



**HAL**  
open science

## Réponse des cellules respiratoires à l'hypoxie intermittente

Carole Philippe

► **To cite this version:**

Carole Philippe. Réponse des cellules respiratoires à l'hypoxie intermittente. Sciences agricoles. Université Paris-Est, 2011. Français. NNT : 2011PEST0097 . tel-00734315

**HAL Id: tel-00734315**

**<https://theses.hal.science/tel-00734315>**

Submitted on 21 Sep 2012

**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.

UNIVERSITE PARIS-EST

ECOLE DOCTORALE : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS XII

Présentée et soutenue publiquement par Carole PHILIPPE

Le 9/12/2011

**Titre : Réponse des cellules respiratoires à l'hypoxie intermittente**

JURY

Mme le Docteur Estelle ESCUDIER	Rapporteur
Mr le Professeur Frédéric GAGNADOUX	Rapporteur
Mr le Professeur Patrick LEVY	Examineur
Mr le Professeur Jean-Claude DUSSAULE	Examineur
Mr le Docteur Daniel ISABEY	Examineur
Mme le Professeur Marie-Pia d'ORTHO	Directrice de thèse

## Listes des abréviations utilisées

**AVC** : Accident Vasculaire cérébral

**AIT** : Accident Ischémique Transitoire

**BPCO** : Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive

**CML** : Cellules Musculaires Lisses

**COX-2** : cyclooxygénase-2

**CRP** : C-Reactive Protein

**DFX** : desferrioxamine

**DRO** : Dérivés Réactifs de l'Oxygène

**EIM** : Epaisseur Intima-Média

**ELISA** : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

**fMLP** : formyl-Met-Leu- Phe

**HI** : Hypoxie Intermittente

**HIF** : Hypoxia Inducible Factor

**HTA** : Hypertension Artérielle

**IAH** : Index d'Apnées/Hypopnées

**ICAM** : InterCellular Adhesion Molecule

**IL** : InterLeukine

**IMC** : Indice de Masse Corporelle

**GG** : Génioglosse

**LPS** : lipopolysaccharides bactériens

**MEC** : Matrice Extra Cellulaire

**MMP** : Métallo Protéase Matricelle

**NADPH** : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate

**PA** : Pression Artérielle

**PBS** : Phosphate Buffer Saline

**PDGF** : Platelet Derivated Growth Factor

**PECAM** : Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule

**PGE2** : prostaglandine E2

**PPD** : Protein Purified Derivative

**PPC** : Pression Positive Continue

**SAHOS** : Syndrome d'Apnées/Hypopnées Obstructives du Sommeil

**TGF- $\beta$**  : Transforming Growth Factor  $\beta$

**TNF** : Tumor Necrosis Factor

**VAS** : Voies Aériennes Supérieures

**VCAM** : Vascular Cellular Adhesion Molecule

**VEGF** : Vascular Endothelial Growth Factor

# SOMMAIRE :

<b>PARTIE I : effets biologiques de l'hypoxie intermittente :</b>	<b>7</b>
<b>1 Introduction :</b>	<b>7</b>
<b>1.1 Hypoxie Intermittente :</b>	<b>7</b>
1.1.1 Profils d'HI :	7
1.1.2 Modèles expérimentaux d'HI :	9
1.1.2.1 Les modèles animaux :	9
1.1.2.1.1 Mode d'administration :	9
1.1.2.1.2 Caractéristiques de l'HI :	10
1.1.2.1.3 Limites :	11
1.1.2.2 Modèles cellulaires d'hypoxie intermittente	12
1.1.2.2.1 Enceinte hermétique :	12
1.1.2.2.2 Système de convection forcée :	13
1.1.2.2.3 Milieu hypoxique préconditionné :	14
1.1.2.2.4 Alternative à l'enceinte hermétique :	15
<b>1.2 Le syndrome d'apnées du sommeil :</b>	<b>17</b>
1.2.1 Définition :	17
1.2.2 Diagnostic et prise en charge :	19
1.2.3 Conséquences liées au SAHOS :	20
1.2.3.1 Conséquences non cardiovasculaires :	20
1.2.3.2 Conséquences cardiovasculaires :	21
1.2.3.2.1 HTA :	21

1.2.3.2.2	Cardiopathies ischémiques :.....	22
1.2.3.2.3	Accident vasculaire cérébral : .....	22
1.2.3.2.4	Métabolisme :.....	23
1.2.3.2.5	Phénomènes pro-thrombotiques :.....	24
1.2.3.2.6	Dysfonction endothéliale : .....	25
1.2.3.2.7	Athérosclérose :.....	26
1.2.4	Facteurs impliqués dans la physiopathologie des conséquences cardiovasculaires du SAHOS :.....	27
1.2.4.1	Hyperactivité sympathique.....	27
1.2.4.2	Inflammation systémique : .....	28
1.2.4.2.1	Production de médiateurs proinflammatoires : .....	28
1.2.4.2.2	Expression des molécules d'adhésion :.....	32
1.2.4.3	Stress oxydatif :.....	33
1.2.4.4	Voies de signalisation intra cellulaire : .....	36
1.2.4.5	Apport des modèles expérimentaux : .....	37
1.2.4.5.1	Rôle de l'HI dans l'augmentation de la pression artérielle : .....	38
1.2.4.5.2	Rôle de l'HI dans les conséquences neurologiques : .....	39
1.2.4.5.3	Rôle de l'HI dans le métabolisme : .....	40
1.2.4.5.4	Rôle de l'HI dans l'inflammation : .....	42
1.2.4.5.5	Rôle de l'HI dans l'athérosclérose : .....	43
1.2.5	SAHOS et voies aériennes supérieures : .....	45
1.2.5.1	Physiopathologie des VAS dans le SAHOS : .....	45
1.2.5.2	Inflammation des voies aériennes supérieures : .....	46
1.2.6	SAHOS et voies aériennes sous glottiques :.....	47

<b>2</b>	<b>Hypothèse de travail :</b> .....	<b>49</b>
<b>3</b>	<b>Matériels et méthodes :</b> .....	<b>50</b>
<b>3.1</b>	<b>Choix du modèle cellulaire d’HI :</b> .....	<b>50</b>
3.1.1	Description : .....	50
3.1.2	Validation : .....	51
<b>3.2</b>	<b>Cultures cellulaires :</b> .....	<b>51</b>
<b>3.3</b>	<b>Résultats complémentaires :</b> .....	<b>53</b>
3.3.1	Immunomarquage:.....	53
3.3.2	Magnétocytométrie : .....	54
<b>4</b>	<b>Articles :</b> .....	<b>55</b>
<b>4.1</b>	<b>Article 1</b> .....	<b>55</b>
<b>4.2</b>	<b>Article 2</b> .....	<b>83</b>
<b>4.3</b>	<b>Résultats complémentaires :</b> .....	<b>106</b>
4.3.1	Immunomarquage.....	106
4.3.2	Magnétocytométrie : .....	107
<b>4.4</b>	<b>Discussion et Perspectives</b> .....	<b>108</b>
<b>PARTIE II : Travaux antérieurs</b> .....		<b>111</b>
<b>Bibliographie</b> .....		<b>121</b>
<b>Listes des Communications et Publications</b> .....		<b>148</b>

## Introduction Générale :

Ce mémoire se décompose en deux parties.

La première concerne mon activité de recherche entre 2007 et 2011 dans le cadre de la thèse d'université, réalisée dans l'équipe dirigée par J. Bourbon (2007-2009) puis dans l'équipe dirigée par D. Isabey (« Biomécanique cellulaire et respiratoire ») au sein de l'unité INSERM U951 (directeur G. Guellaen, Institut de recherche biomédicale, Mondor, Créteil).

La seconde est consacrée aux travaux antérieurs réalisés au sein de l'unité INSERM 64 entre 1989 et 1994, dirigée par le Pr R. Ardaillou, encadré par le Pr L. Baud.

Ces travaux, bien que s'inscrivant dans des cadres pathologiques en apparence très différents, sont tous fondés sur l'étude des mécanismes physiopathologiques de l'inflammation.

Les premiers ont permis de démontrer l'implication de la synthèse du TNF $\alpha$  et de la modulation de l'expression de ses récepteurs au cours de la tuberculose pulmonaire, d'étudier la régulation de son action par les dérivés réactifs de l'oxygène, les plaquettes et d'étudier son système de signalisation intra cellulaire dans les cellules épithéliales. Ces travaux sont brièvement exposés dans la deuxième partie du manuscrit.

Plus récemment, je me suis intéressée aux conséquences de l'hypoxie intermittente (HI) sur l'inflammation respiratoire, dans le cadre d'une autre pathologie particulièrement fréquente : le syndrome d'apnées/hypopnées obstructives du sommeil (SAHOS). Le SAHOS se caractérise par des épisodes récurrents de désaturations/réoxygénations. Grâce à des modèles animaux et cellulaires, l'HI a été démontrée comme étant le mécanisme prépondérant responsable de l'inflammation systémique observée au cours du SAHOS. En revanche, la réponse des cellules respiratoires résidentes à l'HI n'a pas été étudiée. Le but de



notre travail a été de rechercher et de caractériser la réponse inflammatoire des cellules épithéliales et des cellules musculaires lisses respiratoires à l'HI.

## **PARTIE I : effets biologiques de l'hypoxie intermittente :**

### **1 Introduction :**

En physiopathologie humaine, les épisodes récurrents d'hypoxie sont fréquemment observés, plus que ne le sont les épisodes d'hypoxie chronique. L'hypoxie intermittente ou épisodique est observée au cours de différentes pathologies, incluant le syndrome d'apnées/hypopnées du sommeil (SAHOS), les pathologies pulmonaires chroniques, telles que la bronchopathie chronique obstructive (BPCO), l'asthme ou la fibrose pulmonaire. Mais, si toutes engendrent une désaturation suivie d'une réoxygénation, la durée, la fréquence, la forme de ces variations diffèrent d'une pathologie à l'autre, conduisant à l'identification de plusieurs « profils » d'HI. Il s'ensuit des conséquences cardiovasculaires différentes. Ainsi, le SAHOS est impliqué dans la survenue d'une hypertension artérielle systémique (HTA), alors que la BPCO ne l'est pas et inversement pour l'hypertension artérielle pulmonaire.

Afin de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques de ces complications, plusieurs modèles expérimentaux ont été développés.

#### **1.1 Hypoxie Intermittente :**

##### **1.1.1 Profils d'HI :**

Selon Prabhakar et coll (Prabhakar, N.R. 2001), les « profils » d'HI peuvent être séparés en trois grands groupes.

1) Profil A : La durée de chaque épisode hypoxique varie généralement entre 10 et 40 sec., dépendant de la longueur des arrêts du débit aérien, s'interposant avec des périodes de

normoxie pouvant durer plusieurs minutes, ce pendant 7-8 h. Ce profil est typique de l'hypoxie intermittente rencontrée au cours du SAHOS.

2) Profil B : ce profil est observé au cours d'ascension et de descente rapides à haute altitude, ou encore chez des patients présentant des pathologies pulmonaires chroniques dont la ventilation est diminuée au cours du sommeil. Les épisodes hypoxiques sont alors plus longs, pouvant atteindre plusieurs heures.

3) Profil C : Le troisième profil correspond à celui observé au cours de respirations périodiques (respiration de Cheyne Stokes, ou de Kussmaul) survenant dans un contexte pathologique particulier.

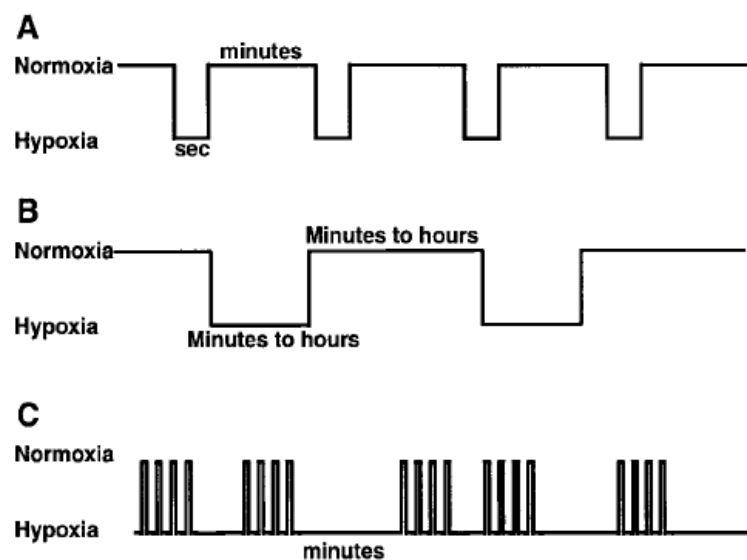


Figure 1 : Représentation schématique des 3 profils d'hypoxie intermittente, tirée de (Prabhakar, N.R. 2001)

Le profil A concerne une pathologie particulièrement fréquente, aux conséquences cardiovasculaires, cognitives et métaboliques importantes.

Il est celui qui a été le plus étudié et a donné lieu au développement de nombreux modèles expérimentaux animaux et cellulaires (Dematteis, M. 2009).

## **1.1.2 Modèles expérimentaux d'HI :**

Le modèle expérimental d'exposition à l'HI a l'avantage d'évaluer le seul effet de la désaturation en oxygène. De plus, il permet de contrôler avec précision la durée et le niveau du stimulus de l'hypoxie.

Ces modèles expérimentaux sont soit des modèles animaux, soit des modèles cellulaires.

### **1.1.2.1 Les modèles animaux :**

Depuis 1992 (Fletcher, E.C. 1992a), de nombreux modèles animaux d'HI ont été développés dans le but de mimer au mieux l'HI caractéristique du SAHOS : des cycles répétitifs courts de désaturation, suivie de réoxygénation rapide. Certains de ces modèles ont pu être utilisés pour de très longues expositions (Savransky, V. 2007b; Zhu, Y. 2007), permettant l'investigation de conséquences chroniques comme en pathologie humaine, sans les facteurs confondants. De plus, les modèles animaux ont permis l'étude de paramètres qu'il était difficile ou impossible d'obtenir chez l'homme.

