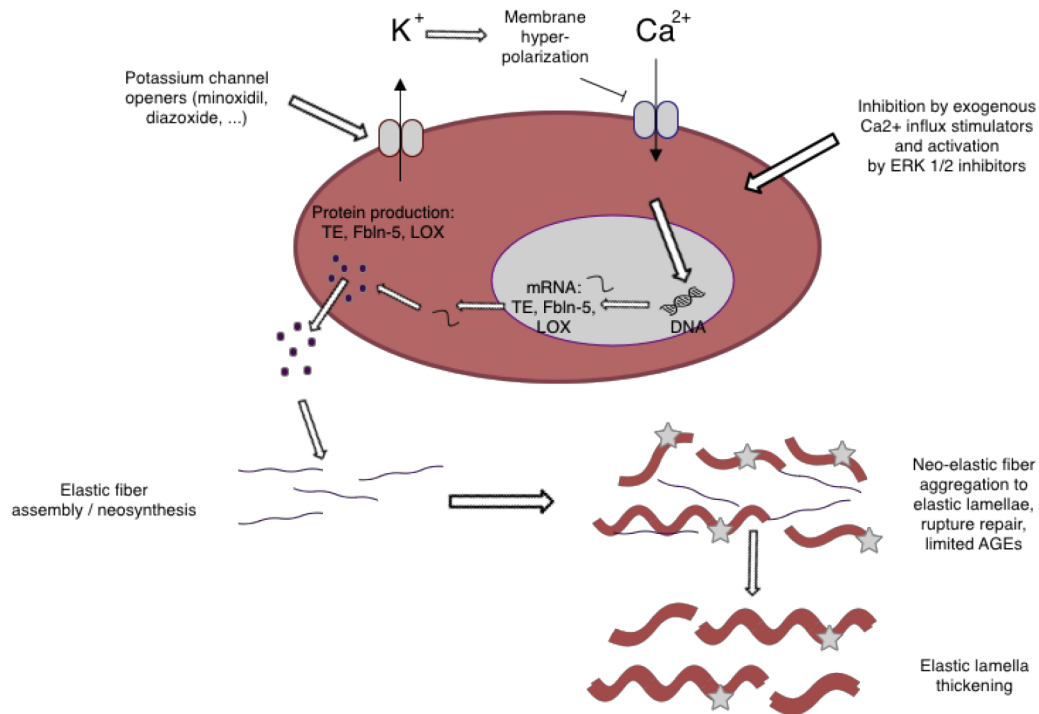
Figure 2: Evolution of arterial wall structure during development, adulthood, ageing and

pharmacotherapy.

During development, elastic fiber deposition takes place in short size arteries, which are later extended by the progressive blood pressure elevation. The extension of elastic fiber leads to the conformation providing them with their normal mechanical properties. During adulthood and aging, cyclic mechanical stress and proteases trigger elastic fiber degradation, leading to failing mechanical properties and increased stiffness. Pharmacological treatments (e.g. minoxidil) in adult or aged mice stimulates the expression of the components allowing for elastic fiber assembly (e.g. tropoelastin, fibulin-5 and LOX), and neosynthesized elastic fibers are produced in the media, either aggregated to the pre-existing elastic lamellae (increased thickness of the elastic lamellae) or in the interlamellar spaces (under different orientations).

Highlights

- Elastin and elastic fibers are synthesized only during late pregnancy and childhood
- Elastic fibers provide the arteries with elasticity
- Arterial elasticity allows for smoothing of the pulsatile blood flow and pressure delivered by the heart, leading to appropriate hemodynamics and organ perfusion
- During aging, elastic fibers are altered by mechanical and enzymatic processes, leading to arterial stiffening and dysfunction, altered perfusion and organ damage
- Pharmacological treatments, in particular with the ATP-dependent potassium channel opener minoxidil, reinitiate elastin production *in vitro* and *in vivo*
- Minoxidil treatment results in improvements of the arterial mechanics and, at least in aged animals, in neosynthesis of elastic fibers and protection of pre-existing elastic fibers
- Minoxidil and possibly other molecules could be considered as anti-aging agents for the arterial system



Elastic lamella



Ruptured elastic lamella



Vascular smooth muscle



AGE (bridging fibers)