#### **1.1.2.1.1 Mode d'administration :**

Dépendant des espèces, les animaux sont soit ventilés avec un masque (porcelet), ou placé dans une cage ou une chambre (rats, souris). Dans les deux cas, ils respirent de façon intermittente un air enrichi en nitrogène afin de créer une hypoxie, en alternance avec de l'oxygène ou de l'air pour la phase de réoxygénation. L'oxygène pur, utilisé notamment dans les grandes chambres hypoxiques, requiert un contrôle parfait de l'administration du gaz

afin d'éviter des FiO<sub>2</sub> dépassant 20.8%. La durée des phases hypoxiques et normoxiques, de même que la pente de la diminution et de l'augmentation de la FiO<sub>2</sub> sont conditionnés par la taille de l'enceinte, le flux de gaz et le type de mélange gazeux. Des animaux « contrôles » sont classiquement placés dans le même type d'enceinte et exposés à des flux similaires assurant des niveaux comparables de bruit et de turbulence liés à la circulation du gaz.

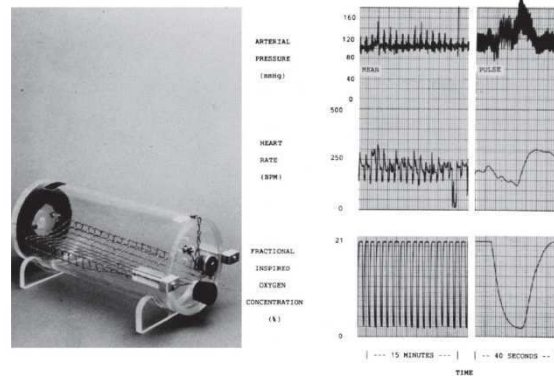


Figure 2 : de chambre utilisée par Fletcher et coll (Fletcher, E.C. 2001), permettant des cycles de 30 sec.

### 1.1.2.1.2 Caractéristiques de l'HI :

La durée de l'exposition à l'HI, la fréquence des cycles et l'importance de la chute de la désaturation varient d'une étude à l'autre, rendant d'autant plus difficile les comparaisons entre résultats.

1) concernant la durée de l'exposition et sa place au cours du nyctémère : la durée de l'exposition peut varier de 4h/j (Kalaria, R.N. 2004) à 12h/j (Klein, J.B. 2005), voir 24h sur 24h (Lin, M.T. 2003). Le plus souvent, l'HI est appliquée durant la journée. Mais, le sommeil des rongeurs est particulier. Ils présentent des alternances sommeil-éveil polyphasiques étalés sur les 24h, bien que prédominant au cours de la journée. Certains systèmes permettent d'instiller l'HI uniquement lorsque les rongeurs dorment (Hamrahi, H. 2001a; Hamrahi, H. 2001b; Tagaito, Y. 2001).

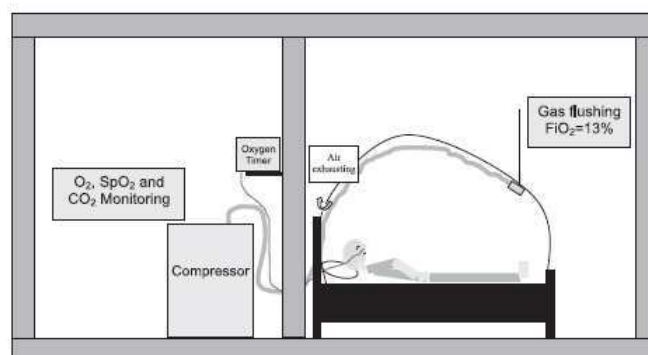
2) concernant la fréquence des désaturations et leur durée : une fréquence faible notamment lorsque de grandes chambres hypoxiques sont utilisées : 1 cycle /h (Gozal, D.

2001), 6-10 cycles/h (Braga, V.A. 2006; Klein, J.B. 2005; Zoccal, D.B. 2008), pouvant aller jusqu'à 60 cycles/min (Arnaud, C. 2011; Campen, M.J. 2005; Polotsky, V.Y. 2006) ou 120 cycles/h (Dematteis, M. 2008; Fletcher, E.C. 1992c; Julien, C. 2003).

3) concernant l'importance de la désaturation : la SpO<sub>2</sub> diminue classiquement à 60%-80% chez la souris et le rat exposés à des cycles de 30 sec. avec des diminutions très rapides de la FiO<sub>2</sub> atteignant 2-5% (Dematteis, M. 2008; Fletcher, E.C. 1992c; Julien, C. 2003; Lesske, J. 1997). On peut également observer des SpO<sub>2</sub> plus hautes, variant de 83% à 86% lorsque l'animal est soumis à des cycles plus longs et plus progressifs avec des FiO<sub>2</sub> de 6-10% (Lee, E.J. 2009; Zhan, G. 2005).

#### **1.1.2.1.3 Limites :**

Quoique ces modèles animaux aient permis d'améliorer notre compréhension des mécanismes physiopathologiques rencontrés au cours de l'HI, on ne peut éliminer le biais imputable à la différence d'espèce. Des modèles récents d'HI chez l'homme sain ont été développés. Ils permettent certes de s'absoudre de la différence d'espèce mais également des facteurs confondants tels que l'obésité, les désordres cardiovasculaires et métaboliques (Foster, G.E. 2009; Tamisier, R. 2009). Dans l'étude de Tamisier R et coll, l'utilisation de tentes d'altitude permet de créer une FiO<sub>2</sub> de 13%, responsable d'une SpO<sub>2</sub> de 82-85%. La réoxygénation est assurée par le biais d'une canule nasale délivrant 1.5-2l d'oxygène pendant 15 sec. La fréquence est de 30 cycles/sec, 8h/j pendant 4 semaines. Dans celle de Foster GE et coll, les cycles d'HI sont de 15/h, 6h/j pendant 4 jours.



**Figure 3 : exemple de tente hypoxique développée par l'équipe de Grenoble (Tamisier, R. 2009), permettant une FiO<sub>2</sub> de 13%, une SpO<sub>2</sub> au cours de l'épisode hypoxique de 85%.**

### **1.1.2.2 Modèles cellulaires d'hypoxie intermittente**

Les modèles cellulaires d'HI représentent un outil complémentaire aux modèles animaux. Ils permettent l'exploration de la réponse d'un type cellulaire précis à l'HI, voire de ces interactions avec d'autres types cellulaires. Ces modèles *in vitro* sont plus récents. La difficulté réside dans le fait de pouvoir modifier rapidement le taux en oxygène au sein d'une culture. Il est donc indispensable d'utiliser des appareils spécifiques afin d'entraîner des fluctuations de l'oxygène à une fréquence essayant de mimer le SAHOS.

#### **1.1.2.2.1 Enceinte hermétique :**

Le système le plus fréquemment utilisé est une enceinte hermétique dont on fait varier la pression partielle en oxygène.

En 2001, l'équipe de Prabahkar (Adhikary, G. 2001; Kumar, G.K. 2003) développait un modèle cellulaire d'HI utilisant une chambre de 16 litres dont l'injection du mélange gazeux était gérée par des valves solénoïdes. Celles-ci permettaient d'obtenir des cycles courts avec une exposition en alternance à 21% O<sub>2</sub> pendant 3 min., et 1% O<sub>2</sub> pendant 15 sec.. Pendant la période hypoxique, 45 sec étaient nécessaires pour que l'oxygène ambiant diminue à 1% O<sub>2</sub> et 50 sec pour remonter à 21%. Le taux d'oxygène dans le milieu de culture était de 70 mmHg en condition normoxique et 50 mmHg en condition hypoxique.

En 2005, Lattimore (Lattimore, J.D. 2005) utilisait des cycles plus longs de 30 min avec une FiO<sub>2</sub> de 2% en alternance avec une FiO<sub>2</sub> de 21%.

Parallèlement, des chambres d'incubation ont été élaborées et distribuées (BioSpherix, Redfield, NY). Celles utilisées par Gozal E et coll (Gozal, E. 2005) et Dyugovskaya L (Dyugovskaya, L. 2008) permettent de réaliser une alternance de 21% O<sub>2</sub> pendant 25 min. et 5% O<sub>2</sub> pendant 35 min. Ces cycles quoique plus longs permettent de mimer la forme de la chute du taux en oxygène observée chez les patients atteints de SAHOS.

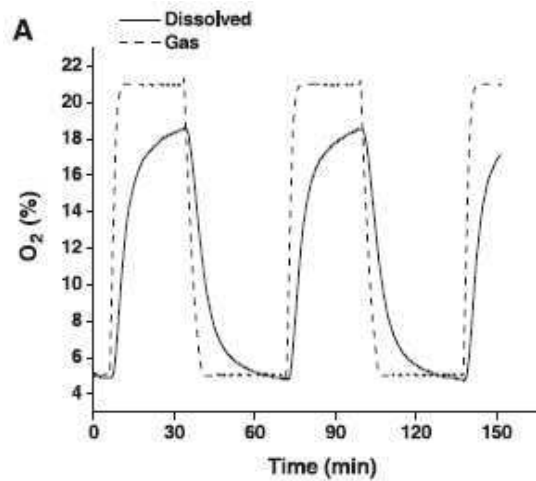


Figure 4 : Selon Gozal, et coll : évolution de la FiO<sub>2</sub> mesurée dans le mélange gazeux (ligne pointillée) et dans le milieu de culture (ligne continue) de cellules PC-12 soumises à une HI (Gozal, E. 2005).

D'autres systèmes ont également été développés :

#### **1.1.2.2.2 Système de convection forcée :**

En 2003, Baumgardner JE (Baumgardner, J.E.Otto, C.M. 2003) développait un modèle dans le but de minimiser les risques de variabilité de la convection du mélange gazeux et d'optimiser la diffusion de l'oxygène dans le milieu de culture. Pour cela, ils ont utilisé un système permettant de forcer la convection du mélange gazeux sur des cellules adhérentes à travers un tube capillaire (tube en silice 0,53 mm de diamètre et 10 cm de longueur). La réponse est de moins de 1.6 sec et la PaO<sub>2</sub> cellulaire régulée à 1 Torr près. Le flux de gaz est de 8ml/min. Ce système a quelques limites : réservé à des cellules adhérentes, des cultures n'excédant pas 24 heures, un nombre de cellules limité à 10<sup>6</sup>.

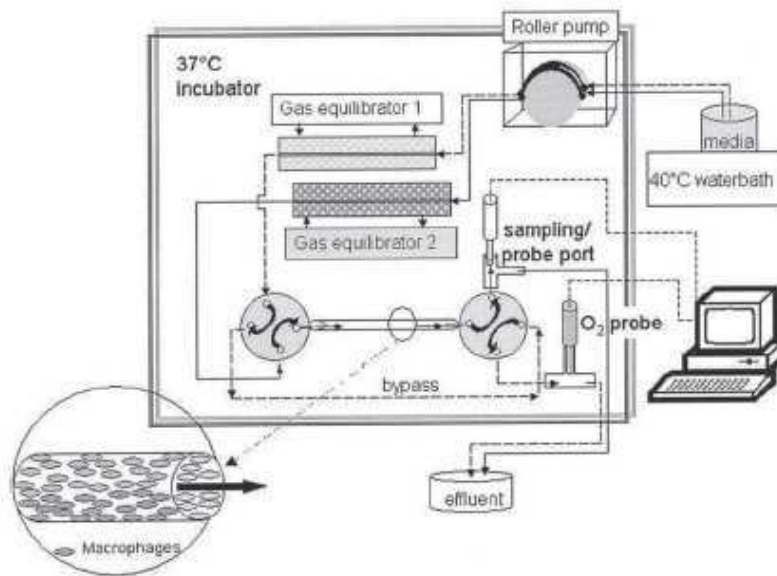


Figure 5 : Selon Baumgardner JE et coll : schéma du système de convection forcée du mélange gazeux à travers un tube capillaire (Baumgardner, J.E.Otto, C.M. 2003).

### **1.1.2.2.3 Milieu hypoxique préconditionné :**

Ryan S et coll (Ryan, S. 2005) ont utilisé du milieu hypoxique préconditionné sur des cellules HeLa afin de s'assurer d'une modification de la PO<sub>2</sub> intracellulaire la plus rapide possible. Ces cellules étaient ensuite incubées dans une chambre à hypoxie contenant 1% O<sub>2</sub> pendant 5 min puis le milieu changé et les cellules laissées en normoxie pendant 10 min. Ceci entraînait des fluctuations cycliques des valeurs de la PO<sub>2</sub> comprises entre 100 mmHg et 3.6 mmHg.



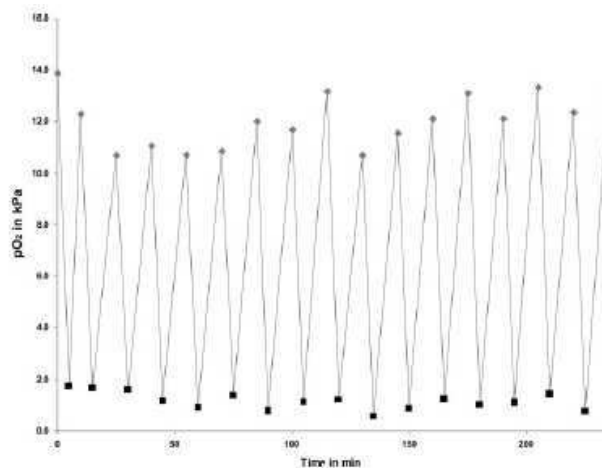


Figure 6 :Selon Ryan et coll : mesure de la PaO<sub>2</sub> cellulaire par oxymétrie à fluorescence (fluorescence quenching oxymetry) (Ryan, S. 2005)

On peut objecter à ce modèle que les changements de milieu peuvent générer du « shear stress » (forces de cisaillement), capables d’interférer avec les effets propres de l’HI. De plus, les dosages de facteurs sécrétés dans le milieu de culture sont impossibles.

#### 1.1.2.2.4 Alternative à l’enceinte hermétique :

Récemment, Polotsky VY et coll (Polotsky, V.Y. 2010) ont développé un autre modèle d’HI. Les cellules sont cultivées dans des flasques T75 puis placées dans un bain marie, permettant de maintenir la température à 37°C. Le milieu de culture est « bullé » pendant 5 min. avec un mélange gazeux à une FiO<sub>2</sub> de 0% puis 5 min. à une FiO<sub>2</sub> de 16%, à raison de 6cycles/h pendant 8 heures.

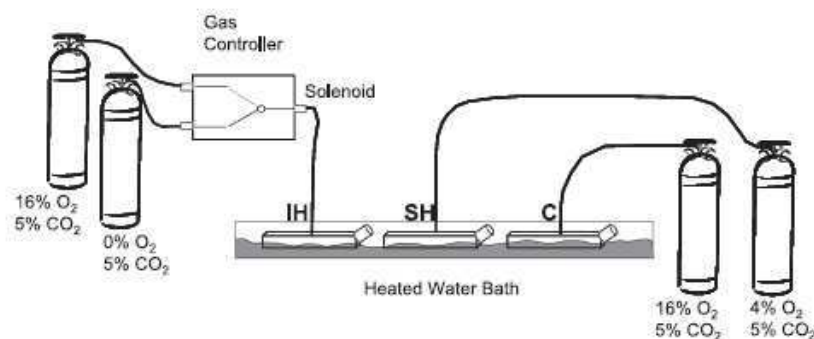
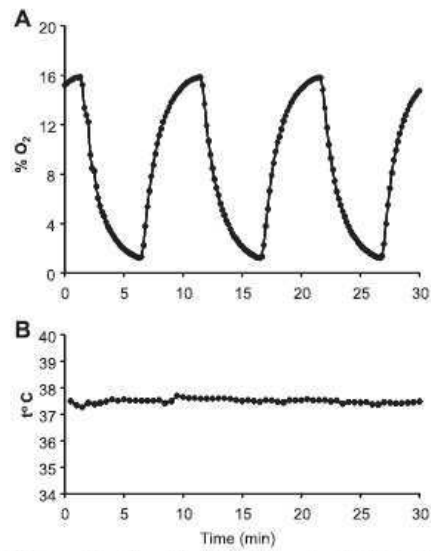


Figure 7 : Selon Polotsky et coll : représentation schématique du modèle d’HI (Ryan, S. 2005)



**Figure 8 : Selon Polotsky et coll : profil de l'évolution de la  $FiO_2$  et de la température des cellules endothéliales aortiques humaines soumises à une HI, réalisant 6cycles/heure (Ryan, S. 2005).**

Ce modèle pose d'une part la question du maintien de la stérilité, avec le biais possible d'une contamination par les lipopolysaccharides bactériens (LPS), et, d'autre part, d'un stimulus biomécanique lié au gazage du milieu de culture.

Aucun modèle d'HI cellulaire n'est parfait, compromis entre fréquence du cyclage, forme de la désaturation, et besoin en matériel en fonction des paramètres étudiés.

## 1.2 Le syndrome d'apnées du sommeil :

Le SAHOS est la pathologie où l'exposition à l'HI est la plus flagrante, caractérisée par la survenue d'apnées et/ou d'hypopnées (cf définition ci-dessous).

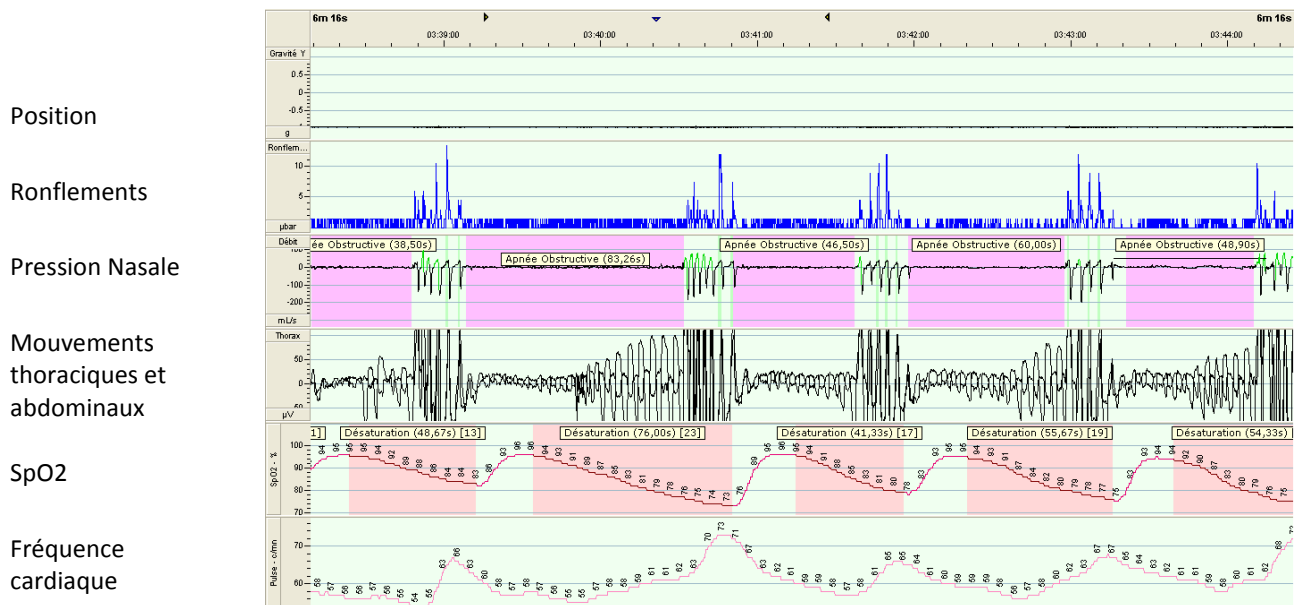


Figure 9 : exemple de tracé polygraphique montrant une succession d'apnées obstructives. Ces apnées (pouvant atteindre jusque 83 sec.) s'accompagnent d'une désaturation cyclique importante (SpO2minimale de 73%) (données personnelles)

### 1.2.1 Définition :

Le syndrome d'apnées du sommeil de type obstructif est dû à la survenue au cours du sommeil d'un collapsus des voies aériennes supérieures conduisant à une diminution (hypopnées) ou une interruption du débit aérien (apnées). Beaucoup d'hésitations dans la définition du SAHOS, et surtout du seuil pathologique, ont rendu d'autant plus difficiles les

comparaisons entre les différentes études publiées sur le sujet. Il se définit aujourd'hui par la présence d'une somnolence diurne excessive ou deux symptômes évocateurs (ronflements, sensations d'étouffement, éveils répétés, sommeil non réparateur, asthénie, difficultés de concentration, nycturie), associé à un index d'apnées/hypopnées ou des éveils en rapport avec des efforts respiratoires, supérieur ou égal à 5 par heure selon les recommandations de l'American Academy of Sleep Medicine Task Force (AASM 1999).

Le syndrome d'apnées du sommeil a récemment fait l'objet de recommandations françaises (Gagnadoux, F. 2010). Ce travail, résultat de la concertation de physiologistes, pneumologues, cardiologues, ORL.. témoigne du besoin de multidisciplinarité pour la prise en charge de cette pathologie.

Si, à posteriori, en relisant la littérature classique, il semble évident que certains personnages antiques présentaient la pathologie, si la description de Joe, the « fat boy » par Charles Dickens dans « the posthumous Papers of the Pickwick Club » (Dickens, C. 1837) est d'une réalité des plus pertinentes, il est important de noter que l'authentification médicale de ce syndrome n'est que très récente.

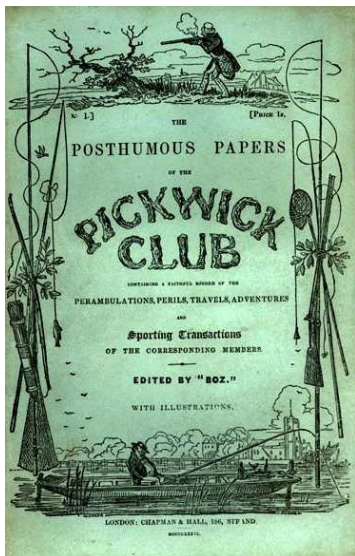


Figure 10 : « the posthumous Papers of the Pickwick Club », publiée en 1836 : couverture originale et portaits des différent protagonistes du "Pickwick club" dont le « fat boy ».

En 1956, le Dr C.S. Burwell décrit pour la première fois le “syndrome pickwickien “, en référence à « Joe », associant obésité, cyanose, polyglobulie, hypoventilation alvéolaire et insuffisance cardiaque (Bickelmann, A.G. 1956). Mais ce n’est qu’à partir de 1965, que le Dr H. Gastaut explore le sommeil de ces Pickwickiens, permettant ainsi de relier leurs symptômes à l’existence d’arrêts respiratoires (Gastaut, H. 1965).

Le syndrome d’apnées du sommeil ne fut individualisé en tant que pathologie propre et indépendante que 10 ans plus tard (Guilleminault, C. 1973). La maladie de Pickwick étant aujourd’hui considérée comme une forme clinique sévère et rare d’une maladie cliniquement polymorphe et beaucoup plus fréquente.

En effet, la prévalence du SAHOS est élevée. L’étude de Terry Young, publiée en 1993, au sein d’une population d’employés de plusieurs administrations de l’état du Wisconsin conclut à une prévalence de 4% chez les hommes et 2% chez les femmes (Young, T. 1993). Des études plus récentes retrouvent une prévalence comparable au sein d’une population européenne.

Dans ces études épidémiologiques, l’obésité est le facteur prédictif le plus puissant (Young, T. 2002). En dehors de l’obésité, l’existence d’une anomalie anatomique cervico-faciale responsable d’un rétrécissement oropharyngé, le sexe masculin et l’âge sont les facteurs de risque les plus clairement identifiés de la survenue du SAHOS.

### **1.2.2 Diagnostic et prise en charge :**

Le diagnostic de SAHOS repose sur la confrontation de signes cliniques non spécifiques, fréquents en population générale, et d’enregistrements polygraphiques. Ces derniers permettent de quantifier les anomalies respiratoires (nombre, longueur, durée), de préciser leur condition de survenue (position, stades de sommeil), de comprendre leur mécanisme (obstructif ou central) et d’analyser leur répercussion immédiate (fragmentation du sommeil, désaturation, modification de la fréquence cardiaque).

La sévérité du SAHOS prend en compte 2 composantes :

– l’IAH (5<léger<15, 15<modéré<30, sévère > 30/h).

– l'importance de la somnolence diurne après exclusion d'une autre cause de somnolence.

La prise en charge du SAHOS nécessite, dans un premier temps, de rechercher tous les facteurs impliqués dans la survenue ou l'aggravation de troubles respiratoires nocturnes.

Elle comporte une prise en charge médicale cherchant à corriger un excès pondéral, fréquemment rencontré chez les patients SAHOS (Nieto, F.J. 2000; Young, T. 2002), à rechercher une prise excessive d'alcool (Tanigawa, T. 2004) ou de sédatifs, benzodiazépines ou morphiniques (Wang, D.Teichtahl, H. 2007).

Le traitement instrumental repose sur le traitement par ventilation en pression positive continue (PPC) (Sullivan, C.E. 1981). Elle consiste en l'application d'une PPC de 4 à 20 cmH<sub>2</sub>O au niveau des VAS par l'intermédiaire d'un masque. Elle permet ainsi, grâce à un effet « d'attelle pneumatique », d'éviter le collapsus de l'oropharynx.

Un autre traitement instrumental à notre disposition est l'orthèse d'avancée mandibulaire dont le mode de fonctionnement consiste à dégager le carrefour oropharyngé en propulsant la mandibule.

### **1.2.3 Conséquences liées au SAHOS :**

Le SAHOS est associé à une augmentation du risque de mortalité de toute cause (Marin, J.M. 2005). Il est important de noter que ce risque accru est associée de façon indépendante à l'hypoxie intermittente générée par le SAHOS, et non la fragmentation du sommeil (Punjabi, N.M. 2009). Ces conséquences peuvent être séparées en conséquences non cardio vasculaires et cardiovasculaires.

#### **1.2.3.1 Conséquences non cardiovasculaires :**

##### **Somnolence diurne, dépression et troubles cognitifs :**

Le SAHOS est responsable à la fois d'une déstructuration et d'une fragmentation du sommeil. En effet, la reprise ventilatoire s'accompagne d'un éveil qui peut atteindre plusieurs niveaux d'activation : de l'éveil autonome (augmentation de l'activité sympathique), à l'éveil cortical (simple micro éveil avec allègement en ondes lentes ou décharges brutales et transitoires d'activité alpha, ou éveil comportemental).

Cliniquement, il s'ensuit une somnolence diurne excessive responsable d'un risque accru d'accident (Masa, J.F. 2000; Young, T. 1997), de troubles de l'humeur (Saunamaki, T.Jehkonen, M. 2007a) et de troubles cognitifs (Saunamaki, T.Jehkonen, M. 2007b).

Les troubles cognitifs dans le SAHOS sont non spécifiques. Les troubles de la mémoire et attentionnels seraient dus aux altérations de la vigilance, tandis que les troubles des fonctions exécutives et de la dextérité manuelle seraient corrélés avec l'intensité de l'hypoxie nocturne (Greenberg, G.D. 1987), et améliorés sous PPC (Aloia, M.S. 2004).

### **1.2.3.2 Conséquences cardiovasculaires :**

La reconnaissance du SAHOS en tant que facteur de risque cardiovasculaire a été difficile à établir car elle s'est heurtée à l'existence de nombreux facteurs confondants tels que l'obésité, l'hypertension, le tabagisme, la prise d'alcool, l'âge... (Kiely, J.L.McNicholas, W.T. 2000). Elle fut longtemps décriée (Wright, J.Sheldon, T. 1998) en raison notamment de l'absence d'études « d'envergure ». Depuis, des études cliniques à large échelle, transversales et longitudinales ont permis de conclure à l'existence d'une modeste mais indéniable association indépendante entre SAHOS et pathologies cardiovasculaires.

#### **1.2.3.2.1 HTA :**

La prévalence de l'hypertension artérielle (HTA) est beaucoup plus élevée chez les patients porteurs d'un SAHOS que dans la population générale (50% vs. 20%). Réciproquement, la prévalence du SAHOS parmi les patients hypertendus est plus importante que dans la population générale (40% vs.17%). Mais, les facteurs confondants sont nombreux. De grandes études épidémiologiques (Bixler, E.O. 2000; Grote, L. 1999; Lavie, P. 2000; Nieto, F.J. 2000) ont permis de conclure toutes à la persistance d'une association significative entre l'existence d'un SAHOS et une HTA après prise en compte des autres facteurs de risque cardiovasculaires. Une étude prospective réalisée dans l'état du Wisconsin (Peppard, P.E. 2000) montre que le risque de développer une HTA chez des patients dont l'IAH est supérieur ou égal à 15 est multiplié par 3 comparativement à des sujets indemnes de SAHOS.