Neosynthesized elastic fiber



Membrane ion channel

Figure 1

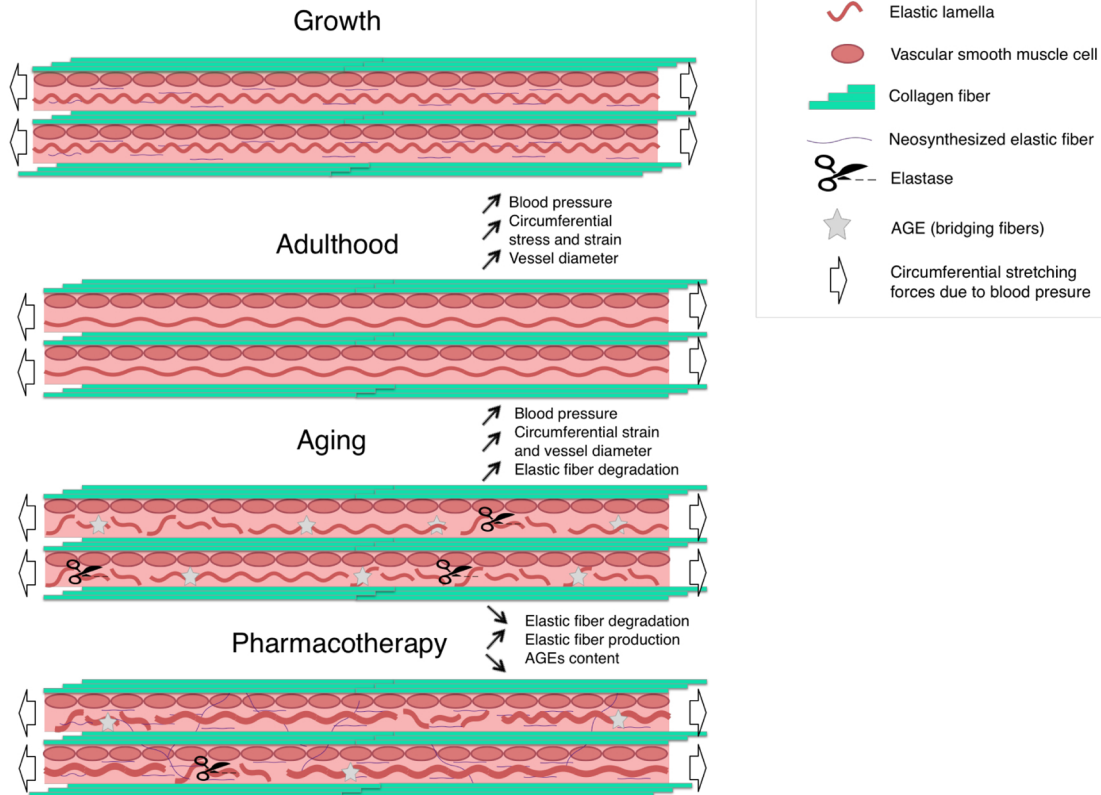


Figure 2

2. **Annexe 2 : lettre d'acceptation de publication dans la European Respiratory Review (ERR) d'une méta-analyse sur l'effet de l'hypoxie intermittente sur les paramètres cardiaques chez les rongeurs**

Copyright for your manuscript, ERR-0269-2021.R1

De : European Respiratory Review
<onbehalfof@manuscriptcentral.com>

lun., 24 janv. 2022 20:23

Objet : Copyright for your manuscript, ERR-0269-2021.R1

À : olfa harki <olfa.harki@univ-grenoble-alpes.fr>

Répondre à : caroline ashford-bentley <caroline.ashford-bentley@ersnet.org>

24-Jan-2022

Cardiac consequences of intermittent hypoxia: a matter of dose? A systematic review and meta-analysis in rodents
Belaidi, Elise; Khouri, Charles; Harki, Olfa; Bailleuil, Sébastien ; Faury, Gilles; Briançon-Marjollet, Anne; PEPIN, Jean-Louis; Arnaud, Claire

Dear Miss. Olfa Harki,

Your manuscript, "Cardiac consequences of intermittent hypoxia: a matter of dose? A systematic review and meta-analysis in rodents", has been accepted for publication in European Respiratory Review and we emailed you to request your completion of a copyright form.

Please complete the copyright form for your manuscript via the ScholarOne manuscripts system as soon as possible. Information regarding copyright can be found on our website here:
<https://err.ersjournals.com/authors/instructions#Copyright>

To complete the form, please go to
<https://mc.manuscriptcentral.com/err> and log into your account.

Your User ID is: olfa.harki@univ-grenoble-alpes.fr

If you have not yet logged into your account or you do not know the password please use the "Reset Password" link on the log in page (above the password field). If you have duplicate accounts please contact me detailing your accounts and which is your preferred account and I will consolidate them.

When logged in please browse to "Author" via the link towards the top left of the site.

If you are the submitting author, click on the "Manuscript With Decisions" link, then find your manuscript ERR-0269-2021.R1 listed. Click the blue "Copyright Form" link and follow the instructions to complete your YES or NO answer to the copyright question and click

SUBMIT.

If you are a co-author, click on the "Manuscripts I Have Co-Authored" link, then find your manuscript ERR-0269-2021.R1 listed. Click the blue "Copyright Form" link and follow the instructions to complete your YES or NO answer to the copyright question and click SUBMIT.

****PLEASE NOTE:** If you answer NO please be sure to follow the additional instruction.

The manuscript cannot be published until all copyright responses have been received.

If you have any queries or concerns, please do not hesitate to contact me.

Kind regards,

Caroline Ashford-Bentley
ERR Editorial Office
caroline.ashford-bentley@ersnet.org
Tel: +44 (0) 114 2672865

3. Annexe 3 : Commentaire reçu sur notre article publié dans ERJ



EUROPEAN RESPIRATORY *journal*

FLAGSHIP SCIENTIFIC JOURNAL OF ERS

Early View

Correspondence

Soluble VE-cadherin: not just a marker of endothelial permeability

Shi Qi Li, Ying Ni Lin, Qing Yun Li

Please cite this article as: Li SQ, Lin YN, Li QY. Soluble VE-cadherin: not just a marker of endothelial permeability. *Eur Respir J* 2021; in press (<https://doi.org/10.1183/13993003.02241-2021>).

This manuscript has recently been accepted for publication in the *European Respiratory Journal*. It is published here in its accepted form prior to copyediting and typesetting by our production team. After these production processes are complete and the authors have approved the resulting proofs, the article will move to the latest issue of the ERJ online.