De plus, plusieurs études ont montré une diminution des pressions artérielles systolique et diastolique, tant nocturnes que diurnes sous traitement par PPC constante. La méta-analyse de Haentjens et coll, ayant inclus 12 études randomisées, a mis en évidence une réduction moyenne de 1,69 mmHg de la pression artérielle moyenne des 24h. Cette réduction est d'autant plus importante que l'IAH est sévère et que l'observance au traitement est élevée (>4heures/j) (Haentjens, P. 2007).

#### **1.2.3.2.2 Cardiopathies ischémiques :**

La prévalence du SAHOS au sein d'une cohorte d'insuffisants coronariens est élevée, près de 30% (Schafer, H. 1999). Mais, si le risque relatif de développer une maladie coronarienne semble modeste (Shahar, E. 2001), plusieurs études prospectives (Moore, T. 2001; Peker, Y. 2000) suggèrent que l'association d'un SAHOS à la maladie coronarienne aggrave son pronostic. Plus récemment, Sorajja et coll (Sorajja, D. 2008) ont montré que le SAHOS était indépendamment associé à la présence de calcifications coronariennes dans une population indemne de signes clinique ischémique. Ce risque augmentait avec la sévérité du SAHOS. Gami et coll (Gami, A.S. 2007) ont montré qu'il existait une association entre SAHOS et histoire familiale de décès prématuré d'origine cardiaque, indépendamment du sexe, de l'âge, de l'IMC et des antécédents personnels de pathologie cardiovasculaire. Sous PPC, la prévalence de la récurrence de la maladie coronarienne diminue (Milleron, O. 2004). Cependant, nous ne disposons pas d'étude randomisée étudiant l'effet de la PPC sur le développement d'une pathologie coronarienne, le risque d'infarctus ou de mort subite.

#### **1.2.3.2.3 Accident vasculaire cérébral :**

Le SAHOS est très fréquent chez les patients ayant présenté un accident vasculaire cérébral (AVC) ou un accident ischémique transitoire (AIT). Une méta analyse publiée en 2010 (Johnson, K.G.Johnson, D.C. 2010), concluait à une prévalence de 72% pour un IAH>5 et de 38% pour un IAH >20. S. Redline et coll ont étudié l'incidence des AVC ischémiques au sein de la cohorte de la Sleep Heart Health Study : 5422 patients suivis sur 8,7 ans. Il y apparaissait que le risque relatif de développer un AVC était de 2.86 pour un IAH>19 chez les hommes (Redline, S. 2010). Chez les femmes, un risque significatif n'était observé que



lorsque l'IAH était supérieur à 25. De plus, le SAHOS semble être un facteur prédictif indépendant de mauvais résultat fonctionnel et de taux de mortalité plus élevé à un an.

#### **1.2.3.2.4 Métabolisme :**

De nombreuses études ont explorées les dysfonctions métaboliques observées au cours du SAHOS, incluant anomalies glucidiques, et lipidiques.

#### **Métabolisme glucidique :**

30% des patients apnéïques présentent un diabète de type II (Meslier, N. 2003). Réciproquement, la prévalence du SAHOS au sein d'une cohorte de diabétiques de type II peu contrôlés est également élevée : 29% pour un IAH>15/h (Laaban, J.P. 2009). Plusieurs études cas-contrôles ont confirmé l'association entre SAHOS et anomalies du métabolisme glucidique (Botros, N. 2009; Ip, M.S. 2002; McArdle, N. 2007; Punjabi, N.M.Beamer, B.A. 2009; Punjabi, N.M. 2002). Parallèlement à l'IAH, la profondeur des désaturations nocturnes constitue un paramètre indépendant de cette association (Ip, M.S. 2002; Punjabi, N.M.Beamer, B.A. 2009; Punjabi, N.M. 2004; Punjabi, N.M. 2002). Certes, l'obésité est majoritairement déterminante (Ip, M.S. 2002) mais il a été montré que l'association SAHOS-insulinorésistance était conservée au sein d'une population non en surpoids (Punjabi, N.M. 2003) et que, même chez des patients sévèrement obèses, l'insulinorésistance restait associée à la sévérité de l'hypoxie nocturne (Polotsky, V.Y. 2009). En revanche, si l'association SAHOS-dysfonction glucidique et le rôle de l'hypoxie semblent acquises, l'implication du SAHOS dans l'apparition d'un diabète semble moins évidente (Botros, N. 2009; Reichmuth, K.J. 2005).

L'impact du traitement par PPC sur le métabolisme glucidique est plus controversé (Punjabi, N.M.Polotsky, V.Y. 2005). Si de récentes études (Babu, A.R. 2005; Dawson, A. 2008; Harsch, I.A. 2004a) ont montré un effet positif de la PPC, l'absence de groupe contrôle ne permet pas d'éliminer un possible biais. Lam et coll (Lam, J.C. 2010), dans une étude randomisée, ont montré que la PPC améliorait l'insulino sensibilité, mais celle-ci ne persistait à moyen terme que pour les patients les moins obèses.

Les mécanismes impliqués dans l'association SAHOS-dysfonction glucidique sont multiples

associant 1) la fragmentation du sommeil (Tasali, E. 2008) responsable d'une augmentation de l'activité sympathique, d'une perturbation de la sécrétion de l'hormone de croissance (GH), et du cortisol (Vgontzas, A.N. 2007), 2) la diminution du temps de sommeil (Van Cauter, E. 2008) et 3) l'hypoxie intermittente.

### **Métabolisme lipidique :**

En clinique, l'implication du SAHOS dans l'existence d'une dyslipidémie n'est pas prouvée. Quelques études interventionnelles ont montré une diminution du cholestérol total (Robinson, G.V. 2004) et du LDL-cholestérol (Steiroopoulos, P. 2007) sous PPC.

### **La stéatohépatite non alcoolique :**

La stéatohépatite non alcoolique ou syndrome NASH (Non Alcoholic Steatosis Hepatitis) est caractérisée par une accumulation de triglycérides dans les hépatocytes, et est susceptible d'évoluer vers la cirrhose. Cette accumulation serait due dans un premier temps à l'insulinorésistance responsable d'une accumulation des triglycérides dans les hépatocytes puis à la production mitochondriale de DRO capables d'induire la peroxydation lipidique des membranes hépatocytaires et l'évolution vers la stéatopathie et la fibrose. Une étude prospective a permis de montrer que l'existence d'un SAHOS sévère constituait un facteur de risque d'élévation des transaminases et de stéato hépatite, indépendamment de l'obésité (Tanne, F. 2005). Le traitement par PPC serait associé à une baisse des transaminases maintenue à 1 mois et 6 mois (Chin, K. 2003). Très récemment, au sein d'une cohorte de sujets obèses, il a été montré que l'IAH et l'index de désaturation étaient des facteurs indépendants de fibrose hépatique (Aron-Wisnewsky, J. 2011), après ajustement pour l'âge, l'obésité et l'insulino résistance.

### **1.2.3.2.5 Phénomènes pro-thrombotiques :**

Deux revues se sont intéressées aux altérations pro-thrombotiques rencontrées au cours du SAHOS (Eisensehr, I.Noachtar, S. 2001; von Kanel, R.Dimsdale, J.E. 2003). Elles concluent toutes deux à un état d'hypercoagulabilité chez les patients SAHOS mais, très souvent, les

études sont réalisées sur de petites cohortes, au sein desquelles il est difficile de contrôler tous les facteurs confondants.

Il semble cependant acquis que le SAHOS soit responsable : 1) d'une activation plaquettaire, réversible sous pression positive continue, 2) de taux élevés de fibrinogène ; taux qui, là encore, diminuent sous ventilation, 3) de taux élevés d'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI-1) responsables d'une diminution de l'activité fibrinolytique chez les SAHOS comparé à des sujets contrôles.

#### **1.2.3.2.6 Dysfonction endothéliale :**

Le tonus vasculaire est dû à un équilibre entre des agents vasodilatateurs, au premier rang le monoxyde d'azote (NO), et des vasoconstricteurs, en particulier l'angiotensine II, l'endothéline et les dérivés réactifs de l'oxygène. La résultante de cet équilibre module les résistances vasculaires et le phénotype endothélial.

Il a été montré que des patients présentant un SAHOS, mais dépourvus d'autre facteur de risque vasculaire, ont une diminution de la réponse vasodilatatrice des vaisseaux de résistance de l'avant-bras après injection d'acétylcholine (Kato, M. 2000). Cette anomalie n'apparaissait pas chez des sujets soigneusement appariés mais ne souffrant pas de SAHOS. Kraiczi et coll ont rapporté une réponse vasoconstrictive exagérée à l'angiotensine II (Kraiczi, H. 2000) et Duchna et coll ont observé une diminution de la dilatation induite par la bradykinine (celle-ci dépend pour partie de la production endothéliale de NO) (Duchna, H.W. 2000).

Certes, cette vasoconstriction induite n'est pas imputable en totalité à l'augmentation de l'activité sympathique, observée chez les patients porteurs d'un SAHOS. Par le biais de l'hypoxie, le gène de l'endothéline, vasoconstricteur puissant, est transcrit dans l'endothélium. Chez les patients non traités, des apnées nocturnes répétées pendant 4 à 5 heures s'accompagnent d'une élévation marquée de l'endothélinémie et de la pression artérielle. Le traitement du SAHOS lors des 4 heures suivantes réduit la pression artérielle et l'endothélinémie (Phillips, B.G. 1999). Même si une élévation de l'endothélinémie n'a pas

toujours été confirmée (Pepperell, J.C. 2002), cela ne réfute pas le rôle physiopathologique de ce peptide dont l'action est avant tout locale, juxtacrine et paracrine.

Enfin, des travaux récents ont mis en évidence une participation de la leptine dans la régulation de la pression artérielle. Cette hormone peptidique produite principalement par les adipocytes, a été montrée initialement impliquée dans les mécanismes de satiété. Des récepteurs OB-db pour la leptine ont été mis en évidence à la surface des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses (CML). L'effet vasculaire de la leptine est complexe. La leptine stimule la NO synthase endothéliale mais également, à forte dose, la synthèse de l'endothéline. D'autre part, la leptine limite le pic de mobilisation du calcium intracellulaire induit par l'angiotensine II dans les CML ainsi que la contraction de ces cellules. Cet effet antivasoconstricteur de la leptine nécessite un endothélium intact chez le rat et est perdu chez le rat obèse. Dans ce cas, la leptine stimule la synthèse d'endothéline et donc exerce un effet opposé à la situation normale. La stimulation des récepteurs OB-db endothéliaux génère également des radicaux libres oxygénés et la surexpression de la molécule d'adhérence MCP-1. Il a été montré que le taux plasmatique de leptine est plus élevée chez des patients obèses et apnéiques que chez des sujets obèses non-apnéiques (Phillips, B.G. 2000). Le traitement par PPC diminue le taux de leptine circulante (Shimizu, K. 2002).

#### **1.2.3.2.7 Athérosclérose :**

Plusieurs études cliniques ont montré que le SAHOS représentait un risque de progression de l'athérosclérose (Levy, P. 2009). Toutes ont utilisées la mesure de l'épaissement de l'intima-média (EIM) de l'artère carotide, connue pour sa valeur diagnostique pour l'athérosclérose et pronostique pour les complications cardiovasculaires. Silvestrini et coll ont montré pour la première fois, dans une petite cohorte, qu'il existait un EIM supérieur dans le groupe SAHOS sévère comparé à un groupe contrôle de ronfleurs d'âge, d'IMC et de facteurs cardiovasculaire équivalent (Silvestrini, M. 2002). Kaynak et coll ont montré que l'IAH était le meilleur facteur prédictif de l'existence de plaques athéromateuses mais le groupe contrôle n'était pas tout à fait comparable concernant les facteurs de comorbidités cardiovasculaires (Kaynak, D. 2003). En 2005, plusieurs études sont venues corroborer ces

premiers résultats. De plus, elles ont montré que la sévérité de l'hypoxie était un facteur prédictif de l'épaisseur des plaques, que ce soit la SpO2 moyenne minimale nocturne (Baguet, J.P. 2005; Drager, L.F. 2005), ou la durée de l'hypoxie (Minoguchi, K. 2005; Schulz, R. 2005).

Plus récemment, des études se sont intéressées à des sous groupes de patients non indemnes de comorbidités cardiovasculaires. Turmel et coll ont montré que , sur une petite cohorte de patients présentant des lésions coronaires stables, l'IAH était corrélé au volume des plaques athéromateuses coronariennes (Turmel, J. 2009), Drager et coll ont montré que chez des patients ayant un syndrome métabolique, l'IAH était corrélé à l'EIM, la vitesse de l'onde poul, et le diamètre carotidien.

Enfin, Drager et coll (Drager, L.F. 2007) ont regardé l'effet d'un traitement par PPC pendant 4 mois chez 12 patients porteurs d'un SAHOS comparés à un groupe contrôle de SAHOS non traité. La PPC permettait de diminuer l'EIM et la vitesse de l'onde poul.

#### **1.2.4 Facteurs impliqués dans la physiopathologie des conséquences cardiovasculaires du SAHOS :**

Les facteurs impliqués dans la genèse des conséquences cardiovasculaires du SAHOS associent divers mécanismes incluant l'activation sympathique, l'inflammation systémique, et le stress oxydatif (Garvey, J.F. 2009).

##### **1.2.4.1 Hyperactivité sympathique**

Les réponses autonomiques et hémodynamiques du SAHOS sont complexes et incluent les effets de l'hypoxie, de l'hypercapnie, des éveils, et des efforts respiratoires.

L'élévation chronique du tonus adrénergique chez les patients SAHOS a été démontrée par microneurographie (Somers, V.K. 1995) et l'augmentation de la concentration des catécholamines plasmatiques et urinaires (Carlson, J.T. 1993; Fletcher, E.C. 1987; Marrone, O. 1993) dont les taux circulants sont diminués par la PPC (Suzuki, M. 1993).

L'activation des chémorécepteurs périphériques semble être préférentielle à celle des chémorécepteurs centraux (Narkiewicz, K. 1998). Elle porte à la fois sur la réponse sympathique mais également sur le tonus vagal à destinée cardiaque (Narkiewicz, K. 1999).

Plusieurs études ont montré une réduction du baroréflexe chez des patients SAHOS en utilisant l'analyse simultanée de la fluctuation de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque (méthode séquentielle) (Baguet, J.P. 2008; Bonsignore, M.R. 2002; Carlson, J.T. 1996). Celui-ci semble augmenter sous PPC (Belozeroff, V. 2002; Bonsignore, M.R. 2002).

Par ailleurs, l'activité sympathique est un puissant stimulant de la rénine et, par suite, de la génération d'angiotensine II. Les résultats concernant l'implication du système rénine-angiotensine chez les patients SAHOS sont contradictoires. Il a été rapporté une augmentation des taux d'angiotensine II plasmatique (Moller, D.S. 2003; Takahashi, S. 2005). Mais, ceci n'a pas été confirmé dans des études plus récentes (Benjamin, J.A. 2008).

#### **1.2.4.2 Inflammation systémique :**

L'inflammation systémique est caractérisée par des taux augmentés de médiateurs tels que la C-Reactive Protein (CRP), certaines cytokines (leptine, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL6, IL-8), les dérivés réactifs de l'oxygène (DRO) et certaines molécules d'adhésion. Elle est connue pour être un élément capital dans le développement de l'athérosclérose en jouant à la fois un rôle déclenchant et aggravant (Libby, P. 2002) (Willerson, J.T. Ridker, P.M. 2004).

Une inflammation systémique a été largement recherchée chez les patients SAHOS depuis de nombreuses années et a donné lieu à la publication de nombreux travaux.

##### **1.2.4.2.1 Production de médiateurs proinflammatoires :**

###### **1.2.4.2.1.1 CRP :**

La CRP est une protéine produite principalement dans le foie en réponse à l'IL-6. Elle favorise l'expression de molécules d'adhésion tant au niveau des leucocytes que des cellules endothéliales et de MCP-1 (Pasceri, V. 2001). Longtemps considérée comme un facteur prédictif indépendant d'événements cardiovasculaires que se soit au sein d'un groupe de

sujets sains (Koenig, W. 1999) ou présentant des antécédents cardiovasculaires (Haverkate, F. 1997), son rôle a été récemment remis en cause (Cao, J.J. 2007; Khera, A. 2006).

Des résultats discordants ont été publiés sur la relation CRP et SAHOS. Une première étude a montré qu'il existait une corrélation entre taux de CRP et sévérité du SAHOS (Shamsuzzaman, A.S. 2002). D'autres sont venues conforter ces premiers résultats (Yokoe, T. 2003) (Hayashi, M. 2006; Kokturk, O. 2005). Mais toutes connaissent un certain nombre de limites : groupe non apparié pour l'IMC, et antécédents cardiovasculaires. Des études plus récentes ont suggéré que l'obésité plus que le SAHOS *per se* était responsable de l'élévation de la CRP (Barcelo, A. 2004; Guilleminault, C. 2004; Ryan, S. 2007; Taheri, S. 2007). De même, l'impact de la PPC sur le taux de CRP n'est pas univoque : négatif pour Akashiba T et coll (Akashiba, T. 2005), positif pour Steiropoulos P (Steiropoulos, P. 2007).

#### **1.2.4.2.1.2 Cytokines proinflammatoires :**

**TNF $\alpha$**  : Le TNF $\alpha$  est une cytokine pro inflammatoire synthétisée par de nombreuses cellules, principalement les monocytes/macrophages et les adipocytes. Un exposé plus détaillé concernant sa structure et sa biologie est disponible dans la deuxième partie du manuscrit (Partie II). Il est notamment impliqué dans l'initiation et la progression des pathologies cardiovasculaires (Ridker, P.M. 2000). Ses taux circulants sont corrélés avec les signes d'athérosclérose (Skoog, T. 2002) dont il promeut le développement en induisant l'expression de molécules d'adhésion responsables de l'adhésion des leucocytes à l'endothélium vasculaire, de DRO et de cytokines via le facteur de transcription NF- $\kappa$ B. Parallèlement à son rôle inflammatoire, le TNF $\alpha$  est impliqué dans la somnolence accompagnant le SAHOS (Vgontzas, A.N. 2000).

Le premier article (Vgontzas, A.N. 1997) montrant une augmentation du TNF $\alpha$  chez des patients apnéiques, comparés à une population contrôle, parut en 1997, confirmé 3 ans plus tard dans une étude contrôlée pour l'obésité (Vgontzas, A.N. 2000). Depuis, ces résultats ont été corroborés par d'autres équipes (Ciftci, T.U. 2004; Constantinidis, J. 2008; Kanbay, A. 2008; Minoguchi, K. 2004; Ryan, S. 2006), l'index de désaturation apparaissant comme le

plus puissant facteur prédictif du taux de TNF $\alpha$  chez les patients SAHOS (Ryan, S. 2006). Mais, d'importantes différences pouvaient exister entre les patients et le groupe contrôle (Alberti, A. 2003; Kanbay, A. 2008; Li, Y. 2008). Ces résultats ont été récemment remis en cause (Carneiro, G. 2009) après ajustement pour le poids et le sexe. Après traitement, là encore les résultats sont discordants (Kohler, M. 2009; Li, Y. 2008).

De façon plus intéressante, ces études ont été complétées par l'exploration de la capacité de certaines cellules circulantes à synthétiser du TNF $\alpha$ . Ainsi, Dyugovskaya et coll ont montré que les lymphocytes T  $\gamma\delta$  de patients SAHOS avaient des taux intra cellulaires de TNF $\alpha$  plus élevés que des sujets contrôles (Dyugovskaya, L. 2003, 2005b). K. Minoguchi et coll ont mesuré la production spontanée de TNF $\alpha$  par des monocytes de patients apnéiques (Minoguchi, K. 2004). Cette production était significativement supérieure à la valeur obtenue chez des sujets obèses et des sujets sains. De plus, ces valeurs diminuaient après 1 mois de traitement par PPC.

**IL-6 :** L'IL-6 est également prédictif d'événements cardiovasculaires et est exprimé au sein des lésions d'athérosclérose (Luc, G. 2003). Des études préliminaires ont montré des taux d'IL-6 augmentés chez les patients présentant un SAHOS (Ciftci, T.U. 2004; Vgontzas, A.N. 1997; Yokoe, T. 2003). A contrario, Vgontzas et coll n'ont pas montré de différence entre un groupe de patient présentant un SAHOS et un groupe bien apparié notamment pour l'obésité. Le traitement par PPC ne modifiait pas les taux d'IL-6 (Vgontzas, A.N. 2008). A l'instar de la CRP, l'augmentation de l'IL-6 semble plus corrélée à l'IMC qu'à la présence d'un SAHOS.

Cependant, il est intéressant de noter qu'il existe une association indépendante entre la sévérité du SAHOS et le récepteur soluble de l'IL-6 (sIL-6R) (Mehra, R. 2006). Ce dernier est responsable de la formation d'un complexe IL-6–sIL-6R permettant sa liaison avec la glycoprotéine 130, récepteur membranaire potentialisant l'activité de l'IL-6.

**IL-8 :** L'IL-8 appartient à la familles des chémokines, chémoattracteur et activateur puissant des neutrophiles et des monocytes. Chez des patients sains, des taux élevés d'IL-8 sont considérés comme prédictifs d'événements cardiaque futurs, indépendamment des facteurs de risques cardiovasculaires traditionnels (Boekholdt, S.M. 2004). Des augmentations de la



concentration en IL-8 ont été rapportées chez les patients SAHOS (Alzoghaibi, M.A.Bahammam, A.S. 2005; Ohga, E. 2003; Ryan, S. 2006). Ces taux d'IL-8 seraient dépendants de la sévérité du SAHOS et diminués par la PPC (Ohga, E. 2003).

**IL-18 :** L'IL-18 est une cytokine pro inflammatoire associée au développement de l'athérosclérose et la rupture de plaques athéromatueuses (Elhage, R. 2003). Des taux élevés d'IL-18 ont été retrouvés chez des patients SAHOS comparés à des contrôles, ce d'autant plus que le SAHOS est sévère. De plus, les taux d'IL-18 seraient corrélés avec l'EIM et seraient diminués par 90 jours de PPC (Li, C. 2009).

#### **1.2.4.2.1.3 Cytokines/adipokines anti inflammatoires :**

L'effet du SAHOS sur l'expression de médiateurs impliqués dans le rétrocontrôle de la réponse inflammatoire est également décrit.

Ainsi, l'IL-10 produit par les lymphocytes et les monocytes/macrophages est connu pour ses actions anti inflammatoires et ses propriétés anti athérogènes (Caligiuri, G. 2003). Une étude a montré une faible diminution des taux d'IL-10 chez des patients SAHOS, le dosage étant réalisé au cours d'une polysomnographie, après la première apnée ayant entraîné une chute de la SpO<sub>2</sub> au-dessous de 85% (Alberti, A. 2003). Dyugovskaya et coll ont trouvé un taux intracellulaire d'IL-10 diminué dans des lymphocytes T  $\gamma\delta$  de patients SAHOS (Dyugovskaya, L. 2003).

#### **Adiponectine :**

L'adiponectine est l'adipokine la plus abondante des adipokines circulantes. Elle est quasi exclusivement produite par les adipocytes. Elle diminue les taux de cytokines pro inflammatoires (TNF $\alpha$ , IL-8, IL-6) et augmente l'IL-10. Les taux d'adiponectine semblent non modifiés chez les patients non obèses, sans comorbidité (McArdle, N. 2007; Sharma, S.K. 2007). De plus, l'utilisation de la PPC ne diminue pas les taux d'adiponectine (Harsch, I.A. 2004b; West, S.D. 2007). Là encore, l'obésité semble être l'acteur déterminant de ces modifications.

#### **1.2.4.2.2 Expression des molécules d'adhésion :**

L'expression des molécules d'adhésion est prédictive du risque cardiovasculaire en population générale (Hwang, S.J. 1997; Ridker, P.M. 2001), et est associée à des effets indésirables chez les patients ayant des pathologies cardiovasculaires (Blankenberg, S. 2001; Haim, M. 2002).

L'expression des molécules d'adhésion à la surface des cellules est hautement régulée. Ces molécules facilitent les interactions entre les cellules sanguines activées et les cellules endothéliales. Elles regroupent les sélectines et les intégrines. Les sélectines comptent 3 grands groupes : les L-sélectines à la surface des leucocytes, les E-sélectines dans les cellules endothéliales, et les P-sélectines qui sont exprimés dans les plaquettes et les cellules endothéliales. Elles assurent une liaison faible entre leucocytes et cellules endothéliales, première étape de la diapédèse. Les intégrines interviennent ensuite, permettant un ancrage plus fort entre les cellules et la migration dans l'interstitium au travers de l'endothélium (Libby, P. 2002).

Il a été montré que l'index de désaturation était significativement corrélé au taux d'ICAM-1, de VCAM 1 et de la L-selectine (El-Solh, A.A. 2002; Ohga, E. 2003; Ursavas, A. 2007; Zamarron-Sanz, C. 2006) et que la PPC diminuait l'expression des molécules d'adhésion après 1 mois de traitement (Chin, K. 2000). Mais souvent les études ont un petit effectif, et reposent sur un seul prélèvement sanguin.

Chez les patients SAHOS, les monocytes, les neutrophiles et divers sous populations de lymphocytes T expriment de hauts niveaux de molécules d'adhésion, concomitant d'une augmentation de capacités d'adhésion aux cellules endothéliales (Dyugovskaya, L. 2005a; Dyugovskaya, L. 2002, 2003, 2005b; Dyugovskaya, L. 2008; Lavie, L. 2005).

En synthèse, prenant en compte la totalité des résultats présentés, il est clair que l'importance de l'inflammation systémique mesurée au cours du SAHOS a été contestée avec des taux de médiateurs pro inflammatoires augmentés ou inchangés, dépendant de l'IMC, des comorbidités, des traitements et probablement du polymorphisme génétique (Riha, R.L.

2009; Zhang, H. 2009). De plus, Dyugovskaya et coll ont montré qu'il pouvait exister une réponse pro-anti inflammatoire spécifique dépendant du type cellulaire considéré ( $\gamma\delta$ +T , CD8+T, CD4+T) (Lavie, L. 2008). Quoiqu'il en soit, une inflammation systémique existe même si cette inflammation est de bas grade, incomparable avec celle observée au cours d'autres pathologies typiquement inflammatoires comme la polyarthrite rhumatoïde, mais néanmoins significative.

#### **1.2.4.3 Stress oxydatif :**

Les dérivés réactifs de l'oxygène (DRO), comme les dérivés réactifs du nitrogène, sont connus pour jouer un double rôle, délétère ou bénéfique en fonction de leur concentration. Les effets bénéfiques des DRO surviennent à des concentrations faibles ou modérés et sont impliqués dans de nombreux systèmes de signalisations cellulaires et la réponse mitogénique. Les effets néfastes des DRO apparaissent lorsqu'il existe une perturbation de la balance prooxidant/antioxydant, que ce soit par surproduction de DRO et/ou par déficit en anti oxydant. L'excès de DRO est responsable de l'oxydation de l'ADN, des protéines et des lipides, compromettant leurs fonctions.

Les antioxydants regroupent des enzymes, telles que la superoxyde dismutase (SOD), la catalase et la glutathion peroxydase, et des petites molécules, comme les vitamines C et E, le glutathion et l'acide urique. Les mécanismes impliqués dans cette balance sont hautement régulés et constituent la « redox regulation ».

Le plus abondant des DRO est l'anion radicalaire superoxide ( $O_2^{\cdot-}$ ), obtenu par réduction univalente de l'oxygène moléculaire. Il est produit par la mitochondrie, et via la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase, notamment des neutrophiles activés et des cellules endothéliales, ou encore la xanthine oxydase. Quoique ce radical soit peu réactif, il peut donner lieu à des dérivés beaucoup plus actifs comme le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), le radical hydroxyl ( $OH^{\cdot}$ ), et les radicaux peroxydes ( $ROO^{\cdot}$ ). Le plus simple des radicaux peroxydes est le  $HOO^{\cdot}$ , responsable de l'initialisation de la peroxydation des acides gras par deux voies parallèles (LOOH-dépendant et LOOH-indépendant) (Valko, M. 2007).