Copyright ©The authors 2021. For reproduction rights and permissions contact permissions@ersnet.org

Soluble VE-cadherin: not just a marker of endothelial permeability

Shi Qi Li ^{1,2*}, Ying Ni Lin ^{1,2*}, Qing Yun Li^{1,2}

1.Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China

2.Institute of Respiratory Medicine, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China

*Co-first author

Correspondence to: Qing Yun Li, Tel: 86-21-64314162; Fax:86-21-64674301; E-mail: liqingyun68@hotmail.com

Competing interests:

S.Q. Li declares no competing interests.

Y. Lin declares no competing interests.

Q. Li declares no competing interests.

Dear editor,

Recently, the publication by Harki et al.[1] in the *European Respiratory Journal* reported higher levels of serum soluble VE-cadherin(sVE) in volunteers exposed to intermittent hypoxia (IH), as well as in patients with obstructive sleep apnea (OSA). They further demonstrated that IH induced VE-cadherin cleavage through ROS production and activation of HIF-1, VEGF and tyrosine kinase pathway, indicating that serum sVE could be a promising biomarker of increased endothelial permeability in OSA patients. The results are meaningful as there is yet no endothelium-specific biomarker for the early diagnosis of endothelial barrier disruption in OSA patients. However, it is worth noting that sVE may not be just a marker of endothelial permeability.

First, VE-cadherin is the major transmembrane adhesion molecule which is responsible for maintenance of endothelial barrier integrity. VE-cadherin can be cleaved from the cell surface by proteolytic cleavage, resulting in the generation of an 90kDa fragment referred to sVE[2]. Hence, the level of sVE may signalize the presence of increased endothelial permeability in theory. Harki et al. have reported increased levels of sVE in patients with OSA, however, the absence of

correlative data between sVE and long-term cardiovascular outcomes, such as flow-mediated vasodilation, circulating inflammatory and metabolic biomarkers, peripheral arterial tonometry, or blood pressure made it less convincing that serum sVE represents a valid marker for endothelial dysfunction in OSA patients.

Second, sVE may be a marker of inflammation in OSA patients. Notably, sVE is a marker of inflammation as elevated levels of sVE have been reported in various systemic vasculitis like Rheumatoid arthritis, Behçet's disease, Henoch-Schönlein purpura, as well as urticarial and allergic vasculitis, under conditions of chronic inflammation, and also in patients with severe sepsis[3]. Incubation of endothelial cells with pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor- α and bacterial lipopolysaccharide led to significantly increased serum sVE[2]. Meanwhile, inflammation and oxidative stress are the hallmarks of OSA, thus, it's possible that higher sVE reported by Harki et al. may represent increased systemic inflammation rather than endothelial permeability of OSA.

Third, sVE may participate the pathophysiological process of OSA induced vascular injury, rather than a biomarker along. The authors demonstrated that IH-induced endothelial barrier disruption is accompanied by formation of sVE. However, it was unclear from the study whether sVE is only the result of the cleavage of VE-cadherin, or if sVE has a particular function of itself. It has previously been observed that sVE-cadherin contributes to inflammation-induced disruption of the endothelial barrier by interfering VE-cadherin interaction, indicating that sVE may play a role in the pathophysiological process directly[4].

In summary, serum sVE may be an innovative biomarker of endothelial permeability, however it should be better if the validity of serum sVE could be further investigated for the relationship with conventional FMD or other endothelium indicators. Besides, the specificity of sVE as the biomarker of endothelial permeability is doubtful, as it may also represent the systemic inflammation. Further, it should be clarified whether the generation of sVE has biological function itself, which implies a novel target for therapeutic efforts.

References

1. Harki O, Tamisier R, Pepin JL, Bailly S, Mahmani A, Gonthier B, Salomon A, Vilgrain I, Faury G, Briancon-Marjollet A. VE-Cadherin cleavage in sleep apnoea: new insights into intermittent hypoxia-related endothelial permeability. *Eur Respir J* 2021.
2. Sidibe A, Mannic T, Arboleas M, Subileau M, Gulino-Debrac D, Bouillet L, Jan M, Vandhuick T, Le Loet X, Vittecoq O, Vilgrain I. Soluble VE-cadherin in rheumatoid arthritis patients correlates with disease activity: evidence for tumor necrosis factor alpha-induced VE-cadherin cleavage. *Arthritis Rheum* 2012; 64(1): 77-87.
3. Blaise S, Polena H, Vilgrain I. Soluble vascular endothelial-cadherin and auto-antibodies to human vascular endothelial-cadherin in human diseases: Two new biomarkers of endothelial dysfunction. *Vasc Med* 2015; 20(6): 557-565.
4. Flemming S, Burkard N, Renschler M, Vielmuth F, Meir M, Schick MA, Wunder C, Germer CT, Spindler V, Waschke J, Schlegel N. Soluble VE-cadherin is involved in endothelial barrier breakdown in systemic inflammation and sepsis. *Cardiovasc Res* 2015; 107(1): 32-44.

4. Annexe 4 : Protocole d'étude de la perméabilité au dextran 40kDa en hypoxie intermittente sur cellules HAEC

FITC-Dextran 40kda : poudre jaune reconstituée dans le PBS Ca- Mg- à 20mg/ml puis dilué dans le milieu de culture sans LVES pour obtenir la solution de travail à 200µg/ml.