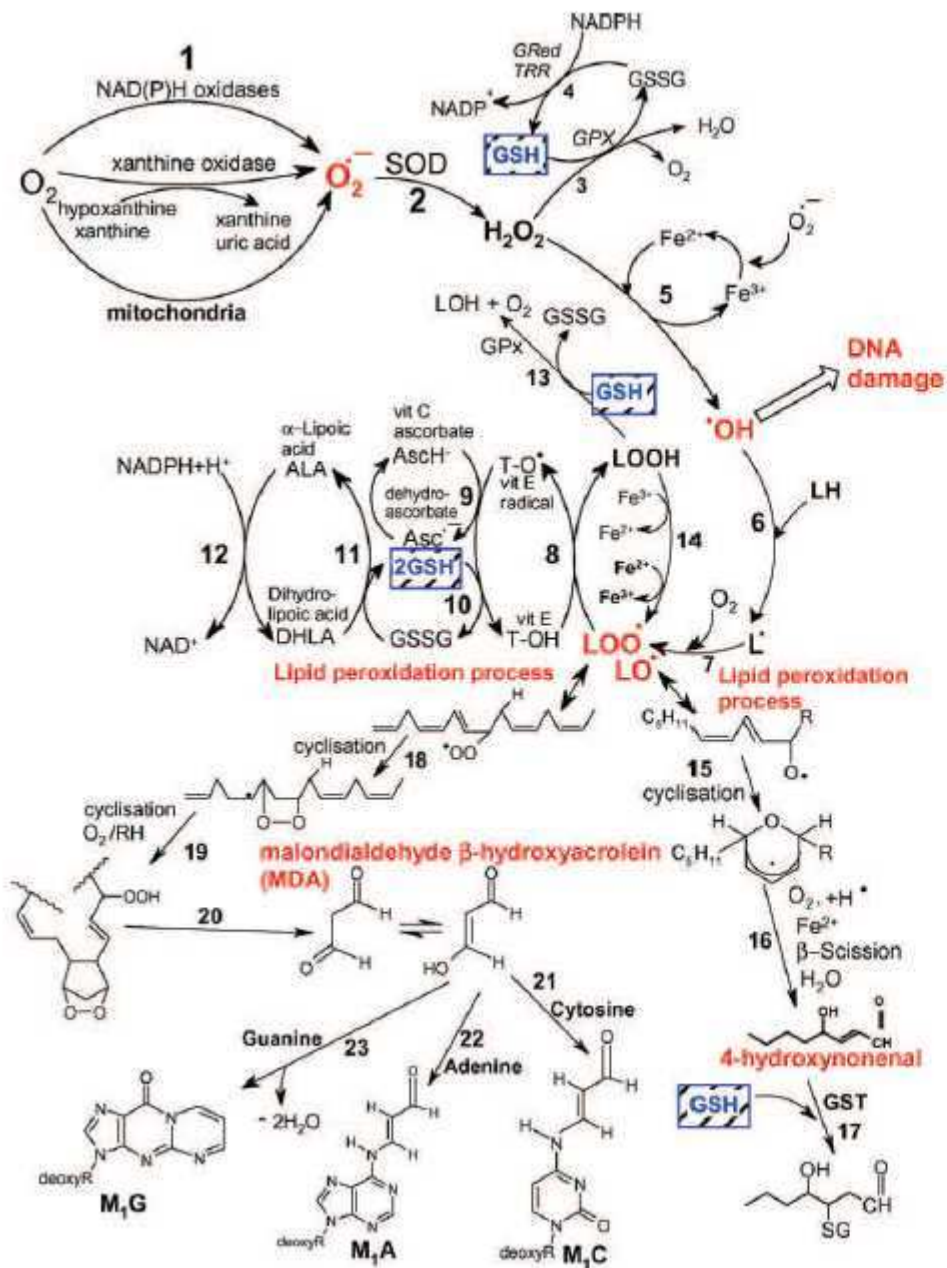


Figure 11 : schéma montrant les différentes voies de formation des dérivés réactifs de l'oxygène (DRO) : voie de la NADPH oxydase, de la xanthine oxydase, de la formation de la peroxydation lipidique, et de l'activité des différents anti oxydants (Valko, M. 2007)

Les dérivés réactifs du nitrogène sont également considérés comme des radicaux libres. Une des molécules les plus toxiques est le peroxyde nitrique ( $\text{OONO}^-$ ), formé par réaction entre l'oxyde nitrique (NO) et l'anion superoxide. Il s'ensuit une diminution de la disponibilité du NO participant à la dysfonction endothéliale (Beckman, J.S.Koppenol, W.H. 1996).

Parallèlement à la production physiologique de DRO, la plupart des cellules sont capables d'engendrer des DRO en réponse à une stimulation par des cytokines, des facteurs de croissance ou des hormones, comme l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6, le TNF- $\alpha$ , l'angiotensine II, le platelet derived growth factor (PDGF), le TGF- $\beta$ , le granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) et le fibroblast growth factor (FGF-2) (Thannickal, V.J.Fanburg, B.L. 2000).

Ainsi, les DRO ont été impliqués dans divers pathologies pouvant être divisées en deux groupes : le premier impliquant le stress oxydatif mitochondrial (cancer et diabète), le second nommé « stress oxydatif inflammatoire » dû à une augmentation de l'activité de la NADPH oxydase (athérosclérose, inflammation chronique) ou de la xanthine oxydase (ischémie/reperfusion) (Dalle-Donne, I. 2006).

Dans les dix dernières années, plusieurs études se sont intéressées à l'implication du SAHOS dans la genèse d'un stress oxydatif mitochondriale et inflammatoire. Une modification du statut rédox de la «cytochrome oxydase», témoignant d'une dysfonction mitochondriale a été mise en évidence par McGown et coll (McGown, A.D. 2003). Dyugovskaya et coll (Dyugovskaya, L. 2002) ont montré qu'il existait une augmentation de la production de DRO intracellulaires par les monocytes et certaines sous populations de granulocytes de patients SAHOS comparés à des contrôles. Une production de DRO par les neutrophiles de patients SAHOS stimulés par le fMLP et le ionophore calcique A23 a été mise en évidence par Schulz et coll (Schulz, R. 2000). Une augmentation de la peroxydation des lipides a été trouvée par mesure du degré d'oxydation des LDL de patients SAHOS comparés à des sujets sains (Barcelo, A. 2000). Une implication de la xanthine oxydase a été suggérée par l'amélioration des fonctions endothéliales chez des patients prenant de l'allopurinol pendant 15 jours (El Solh, A.A. 2006). Un déficit du système anti oxydant a également été proposé (Christou, K. 2003). Sur une cohorte plus importante, Lavie et coll ont mis en évidence que l'IAH était un facteur prédictif indépendant de la peroxydation lipidique (Lavie, L. 2004). Enfin, dans une

étude transversale ayant inclus 128 sujets, Yamauchi et coll ont trouvé que seul l'index de désaturations était corrélé avec l'excrétion urinaire d'un marqueur d'oxydation du DNA : le 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (Yamauchi, M. 2005).

Dans les études interventionnelles, le traitement par PPC (Barcelo, A. 2000; Dyugovskaya, L. 2002; Lavie, L. 2004) ou par orthèse d'avancée mandibulaire (Itzhaki, S. 2007) a permis de diminuer les marqueurs de stress oxydatif des patients SAHOS.

#### **1.2.4.4 Voies de signalisation intra cellulaire :**

Nf- $\kappa$ B est considéré depuis longtemps comme la voie de signalisation proinflammatoire par excellence et a un rôle important dans la physiopathologie de nombreuses pathologies inflammatoires, telles que la polyarthrite rhumatoïde, l'asthme ou la BPCO (Chung, K.F. 2006; Holgate, S.T. 2004; Williams, R.O. 2007). Ce facteur de transcription est impliqué dans la régulation de nombreuses cytokines, avec comme ligne de file TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$ , de chémokines, et de molécules d'adhésion. Il appartient à la famille Rel, protéine se liant au DNA via une séquence spécifique. Deux voies de signalisation conduisant à son activation ont été identifiées : 1) celle déclenchée par les cytokines pro inflammatoires ou les DRO, responsables de la phosphorylation de son inhibiteur I $\kappa$ B, conduisant au clivage du complexe RelA-p50 (Bowie, A.O'Neill, L.A. 2000; Karin, M.Ben-Neriah, Y. 2000) impliquée dans la voie de l'immunité innée, 2) celle due aux lymphotoxines  $\beta$ , au ligand CD40, facteur d'activation des cellules B (BAFF)..., conduisant à l'activation des complexes RelB/p52 (Bonizzi, G.Karin, M. 2004) impliquée dans la voie de l'immunité adaptative.

Les patients porteurs d'un SAHOS auraient un taux de p65, une des deux protéines constitutives de NF- $\kappa$ B, monocytaire plus élevé que celui d'un groupe contrôle et serait corrélé à l'IAH et au temps passé à une saturation inférieure à 90%. Une nuit de PPC diminuerait ce taux (Yamauchi, M. 2006). Plus récemment, Jelic et coll ont analysé l'expression de NF- $\kappa$ B dans des cellules endothéliales veineuses par des techniques d'immunofluorescence quantitative. Ils ont conclu que l'expression de NF- $\kappa$ B était plus importante chez des patients obèses porteurs d'un SAHOS comparés aux sujets obèses indemnes de SAHOS. Un traitement par PPC de plus de 4h/jour entraînait une diminution significative de l'expression de NF- $\kappa$ B (Jelic, S. 2010).

Un autre facteur de transcription : HIF-1 $\alpha$ , connu de longue date, pour être impliqué dans la réponse à l'hypoxie, pourrait logiquement jouer un rôle dans le SAHOS. Aucune étude clinique n'a démontré son implication directe. En revanche, le taux de VEGF plasmatique, gène régulé par HIF-1 $\alpha$ , a été dosé par ELISA chez des patients présentant un SAHOS. Ce taux était corrélé à l'IAH. De plus, le traitement par PPC diminuait le taux de VEGF uniquement chez les patients dont l'hypoxémie nocturne s'améliorait (Lavie, L. 2002). Ce résultat n'a pas été confirmé par Valipour et coll (Valipour, A. 2004) mais les patients avaient un retentissement moins important de leur SAHOS sur la SpO<sub>2</sub>.

#### **1.2.4.5 Apport des modèles expérimentaux :**

En complément des études cliniques, de nombreux modèles expérimentaux animaux et cellulaires ont été élaborés afin d'améliorer la compréhension des mécanismes impliqués dans les conséquences du SAHOS cardiovasculaires notamment.

Les premiers modèles animaux étudiés visaient à reproduire les obstructions pharyngées observées dans le SAHOS, que ce soit dans des modèles spontanés (Hendricks, J.C. 1987; Lonergan, R.P., 3rd 1998) ou induits par chirurgie (Brooks, D. 1997; Farre, R. 2003; Launois, S.H. 2001; Nacher, M. 2007). Sur le plan locorégional, ils permettent d'étudier les mécanismes influant la collapsibilité de l'oropharynx (Liu, A. 2008; Sahin, M. 1999). Sur le plan systémique, ces modèles reproduisant à la fois les épisodes de désaturation/réoxygénation, les efforts respiratoires et les micro-éveils des patients SAHOS ont permis de mettre en évidence que l'hypoxie intermittente était le stimulus le plus important dans la genèse des conséquences cardiovasculaires du SAHOS. En effet, les microéveils spontanés, non suivis d'occlusion pharyngée (Bao, G. 1999; Brooks, D. 1997; Launois, S.H. 2001), entraînent des variations hémodynamiques limitées et ne peuvent rendre compte notamment de l'élévation de la PA à long terme. L'étude de Nacher et coll suggère que les efforts respiratoires et les désaturations en oxygène sont responsables de l'induction d'une inflammation systémique mais que seules les désaturations induisent une dysfonction endothéliale (Nacher, M. 2007).

#### **1.2.4.5.1 Rôle de l'HI dans l'augmentation de la pression artérielle :**

Les premiers modèles animaux d'HI ont eu pour but d'explorer le rôle de l'HI sur la PA. Il a été montré que l'HI était responsable chez les rongeurs d'une augmentation modérée de la PA (Campen, M.J. 2005; Fletcher, E.C. 1992c; Lai, C.J. 2006; Tahawi, Z. 2001), commençant 5 à 8 jours après le début de l'HI, et que celle-ci subsistait inchangée après plusieurs jours d'exposition à l'HI, de 14 (Dematteis, M. 2008) à 90 jours (Lin, M. 2007).

Tous les facteurs impliqués dans cette activation ont été étudiés :

##### **Baroréflexe et chémoréflexe :**

Une diminution de la sensibilité du baroréflexe a été mise en évidence dans un modèle de rongeurs (Lai, C.J. 2006), et rapportée à la perte cellulaire du nucléus ambiguus (Yan, B. 2008) et du remodelage du ganglion cardiaque et de ses afférences vagales (Lin, M. 2008).

Plusieurs études ont montré une implication des chémorécepteurs (Braga, V.A. 2006; Lesske, J. 1997). La « chémodénervation », qu'elle soit réalisée chimiquement (Fletcher, E.C. 1992b) ou par section du nerf du sinus carotidien (Fletcher, E.C. 1992a) est responsable d'une diminution de l'élévation de la PA induite par l'HI. Une augmentation de l'activité des corps carotidiens a été confirmée dans des modèles d'espèce différentes (Dematteis, M. 2008; Rey, S. 2004). L'équipe de Prabhakar (Peng, Y.J. 2003; Prabhakar, N.R. 2005) a montré que cette augmentation d'activité était due à un changement fonctionnel, et non structural, à l'inverse de ce que l'on peut observer au cours de l'hypoxie chronique. Les médiateurs impliqués incluent les DRO pour Peng et coll (Peng, Y.J. 2003) et le système endothéline pour Rey et coll (Rey, S. 2008).

##### **Catécholamines :**

Des taux élevés de catécholamines ont été retrouvés chez la souris et le rat (Dematteis, M. 2008; Zoccal, D.B. 2007). En 2006, Kumar et coll montraient une augmentation de la production de catécholamines dans des expériences réalisées sur la médullosurrénale de rats ex vivo, en comparaison avec des rats contrôles et des rats soumis à une hypoxie chronique. L'implication des DRO a été démontrée par deux équipes (Kumar, G.K. 2006; Kuri,



B.A. 2007). Son action passerait par une augmentation de la capacité sécrétoire des cellules chromaffines.

### **Système Rénine-angiotensine :**

Les études sont contradictoires. Alors que Fletcher et coll montrent une nette augmentation de l'activité du système rénine-angiotensine (Fletcher, E.C. 2002), Zocal et coll ne trouvent pas de modification de la PA après traitement par un antagoniste des récepteurs de l'angiotensine II (Zoccal, D.B. 2007).