Les inserts sont à coater avec du collagène 0.2mg/ml avant l'ensemencement des cellules.

Faire en triplicate

Procédure

- La TEER maximale est obtenue après 4h d'expo
- Vider les inserts et replacer les dans une plaque à fond perméable à 24 puits
- Placer 700µL de M200 dans les puits de la boîte à fond perméable
- Placer 200µL de M200 sans FITC-Dextran dans les inserts
- Incuber 4h à l'hypoxie intermittente/normoxie
- Vider les inserts et placer 200µL FITC-Dextran dilué dans le M200 à 200µg/ml
- Réexposer à l'HI/N pendant 2 heures supplémentaires
- Prélever 50µL du milieu de la chambre inférieure du transwell et placer les dans un puit d'une plaque opaque à 96 puits
- Faire la même chose pour tous les inserts
- Placer également 50µL de la solution de travail de FITC-dextran (200µg/mL) pour avoir le CO
- Lecture des plaques à λ488-535

5. Annexe 5 : Protocole d'étude du passage de FL-LDL en hypoxie intermittente sur cellules HAEC

FL-LDL : Flacon de 200 µl (1mg/ml) conservé à +4 (frigo culture cell) puis dilué dans le milieu de culture M200 sans LVES pour obtenir la solution de travail à 10µg/ml.

Les inserts (diamètre de pores 8µm) sont à coater avec du collagène type I (0.2mg/ml) avant l'ensemencement des cellules.

Faire en Duplicate

Procédure

- Après deux jours de culture, vider les inserts et replacer les dans une plaque à fond perméable à 24 puits
- Placer 600µL de M200 dans les puits de la boîte à fond perméable
- Placer 200µL de M200 sans FL-LDL dans les inserts
- Incuber 3h à l'hypoxie intermittente/normoxie
- Vider les inserts et placer 200µL FL-LDL dilué dans le M200 à 10µg/ml
- Réexposer à l'HI/N pendant 3 heures supplémentaires
- Prélever 50µL du milieu de la chambre inférieure du transwell et placer les dans un puit d'une plaque opaque à 96 puits
- Faire la même chose pour tous les inserts
- Placer également 50µL de la solution de travail de FL-LDL (10µg/mL) pour avoir le CO et M200 sans LVES comme blanc.
- Lecture des plaques à λ488-535 (à l'aide du Fluorimètre au 5ème)
- Soustraire le blanc
- Exprimer les valeurs en fonction des contrôles normoxiques

6. Annexe 6 : Protocole d'étude de la migration des THP-1 en hypoxie intermittente sur cellules HAEC

Monocytes THP-1 : cellules utilisées à une concentration de 3 millions/ml diluées dans le milieu de culture M200 sans LVES, ne sont pas pré-exposées à l'HI.

Les inserts (diamètre de pores 8µm) sont à coater avec du collagène type I (0.2mg/ml) avant l'ensemencement des cellules.

Faire en Duplicate

Procédure

- Après deux jours de culture, vider les inserts et replacer les dans une plaque à fond perméable à 24 puits
- Placer 600µL de M200 dans les puits de la boîte à fond perméable
- Placer 200µL de M200 sans THP-1 dans les inserts
- Incuber 2h à l'hypoxie intermittente/normoxie
- Vider les inserts et placer 200µL de THP-1 diluées dans du M200 sans LVES (3 millions/ml)
- Dans le milieu en bas, rajouter 100ng/ml de MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1)
- Réincuber pendant 4 heures supplémentaires à l'HI/N
- Récupérer tout le milieu de la chambre inférieure de chaque insert, centrifuger à 1000rpm pendant 5 min, reprendre le culot dans 50 µL de milieu M200.
- Compter les cellules THP-1 par une cellule de Neubauer.
- Exprimer les valeurs en fonction des contrôles normoxiques

7. Annexe 7 : Coloration des aortes en face à l'Oil Red O

Solution mère : 2.1 g dans 600mL d'isopropanol, agiter par retournement puis laisser une nuit à RT.

Solution de travail (*qui ne se conserve pas*) : 60% de solution mère + 40% d'eau. Mélanger, laisser reposer au moins 10 min puis filtrer. Attention à la lumière.

Solution de rinçage : 60% d'isopropanol + 40% d'eau.

Prélèvement

- Le jour des prélèvements : mettre les aortes dans du PFA 2% (dans du PBS) pendant 24h à +4°C
- Le lendemain : enlever les aortes du PFA et les mettre dans du PBS à +4°C

Coloration ORO

- Rincer les aortes 2*5 minutes avec la solution de rinçage
- Incuber les aortes dans la solution de travail pendant 12h (overnight)
- Le lendemain, rincer brièvement les aortes avec la solution de travail pour enlever l'excès de la solution de travail puis avec du PBS
- Placer les aortes dans des Eppendorfs contenant du PBS

Dissection

- Placer l'aorte dans une boîte à fond noir pour la nettoyer (enlever délicatement l'adventice)
- ouvrir l'aorte longitudinalement
- fixer-la à l'aide de pins très fins tout en la gardant hydratée avec du PBS
- Remplir la boîte avec du PBS et prendre une photo

Quantification

- Mesurer l'aire totale de l'aorte à l'aide de l'option Polygone de Image J
- Mesurer l'aire des plaques colorées en rouge à l'aide de l'option Color threshold de Image J (Image-adjust-color threshold)
- Calculer le ratio Aire des plaques/ Aire totale de l'aorte

8. Annexe 8 : Coloration des valves aortiques à l'Oil Red O

Solution mère : 2.1 g dans 600mL d'isopropanol, agiter par retournement puis laisser une nuit à RT.