#### ***1.2.4.5.2 Rôle de l'HI dans les conséquences neurologiques :***

Plusieurs zones cérébrales sont impactées par l'HI. Gozal et coll ont été les premiers à explorer les effets de l'HI sur les fonctions cognitives dans un modèle d'HI chronique chez le rongeur (Gozal, D. 2001). Ce modèle a permis de mettre en évidence des difficultés des capacités d'apprentissage en utilisant un système explorant les fonctions de l'hippocampe (Morris water maze). Les expériences d'immunohistochimie ont montré une augmentation de l'apoptose et de l'expression de c-fos des cellules siégeant dans la région CA1 hippocampique. Les médiateurs de l'inflammation ont été impliqués dans les mécanismes moléculaires de ce dysfonctionnement. En effet, l'inhibition de la cyclooxygénase-2 (COX-2) (Li, R.C. 2003), de la nitric oxyde synthétase inductible et du platelet-activating factor préviennent l'apoptose neuronale et les difficultés d'apprentissage (Li, R.C. 2003; Li, R.C. 2004; Row, B.W. 2004).

D'autres régions cérébrales se sont avérées touchées par l'HI : atteinte corticale (Row, B.W. 2007) et cérébelleuse (Pae, E.K. 2005). Concernant l'atteinte corticale, le mécanisme moléculaire impliqué inclut la réduction de la neurotransmission acétylcholinergique, et l'augmentation de l'affinité des récepteurs nicotiniques. Concernant celui du proencéphale, il a été mis en évidence une réduction de l'activité de la choline acétyl transférase (Row, B.W. 2007).

Enfin, l'équipe de Veasey a montré l'altération des neurones impliqués dans l'état de veille active (Veasey, S.C. 2004a; Zhan, G. 2005; Zhu, Y. 2007). En effet, les souris soumises à l'HI développent un dysfonctionnement de l'éveil imputable aux neurones catécholaminergiques

avec perte de 30 à 40% de ces neurones (Veasey, S.C. 2004b; Zhu, Y. 2007). Ce dysfonctionnement dépend également d'une composante inflammatoire avec augmentation de la COX-2 et de la nitric oxide synthétase inducible (Veasey, S.C. 2004a; Zhan, G. 2005) En bloquant la NADPH, transgénétiquement ou pharmacologiquement, le dysfonctionnement de l'éveil est prévenu. Étonnamment, les lésions observées sont moins importantes chez les femelles que chez les mâles.

Ces modèles ont permis de mettre en évidence que l'HI était capable d'induire une atteinte spécifique irréversible neurologique et d'appréhender les mécanismes par lesquels l'HI intervenait.

#### **1.2.4.5.3 Rôle de l'HI dans le métabolisme :**

##### **Métabolisme glucidique :**

L'HI induit une altération du métabolisme glucidique notamment par le biais de l'activation sympathique connue pour augmenter la glycémie, stimuler la sécrétion hépatique de glucose, diminuer son utilisation périphérique et supprimer sa sécrétion pancréatique. Cependant, Iiyori et coll ont montré que cette altération pouvait exister en l'absence de sollicitation sympathique. Pour cela, ils ont utilisé des souris C57BL/6J exposées à une HI de 60cycles/h pendant 9h, délivrée en phase d'éveil, et ont mesuré l'insulinorésistance. L'utilisation d'hexaméthonium, antagoniste sélectif des récepteurs nicotiques neuronaux de l'acétylcholine (Iiyori, N. 2007), n'a pas modifié la diminution de l'insulinorésistance induite par l'HI.

Le mécanisme par lequel l'HI per se induit un dysfonctionnement glucidique semble impliquer la leptine, au moins chez les souris obèses. En effet, l'exposition à une HI pendant 12 semaines provoque chez des souris obèses déficientes en leptine un état d'insulinorésistance progressive avec une insulinémie 5,7 fois plus élevée que celle des animaux minces (Polotsky, V.Y. 2003). Cependant, dans une étude complémentaire, Polotsky et coll ont montré une possible dysrégulation glucidique induite par l'HI même chez des souris minces. L'HI était capable de réverser le profil de régulation normal du glucose avec

l'apparition d'une glycémie haute, et d'une insulinosensibilité basse durant les périodes d'HI. Si l'HI était poursuivie pendant 4 semaines, elle conduisait à la stimulation de la réplication des cellules pancréatiques  $\beta$ , considérée comme une réponse compensatoire à la diminution de l'insulinosensibilité (Yokoe, T. 2008).

### **Métabolisme lipidique :**

Li et coll ont montré que chez des souris minces, une HI de 5 jours était capable d'induire une augmentation du cholestérol total, due essentiellement au LDL cholestérol, et des triglycérides (Li, J. 2005b). Cette augmentation était en rapport avec 1) une augmentation de l'expression de la «sterol regulatory element binding protein 1 (SREBP-1)», et 2) une augmentation de l'activité de la stearoyl-CoA désaturase 1 (SCD-1), enzyme impliquée dans la sécrétion des lipoprotéines. Ces modifications n'étaient mises en évidence chez des souris obèses qu'après 12 semaines d'hypoxie chronique. Par ailleurs, Li et coll ont montré chez des souris normopondérales que l'effet de l'HI dépendait de la sévérité de l'hypoxie (Li, J. 2007). Ils ont vérifié l'implication du facteur de transcription HIF-1 $\alpha$  en utilisant des souris hétérozygotes HIF-1 $\alpha$ <sup>+/-</sup> et des souris contrôles. La déficience en HIF-1 $\alpha$  entraînait une moindre augmentation des taux des protéines SREBP-1 et SCD-1, comparée aux animaux contrôles, mais sans modifier le taux de cholestérol sérique (Li, J. 2006), suggérant que ce mécanisme n'était pas suffisant à lui seul pour expliquer les effets de l'HI.

Perry et coll ont comparé les effets à court terme (4 jours) et moyen terme (21 jours) de l'HI (FiO<sub>2</sub> :10%, 12h/j), associée ou non à des perturbations du sommeil (déficit en sommeil paradoxal ou restriction de sommeil) et de l'hypoxie chronique (Perry, J.C. 2007). Ils ont montré qu'à court terme l'HI seule ne modifiait pas les taux de lipides plasmatiques à l'inverse des rats soumis à une restriction de sommeil paradoxal ou à une restriction associée à une HI. En revanche, à moyen terme, l'HI augmentait les triglycérides et les VLDL à l'inverse de la restriction de sommeil, associée ou non à l'HI. Ces résultats d'une part confirment une partie des résultats de Polotsky et coll (importance de la durée d'exposition, et de la sévérité de l'hypoxie), d'autre part de l'intrication des effets de l'HI per se et des altérations de l'architecture du sommeil.

## **NASH :**

L'accumulation des triglycérides dans le foie a été retrouvée à plusieurs reprises chez des souris soumises à une HI (Li, J. 2005a; Li, J. 2005b). En revanche, dans une étude réalisée sur des souris non obèses soumises à une HI pendant 12 semaines, l'analyse histopathologique du foie n'a pas montré de lésion de stéato hépatite (Savransky, V. 2007c). Les lésions associaient une accumulation de glycogène, et une augmentation de la peroxydation lipidique (mesure du ratio malondialdehyde/acides gras libres). L'implication du stress oxydatif a été confortée par l'augmentation de l'expression du facteur de transcription NFκB. Cependant, chez des souris soumises à un régime gras et hypercholestérolémiant, une HI effectuée pendant 6 mois induisait l'apparition de lésions inflammatoires et fibrosantes (Savransky, V. 2007a). Les taux hépatiques de myéloperoxydase, d'ILβ-1, d'IL-6, de chémokine MIP-2 et à un moindre degré de TNFα, étaient augmentées.

### ***1.2.4.5.4 Rôle de l'HI dans l'inflammation :***

Plusieurs études ont montré que le facteur de transcription pro-inflammatoire NF-κB était surexprimé dans des modèles différents d'HI.

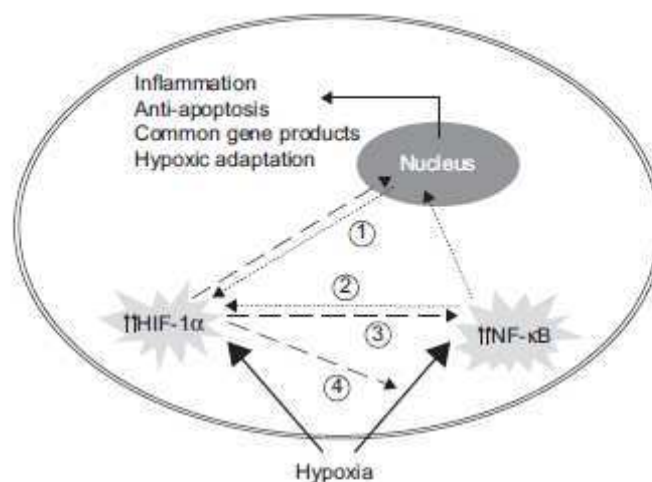
Ainsi, Greenberg et coll (Greenberg, H. 2006) ont montré dans un modèle murin d'HI, une augmentation de l'expression de NF-κB dans 3 types cellulaires : aortique de façon prédominante et rapide, cardiaque et pulmonaire. Ryan et coll (Ryan, S. 2005) ont étudiés la réponse de cellules HeLa à l'HI, selon le modèle décrit dans le paragraphe 1.1.2.2.3, et ont trouvé une surexpression de NF-κB, alors que HIF-1 n'était pas modifié.

L'implication de HIF-1α est, en effet, plus controversée. La différence entre les diverses études n'est sûrement pas indépendante du modèle utilisé, notamment la durée des cycles. Ainsi, l'activité de HIF-1α apparaît augmentée dans le myocarde de rats spontanément hypertendus exposés à une HI. HIF-1α est impliqué dans l'élévation de la concentration des triglycérides chez des rongeurs soumis pendant 5 jours à une HI. Contrairement à Ryan, Yuan et coll (Yuan, G. 2005) trouve une activation de HIF-1 α dans une lignée cellulaire de phéochromocytome (PC12). Récemment, cette même équipe (Nanduri, J. 2008) a démontré

que l'accumulation de HIF-1  $\alpha$  était due à une augmentation de la production de DRO via la NADPH oxydase.

**Interaction entre NF- $\kappa$ B et HIF-1  $\alpha$  :** Il est clair aujourd'hui que ces deux facteurs de transcription ont une interdépendance. En effet, le promoteur de HIF-1  $\alpha$ , comporte un site NF- $\kappa$ B, régulant son expression de base (van Uden, P. 2008) et celle induite par l'hypoxie (Belaiba, R.S. 2007). Inversement, HIF-1  $\alpha$  peut influencer l'expression de NF- $\kappa$ B (Walmsley, S.R. 2005). La surexpression de HIF-1 $\alpha$  conduit à une augmentation de l'activité de NF- $\kappa$ B (Scortegagna, M. 2008). De plus, ils partagent la régulation de certains gènes, comme la iNOS, potentiellement augmentée par ces deux voies.

Ceci rend d'autant plus complexe l'analyse de l'implication de ces deux facteurs de transcription, de leur interrelation et de la cinétique de leur intervention au cours de l'HI.



**Figure 12 :** Selon (Garvey, J.F. 2009), interactions entre NF- $\kappa$ B et HIF-1  $\alpha$ . L'activation de HIF-1  $\alpha$  facilite la réponse adaptative à l'hypoxie, tandis que NF- $\kappa$ B conduit à l'expression de gènes inflammatoires et anti apoptotiques. Ils partagent la régulation de certains gènes. De plus, NF- $\kappa$ B régule les taux de HIF-1  $\alpha$  (1 et 2), l'induction hypoxique de NF- $\kappa$ B est dépendante de HIF-1  $\alpha$  de la présence de HIF-1  $\alpha$  (3) et HIF-1  $\alpha$  est directement impliqué dans la régulation de l'apoptose médiée par NF- $\kappa$ B (4).

#### **1.2.4.5.5 Rôle de l'HI dans l'athérosclérose :**

La survenue d'une athérosclérose dépend de plusieurs facteurs : des facteurs hémodynamiques, des facteurs métaboliques (métabolisme glucido lipidique) et des facteurs

incluant stress oxydatif et inflammation. Nous venons de voir que l'HI était capable d'interférer avec ces différents facteurs.

A un stade précoce, au 14<sup>ième</sup> jour d'HI, des modifications structurales de la paroi endothéliale ont été retrouvées dans un modèle murin d'HI (Arnaud, C. 2011; Dematteis, M. 2008) avec une désorganisation des fibres élastiques, probablement due à une hypertrophie des cellules musculaires lisses, sans dépôt lipidique, ni fibrose associée. Lors d'expositions plus prolongées (10-12 semaines), Savransky et coll note l'apparition de plaques athéromateuses mais uniquement en cas de régime gras (Savransky, V. 2007b), suggérant que l'HI seule n'est pas suffisante pour induire une athérosclérose. Le rôle de la susceptibilité génétique et/ou d'habitus (Dematteis, M. 2009; Jun, J.Polotsky, V.Y. 2009) semble être déterminant.

## **1.2.5 SAHOS et voies aériennes supérieures :**

### **1.2.5.1 Physiopathologie des VAS dans le SAHOS :**

Le SAHOS est la résultante d'une occlusion au cours du sommeil des VAS intéressant essentiellement le pharynx et plus particulièrement l'oropharynx (Remmers, J.E. 1978). Le pharynx est un conduit musculomembraneux, susceptible de se fermer en fonction des forces qui vont lui être appliquées (Isono, S. 1997). Un modèle de résistance de type Starling a été développé par Schwartz pour schématiser ce phénomène (Schwartz, A.R. 1988). La section droite de la lumière pharyngée est la résultante de deux forces opposées : une force occlusive due à une pression endopharyngée négative, générée par les mouvements inspiratoires, une force dilatatrice due à l'action des muscles dilatateurs du pharynx (génio-glosse (GG), tenseurs et élévateurs du voile...).