Solution de travail (*qui ne se conserve pas*) : 60% de solution mère + 40% d'eau. Mélanger, laisser reposer au moins 10 min puis filtrer. Attention à la lumière.

- Laisser sécher les lames pendant 15 min sous la hotte
- Incuber les lames 10 minutes dans une solution de formaldéhyde 4%
- Rincer à l'isopropanol 60%
- Laisser sécher les lames 10 minutes puis les placer dans l'Oil Red O 20 minutes
- Rincer à l'isopropanol 60% puis à l'eau du robinet (1 bain puis 1-2 minutes).
- Les lames sont ensuite placées dans un bain d'Hématoxyline 7 minutes puis rincées à l'eau du robinet et monter en milieu aqueux.
- Quantifier par ImageJ à l'aide de l'outil de seuillage

9. Annexe 9 : Protocole d'analyse par immunofluorescence de la VE-

Cadhérine murine sur cryocoupes d'aorte

Etape	Procédure	Temps (min)	Température	Réactif
1	Fixation	10'	Ambiante	PFA 4%
2	Lavage PBS	3x5'	Ambiante	PBS 1X + 0,1% Tween 20
3	Inhibition auto-fluo élastine	3*10'	glace ou à 4°C sous hotte et sous agitation douce	NaBH4 0,1% sans lavages intermédiaires
4	Lavage PBS	3x5'	Ambiante	PBS 1X + 0,1% Tween 20
5	Cerclage			stylo PAP PEN
6	Blocage des sites non spécifiques	30'	Ambiante	PBS 1X + Goat serum 10%
7	Anticorps I ^{aire} rat anti-mouse VE-Cadh (CD144) n° 203	o/n	4°C	Dilué 1:50 dans PBS-5%goat serum
8	Lavage avec tampon de rinçage	3x5	Ambiante	PBS 1X + 0,1% Tween 20
9	Anticorps II ^{aire} (anti-rat Alexa 488) (P)	45-60	Ambiante	Anti rat Alexa (1/500 (4ug/ml) dilué dans PBS-5%goat serum
10	Lavage avec tampon de rinçage	2x5	Ambiante	PBS 1X + 0,1% Tween 20
11	Contre coloration noyaux	10'	Ambiante	Dapi 1/1000e ou hoechst
12	Lavages PBS	3x5	Ambiante	PBS 1x
13	Monter les coupes	-	Ambiante	Milieu de montage aqueux (Fluoromount)

- Pas de perméabilisation

- NBH4: à préparer fraîchement à chaque fois 0,1g dans 100mL de PBS 1X (attention poudre inflammable toxique).

10. Annexe 10 : Modèles murins d'HI

Il existe d'autres modèles murins pour étudier les effets du SAOS, comme la trachéotomie ou l'utilisation d'un ballon gonflable dans la trachée ou d'un masque nasal qui permettent d'obstruer par intermittence les voies respiratoires (Figure 21). Ces modèles permettent de reproduire plusieurs composantes du SAOS comme l'hypoxie intermittente, l'hypercapnie, et les efforts inspiratoires. Mais ils sont invasifs et stressants pour les animaux (Dematteis et al., 2009; Hunyor and Cook, 2018). Le modèle murin utilisé par notre laboratoire consiste à exposer les animaux à une hypoxie intermittente en les plaçant dans des cages dont le taux d'oxygène peut varier et être contrôlé par programmation.

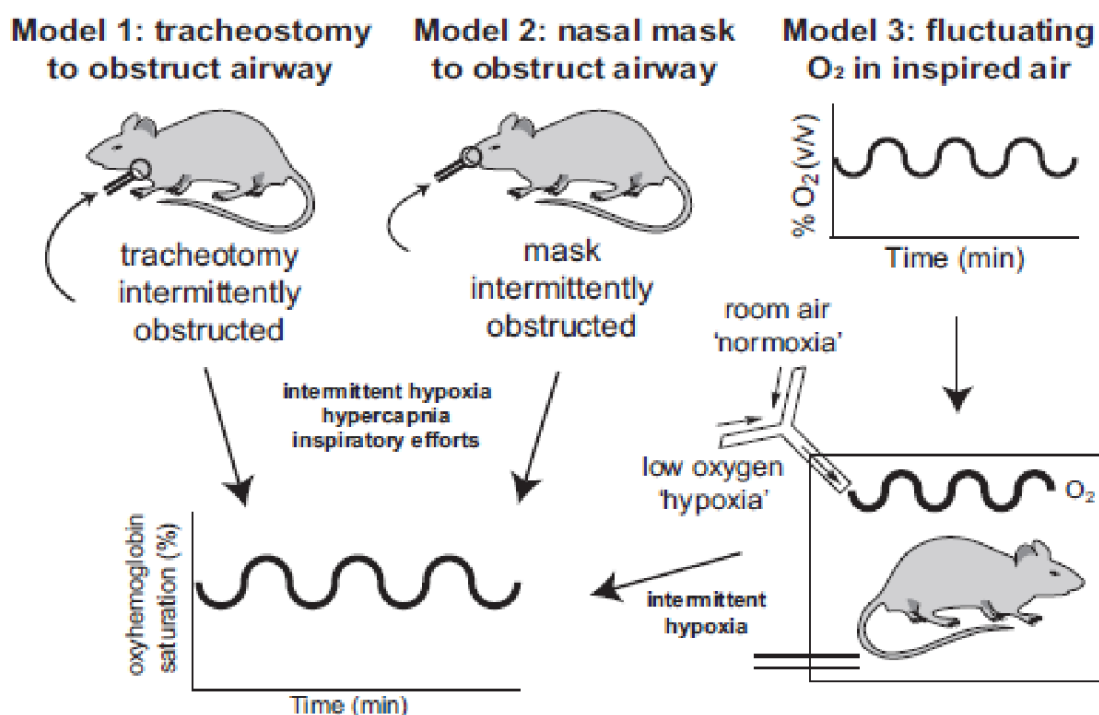


Figure 21: Modèles expérimentaux qui miment le syndrome d'apnées obstructives du sommeil chez des animaux. Le modèle 1 est la trachéotomie ou l'utilisation d'un ballon gonflable, le modèle 2 consiste à utiliser un masque nasal et enfin le modèle 3 qui consiste à exposer les animaux à des niveaux de FiO₂ bas par intermittence (d'après Hunyor and Cook, 2018).

11. Annexe 11 : Modèles murins d'athérosclérose

Plusieurs modèles animaux sont utilisés pour étudier l'athérosclérose. L'espèce privilégiée est la souris en raison de la rapidité de reproduction et de développement de lésions d'athérosclérose et notamment de la facilité d'introduire plusieurs manipulations génétiques (knock-out, knock-in), avec possible spécificité tissulaire de la modification génique et la similarité des mécanismes impliqués dans l'athérosclérose chez l'Homme. Cependant, ce modèle présente certaines limites. En effet, la souris susceptible à l'athérosclérose ne développe pas de plaques instables comme celles observées chez l'humain. Elle ne reproduit pas les localisations préférentielles pour le développement des plaques chez l'Homme (pas de plaques d'athéromes au niveau des artères coronaires mais une athérosclérose importante au niveau des valves aortiques). Le métabolisme et le profil des lipoprotéines circulantes sont différents entre la souris modèle d'athérosclérose et l'Homme (Andrés and Dorado, 2015).

Deux manipulations génétiques sont fréquemment utilisées pour rendre les souris susceptibles à l'athérosclérose : des souris déficientes en apolipoprotéines E (ApoE^{-/-}) et des souris déficientes en récepteurs aux LDL (LDLr^{-/-}). Ces deux mutations sont caractérisées par une hypercholestérolémie responsable du développement de l'athérosclérose.

b. Souris ApoE^{-/-}

L'ApoE est une glycoprotéine produite majoritairement par les hépatocytes mais aussi par les macrophages, les cellules stéroïdogènes, les astrocytes et les adipocytes. Elle permet l'élimination hépatique des lipoprotéines non-HDL (chylomicrons et des VLDL rémanents) grâce à sa fonction "ligand" pour les récepteurs des lipoprotéines à faible densité (LDL). Les souris ApoE^{-/-} sont caractérisées par une accumulation des lipoprotéines enrichies en cholestérol et en apoB48 (VLDL notamment, le LDL est plutôt caractéristique des lésions humaines). Elles développent de l'athérosclérose même sous régime standard, l'athérogenèse étant stimulée par les régimes riches en lipides et en cholestérol. La localisation des lésions peut dépendre de la nature ainsi que de la durée du régime alimentaire. Ces souris développent rarement des lésions au niveau des artères coronaires (Andrés and Dorado, 2015; Emini Veseli et al., 2017).

c. Souris LDLr^{-/-}

Les récepteurs à LDL sont exprimés sur la membrane des hépatocytes où ils reconnaissent les apolipoprotéines ApoB100 ou ApoE, et fixent les LDL, facilitant ainsi leur absorption et leur élimination par internalisation dans des vésicules. L'absence de ces récepteurs chez des souris déficientes en récepteurs LDL (LDLr^{-/-}) est responsable de l'accumulation d'apoB100 et du LDL-cholestérol. Elles augmentent modérément leur cholestérol et développent ainsi des plaques seulement quand elles sont nourries avec un régime riche en cholestérol (Emini Veseli et al., 2017). Ce modèle est largement utilisé comme un modèle d'hypercholestérolémie familiale caractérisée par un nombre insuffisant de récepteurs à LDL (Andrés and Dorado, 2015).

d. Autres modèles d'athérosclérose

Il s'agit d'une double délétion ApoE^{-/-} et LDLr^{-/-} (ApoE/LDLr double-knockout) ou des variantes des modèles ApoE^{-/-} et LDLr^{-/-}. Des souris ApoE2 *Knock-In* ou ApoE*3-*Leiden* ont une faible affinité aux récepteurs du LDL et développent spontanément de l'athérosclérose quand ils sont nourris par un régime riche en cholestérol. Des variantes du modèle LDLr^{-/-} existent aussi, comme des souris transgéniques ApoB100/ LDLr^{-/-}, ou des souris Apobec^{-/-} LDLr^{-/-} qui expriment exclusivement l'ApoB100 par mutation au niveau du gène qui code pour l'ApoB48 (Emini Veseli et al., 2017; Poznyak et al., 2020).

Les souris PCSK9-AAV (pro-protein convertase subtilisin/kexin type 9 - adeno associated virus) sont un nouveau modèle d'athérosclérose qui a été développé en injectant un virus adéno-associé recombinant portant une mutation (D374Y ou D377Y) qui permet un gain en fonction de la protéine PCSK9, qui est une enzyme capable de se lier au récepteur du LDL, réduisant son expression sur la membrane des hépatocytes et augmentant ainsi le LDL-cholestérol plasmatique. L'intérêt de ce modèle réside dans la possibilité d'étudier l'efficacité des traitements hypolipémiants en terme de régression de l'athérosclérose, puisque ces souris peuvent réduire leurs lésions d'athérosclérose suite à un régime standard (Poznyak et al., 2020).

Ils existent aussi des modèles animaux de plaques d'athérome instables qui sont utiles pour étudier les médicaments stabilisants de plaques. Cette catégorie est représentée par le modèle

de souris ApoE^{-/-}Fbn1^{C1039G^{+/-}}, qui consiste à induire, en plus de l'invalidation de ApoE, une mutation hétérozygote qui altère la production de fibrilline-1 et ainsi la structure des fibres élastiques, ce qui rend les plaques d'athérome vulnérables. La rupture spontanée de la plaque est évaluée par la détection de la mort subite des animaux (Emini Veseli et al., 2017; Poznyak et al., 2020).

Les principaux modèles murins d'athérosclérose sont présentés en figure 22.













	Model	Lipid profile	Plaque distribution and characteristics (20 weeks WD)	Advantages & limitations
ApoE ^{-/-}	<p>Disruption of the ApoE gene</p> 	<p>Plasma cholesterol: 400-600 mg/dl on ND >1000 mg/dl on WD</p> <p>Lipoproteins: ↓ VLDL ↓ LDL ↓ HDL</p>	 <p>Fibrous plaques: Smooth muscle cells Extracellular matrix Inflammatory cells Necrotic core</p>	<ul style="list-style-type: none"> ⊕ Develops atherosclerosis on ND ⊖ No human-like lipid profile ⊖ ApoE plays a role in inflammation → influence plaque development ⊖ No spontaneous plaque rupture, thrombosis and complications
LDLR ^{-/-}	<p>Disruption of the LDL receptor gene</p> 	<p>Plasma cholesterol: 200-300 mg/dl on ND >1000 mg/dl on WD</p> <p>Lipoproteins: ↓ VLDL ↓ LDL = HDL</p>	 <p>Fibrous plaques: Smooth muscle cells Extracellular matrix Inflammatory cells Necrotic core</p>	<ul style="list-style-type: none"> ⊕ Human-like lipid profile (LDL) ⊕ Functional ApoE → no impact on inflammation ⊖ Complex lesion development requires a WD ⊖ No spontaneous plaque rupture, thrombosis and complications
ApoE ^{-/-} LDLR ^{-/-}	<p>Disruption of the ApoE and the LDL receptor gene</p> 	<p>Plasma cholesterol: 400-600 mg/dl on ND >1000 mg/dl on WD</p> <p>Lipoproteins: ↓ VLDL ↓ LDL ↓ HDL</p>	 <p>Fibrous plaques: Smooth muscle cells Extracellular matrix Inflammatory cells Necrotic core</p>	<ul style="list-style-type: none"> ⊕ Develops atherosclerosis on ND ⊖ No spontaneous plaque rupture, thrombosis and complications
ApoE3-Leiden	<p>ApoE3-Leiden mutation via DNA construct (ApoE, ApoC1) from the ApoE3-Leiden proband</p> 	<p>Plasma cholesterol: 100-200 mg/dl on ND >1000 mg/dl on WD</p> <p>Lipoproteins: ↓ VLDL ↓ LDL ↑ HDL (only on WD)</p>	 <p>Fibrous plaques: Smooth muscle cells Extracellular matrix Inflammatory cells Necrotic core</p>	<ul style="list-style-type: none"> ⊕ Functional ApoE → no impact on inflammation ⊖ Complex lesion development requires a WD ⊖ No spontaneous plaque rupture, thrombosis and complications
PCSK9-AAV	<p>Single Adeno-Associated Virus-mediated gene transfer of mutant PCSK9</p> 	<p>Plasma cholesterol: 300 mg/dl on ND >1000 mg/dl on WD</p> <p>Lipoproteins: ↓ VLDL (only on WD) ↓ LDL = HDL</p>	 <p>Fibrous plaques: Smooth muscle cells Extracellular matrix Inflammatory cells Necrotic core</p>	<ul style="list-style-type: none"> ⊕ No genetic modification needed ⊖ Lesion development requires a WD ⊖ No spontaneous plaque rupture, thrombosis and complications
ApoE ^{-/-} Fbn1 ^{C1039G/-/-}	<p>ApoE^{-/-} mice X mice with a mutation in the Fbn1 gene (C1039G)</p> 	<p>Plasma cholesterol: 400-600 mg/dl on ND >1000 mg/dl on WD</p> <p>Lipoproteins: ↓ VLDL ↓ LDL ↓ HDL</p>	 <p>Rupture-prone plaques: ↓ Smooth muscle cells ↓ Extracellular matrix ↑ Inflammatory cells ↑ Necrotic core Neovascularisation Haemorrhage</p>	<ul style="list-style-type: none"> ⊕ Accelerated plaque development ⊕ Spontaneous plaque rupture with complications (MI, stroke) and sudden death ⊕ Intra-plaque neovascularisation and haemorrhage present ⊖ Male mice on WD die prematurely due to aneurysm rupture

Figure 22: Les différents modèles murins d'athérosclérose et leurs caractéristiques (d'après Emini Veseli et al., 2017).

Syndrome d'apnées obstructives du sommeil et athérosclérose : vers l'identification de la VE-cadhérine comme biomarqueur et comme nouvelle cible thérapeutique ?

Les complications cardiovasculaires du syndrome d'apnées obstructives du sommeil (SAOS), telles que athérosclérose et infarctus du myocarde, posent un problème de santé publique. La VE-Cadhérine (VE-Cad), protéine des jonctions adhérentes endothéliales, subit un clivage menant à l'augmentation de la perméabilité endothéliale et la libération d'un fragment soluble (sVE), marqueur de dysfonction endothéliale dans plusieurs pathologies. Notre hypothèse est que, dans le SAOS, le clivage de la VE-Cad contribuerait à une augmentation de la perméabilité endothéliale, menant à une dysfonction endothéliale et de l'athérosclérose, et que sVE pourrait être un biomarqueur de dysfonction endothéliale.

Dans cette thèse, nous avons démontré pour que l'hypoxie intermittente active le clivage de la VE-cadhérine, détectable par des taux élevés de sVE, dans 3 modèles d'hypoxie intermittente : *in vitro*, *in vivo* chez des souris et chez des volontaires sains exposés à l'hypoxie intermittente. Nous avons également détecté ce fragment soluble dans le sang des patients SAOS sans aucune comorbidité cardiovasculaire, chez qui sVE a été corrélée avec l'AHI, le VEGF sérique et a été réduite par le traitement PPC notamment chez les patients bien compliants. *In vitro*, nous avons démontré que le clivage de la VE-cadhérine est associé à une augmentation de la perméabilité endothéliale et du passage des LDLs et des monocytes à travers une monocouche de cellules endothéliales. Nous avons également démontré que la perméabilité endothéliale médiée par le clivage de la VE-cadhérine implique des voies de signalisation qui peuvent dépendre de ROS, HIF-1, VEGF et des tyrosine kinases. Enfin, nous avons démontré que l'inhibition des voies de signalisation du clivage de la VE-cadhérine *in vivo* a prévenu la dysfonction endothéliale et l'athérosclérose induites par l'hypoxie intermittente.

Ces résultats suggèrent que l'athérosclérose induite par l'hypoxie intermittente est initiée par l'hyperperméabilité endothéliale provoquée par le clivage de la VE-cadhérine, ce qui faciliterait l'infiltration des lipides et des molécules inflammatoires dans la paroi artérielle. VE-cadhérine pourrait être une cible prometteuse pour prendre en charge l'athérosclérose associée au SAOS.

Mots clés : Syndrome d'apnées obstructives du sommeil, hypoxie intermittente, dysfonction endothéliale, athérosclérose, VE-Cadhérine.

Obstructive sleep apnea syndrome and atherosclerosis: towards the identification of VE-cadherin as a biomarker and as a new therapeutic target?

The cardiovascular complications of obstructive sleep apnea syndrome (OSAS), such as atherosclerosis and myocardial infarction, are considered as a public health concern. VE-Cadherin (VE-Cad), a protein of adherent endothelial junctions, undergoes cleavage leading to increased endothelial permeability and the release of a soluble fragment (sVE), a marker of endothelial dysfunction in several pathologies. Our hypothesis is that, in OSAS, VE-Cad cleavage would increase endothelial permeability, leading to endothelial dysfunction and atherosclerosis, and that sVE could be a biomarker of endothelial dysfunction.

In this thesis, we demonstrated that intermittent hypoxia activates the cleavage of VE-cadherin, detectable by high levels of sVE, in 3 intermittent hypoxia models: *in vitro*, *in vivo* in mice and in healthy volunteers exposed to intermittent hypoxia. We also detected this soluble fragment in the blood of OSAS patients without any cardiovascular comorbidity, in whom sVE has been correlated with AHI, serum VEGF and was reduced by CPAP treatment, especially in patients with high adherence. *In vitro*, we showed that the cleavage of VE-cadherin is associated with increased endothelial permeability and passage of LDLs and monocytes through an endothelial cell monolayer. We also found that endothelial permeability mediated by cleavage of VE-cadherin involves signaling pathways that could depend on ROS, HIF-1, VEGF, and tyrosine kinases. Finally, we demonstrated that inhibition of VE-cadherin cleavage signaling pathways *in vivo* prevented endothelial dysfunction and atherosclerosis induced by intermittent hypoxia.

These results suggest that atherosclerosis induced by intermittent hypoxia is initiated by endothelial hyperpermeability mediated by the VE-cadherin cleavage, which could facilitate the infiltration of lipids and inflammatory molecules into the arterial wall. VE-cadherin might be a promising target for the management of atherosclerosis associated with OSAS.

Keywords: Obstructive sleep apnea syndrome, intermittent hypoxia, endothelial dysfunction, atherosclerosis, VE-Cadherin.