Cette action musculaire comporte un tonus de base et dépend d'une stimulation réflexe. Le début de l'activité électromyographique inspiratoire de ces muscles précède celui du diaphragme et des muscles intercostaux. Leur activité diminue au cours du sommeil, leur niveau d'hypotonie étant maximale au cours du sommeil paradoxal (Tangel, D.J. 1991). L'influence du sommeil dépend du type d'activité du muscle dilatateur : ainsi, le GG, muscle phasique inspiratoire, a une composante phasique préservée alors que sa composante tonique est diminuée, le tenseur du voile, muscle tonique, enregistre une baisse significative de son activité. De plus, la coordination entre ces muscles disparaît pendant le sommeil et le sommeil atténue la mise en jeu des muscles dilatateurs pharyngés. Cela se traduit par une augmentation des résistances pharyngées au cours du sommeil témoignant de la plus grande « collapsibilité » des VAS.

Ce collapsus est favorisé par l'existence d'une augmentation des résistances d'amont (dysmorphoses, malformations des fosses nasales, rhinite, tabac), d'une augmentation des résistances (hypertrophie du voile, hypertrophie amygdalienne, macroglossie), et d'une diminution de la force dilatatrice des muscles dilatateurs (os hyoïde en position basse, causes endocrino métaboliques, hypnotiques, opioïdes, alcool, obésité).

Des études utilisant fibroscope, imagerie, ou mesure de pression endopharyngée ont montré que plusieurs sites oropharyngés sont en cause chez les patients SAHOS (Morrell, M.J. 1998; Schwab, R.J. 2003). Chez le patient SAHOS éveillé, l'activité du GG est plus importante que chez sujet normal, témoignant de la mise en jeu réflexe des muscles dilatateurs pharyngés, visant à compenser l'étranglement des voies aériennes supérieures chez les SAHOS. Watanabe et coll (Watanabe, T. 2002) ont montré que l'obstruction chez les SAHOS obèses se situait au niveau du vélopharynx alors que chez les non obèses avec une rétrognathie, l'occlusion se faisait au niveau du vélo et de l'oropharynx. Les muscles vélares très sollicités lors de l'installation de la dépression inspiratoire et rapidement fatigables pourraient être les premiers à faillir mécaniquement. L'extension du site d'obstruction dépendant des caractéristiques des tissus non musculaires, de la tension de surface qui influe sur les pressions d'ouverture et de fermeture des VAS (Kirkness, J.P. 2003), et des propriétés mécaniques des muscles oropharyngés.

#### **1.2.5.2 Inflammation des voies aériennes supérieures :**

Outre les facteurs anatomiques et dynamiques (tonus musculaire), l'inflammation tissulaire joue un rôle important dans la physiopathologie de l'obstruction des VAS.

Les épisodes récurrents de ronflements et/ou d'obstruction peuvent conduire, sous l'effet de la stimulation mécanique liée à la vibration des parois pharyngées, au développement d'une inflammation locale et à des altérations histologiques des tissus des VAS qui, en retour, sont capables de modifier l'intégrité de la matrice extracellulaire et interférer avec les propriétés mécaniques des tissus mous.

Plusieurs études ont décrit l'inflammation siégeant à ce niveau, notamment au niveau de l'uvule, en utilisant les pièces obtenues lors d'Uvulo Palato Pharyngo Plastie ou d'amygdalectomie. Les modifications histologiques associent un œdème sous-épithélial (Sekosan, M. 1996), une réduction du tissu conjonctif (Paulsen, F.P. 2002), une augmentation du nombre de fibres et une proportion plus élevée de fibres de type IIa au



niveau du muscle azygos de la luette (Series, F. 2004; Series, F. 1995), et enfin une infiltration par des cellules inflammatoires (Boyd, J.H. 2004; Sekosan, M. 1996; Series, F. 2004). Le profil des cellules inflammatoires diffère en fonction de leur localisation (Boyd, J.H. 2004). Mais l'absence de prise en compte de certains facteurs dont l'IMC, en rend difficile l'interprétation. Series et coll ont montré que le nombre de cellules T (CD4+ et CD8+) et de macrophages était corrélé au poids et non à l'IAH (Series, F. 2004). En 2008, Loubaki et coll ont analysé l'expression du TNF $\alpha$  en immunohistochimie et en Western Blot. Ils ont conclu que le TNF $\alpha$  était principalement exprimé au niveau de la couche musculaire de l'uvule, cette expression était augmentée chez les apnéiques les plus gros comparés aux patients SAHOS non-obèses et les ronfleurs non obèses. Un article récent (Kimoff, R.J. 2011) a comparé l'expression de cytokines proinflammatoires et le stress oxydatif (détection des protéines carbonylées par immunoblotting) chez des patients SAHOS sévères et modérés, appariés pour le poids, l'âge et la circonférence du cou. Chez les SAHOS sévères, l'expression de l'IL-1 $\alpha$ , l'IL-6 et le TGF  $\beta$  étaient significativement plus élevés dans la muqueuse, tandis que dans le tissu musculaire, l'expression de RANTES y était prédominante. De même, le stress oxydatif était plus important chez les SAHOS sévères.

Des études se sont également intéressées à l'implication des leucotriènes. Goldbart et coll (Goldbart, A.D. 2004) ont montré qu'il existait une augmentation de l'expression des récepteurs des leucotriènes dans des pièces opératoires amygdaliennes d'enfants SAHOS comparés à des enfants présentant fréquemment des infections ORL. En accord avec ce résultat, l'utilisation d'un antagoniste des leucotriènes améliorerait l'IAH (Goldbart, A.D. 2005).

### **1.2.6 SAHOS et voies aériennes sous glottiques :**

Les VA sous glottiques ne sont pas impliquées directement dans la genèse des événements respiratoires anormaux, cependant, quelques études suggèrent l'existence d'une atteinte trachéobronchique. Olopade et coll. ont montré une augmentation du pentane exhalé lors de tests matinaux, indépendamment de tout tabagisme associé (Olopade, C.O. 1997). La présence d'IL-6 et d'isoprostane dans le condensat respiratoire de ces patients (Carpagnano,

G.E. 2005), ainsi que le recrutement local de cellules inflammatoires avec l'apparition de polynucléaires neutrophiles dans les expectorations induites (Salerno, F.G. 2004) ont également été rapportés. L'équipe de Grenoble a montré l'existence d'une corrélation très nette entre la production d'IL-8 et la sévérité du SAHOS (Devouassoux, G. 2007). Enfin, plus récemment, Carpagnano et coll ont montré une augmentation significative des concentrations d'IL-8 et d'ICAM1 à la fois plasmatiques et exhalés (Carpagnano, G.E. 2010), associée à une augmentation du pourcentage de neutrophiles dans les expectorations chez des patients SAHOS obèses, non obèses et obèses sans SAHOS comparés à des volontaires sains. En revanche, il n'existait pas de différence entre les SAHOS non obèses et les obèses-non SAHOS, suggérant un rôle propre du SAHOS indépendant de l'obésité.

L'existence d'une obstruction bronchique distale dans le SAHOS a déjà été rapportée (Zerah-Lancner, F. 1997; Zerah\_Lancner, F. 2000), ainsi que d'une hyperréactivité bronchique (Lin, C.C.Lin, C.Y. 1995). De plus, il est classique d'admettre que l'association d'un SAHOS et d'une BPCO constitue un tableau clinique et de sévérité pronostique particulier, l'« overlap syndrome », sans que les déterminants physiopathologiques à l'origine de cette gravité soient clairement identifiés (Fletcher, E. 1990).

Ainsi, il est possible que le SAHOS initie une réaction inflammatoire respiratoire qui pourraient amener à une accentuation du remodelage bronchique.

## 2 Hypothèse de travail :

La littérature existante n'aborde pas la question du lien entre inflammation systémique et inflammation tissulaire locale. Il est certain que l'inflammation systémique contribue à l'inflammation locale, mais une activation spécifique des cellules résidentes ne peut être écartée.

Le but de notre étude était de déterminer le rôle des cellules épithéliales respiratoires dans l'inflammation induite par l'HI dans un modèle *in vitro*, permettant d'exclure toute sollicitation de la part du compartiment systémique.

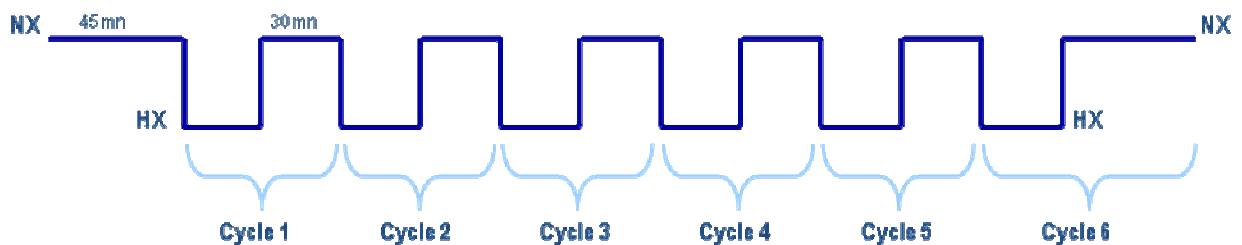
Pour cela, nous avons étudié les conséquences de l'hypoxie intermittente sur les cellules constitutives respiratoires, épithéliales et musculaires lisses, dans différents aspects : production de médiateurs de l'inflammation, de protéases, conséquences sur la migration des neutrophiles.

### 3 Matériels et méthodes :

#### 3.1 Choix du modèle cellulaire d'HI :

##### 3.1.1 Description :

Nous avons choisi un modèle utilisant une enceinte hermétique validée par Hélène Lepetit dans un précédent travail (Thèse d'Université, 2005). Cette enceinte a un volume de 13 litres, elle est, elle-même, dans un incubateur maintenue à une température de 37°C, et 95% d'eau. Les conditions hypoxiques sont réalisées à l'aide d'un mélange gazeux comprenant 0% d'O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> et 95% de N<sub>2</sub> (Air Products SAHOS, Paris, France). Les phases de normoxie ou de réoxygénation sont effectuées dans un incubateur classique (21% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 95% d'eau, 37°C). Ce modèle débute par 45 min. de normoxie, comprend 6 cycles de 1 heure, alternant 30 min. d'hypoxie et 30min. de normoxie et se termine par 45 min. de normoxie.



**Figure 13 : photo du caisson hermétique, permettant une alternance entre FiO<sub>2</sub> à 0,5-1% et 21%, et représentation schématique des cycles d'HI.**

### **3.1.2 Validation :**

3 points ont été validés dans le travail précédent.

1) le fait que la pression générée lors de l'introduction du gaz dans l'enceinte ne créait pas de barotraumatisme. La variation de la pression n'excédait pas 0,04 bar et était donc négligeable.

2) l'étanchéité du système. La FiO<sub>2</sub> de l'air mesurée dans l'enceinte a été analysée à l'aide d'un analyseur de gaz (Radiometer Copenhagen ABL520, Villeurbanne, France). Les échantillons de gaz ont été prélevés en début et fin de séquence d'hypoxie. Ces mesures de contrôle ont été réalisées à chaque expérience.

Elles ont permis de s'assurer de la constance du taux en oxygène compris entre 0,5 et 1% en condition hypoxique.

3) la viabilité cellulaire en normoxie et dans le modèle d'HI. Celle-ci a été réalisée par un test d'exclusion au bleu trypan. Les pourcentages de cellules vivantes mesurés au cours du temps dans le modèle d'hypoxie intermittente étaient équivalents à ceux mesurés en normoxie.

Ce modèle nous a permis d'éviter tout shear stress, d'obtenir suffisamment de matériel (quantité de sous-nageant) afin de doser divers médiateurs de l'inflammation, et ce tout en gardant des mesures d'asepsie. Certes, les cycles d'HI sont relativement longs mais ils sont identiques à ceux utilisés par les équipes de Lavie, et Gozal (Dyugovskaya, L. 2008; Gozal, E. 2005).

### **3.2 Cultures cellulaires :**

Lors d'un travail préliminaire, nous avons étudié la réponse des cellules épithéliales respiratoires des voies aériennes de conduction et d'échange, issues soit de lignées, soit de culture primaire, c'est-à-dire respectivement 16Hbe, cellules épithéliales nasales humaines

(CENH) (collaboration intra-équipe avec E. Escudier et A. Coste), A549, H441 et pneumocytes II de rat (d'Ortho, M.-P. 1997). Les premiers résultats n'ont permis de mettre en évidence une réponse inflammatoire que pour les CENH. Cette réponse à l'hypoxie intermittente semble donc dépendre à la fois de l'étage considéré de l'arbre aérien (bronchique versus alvéolaire) et de l'origine des cellules (primaire versus lignée).

Les expériences suivantes ont été réalisées avec le type cellulaire le plus pertinent pour l'étude de l'inflammation de l'arbre trachéo bronchique : les CENH. Ces cellules ont été obtenues à partir de polypes nasaux de patients. Elles sont cultivées en interface air-liquide et se différencient en une semaine en un épithélium trachéobronchique, caractérisé par la présence de cellules ciliées et sécrétoires.

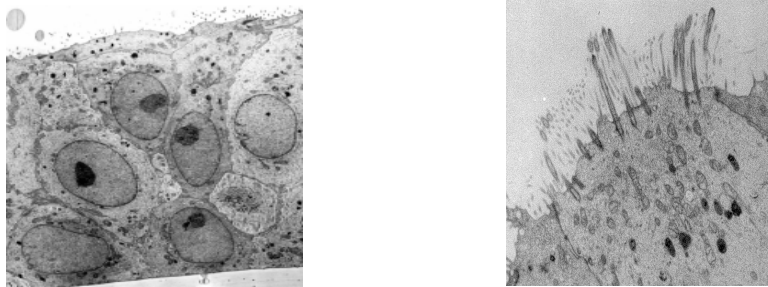


Figure 14 : vues en microscopie électronique de CENH (A) à J5, constitution d'un épithélium pseudostratifié, (B) > J7, apparition de cellules sécrétoires et de cellules ciliées.

Les paramètres électrophysiologiques (résistance de la couche cellulaire et différence de potentiel transépithélial, ddp) sont mesurés deux fois par semaine avec un microvoltmètre (EVOM<sup>®</sup>, World Precision Instrument, GB). A la fin de la première semaine, la résistance électrique des cultures se stabilise à des valeurs élevées (entre 700 et 1100  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ) confirmant la bonne étanchéité du tapis cellulaire et suggérant l'établissement de jonctions serrées. Les différences de potentiel transépithélial atteignent -40mV, témoignant de la mise en place de transports ioniques. Ce modèle est de longue date utilisé au sein de notre

équipe (Botterel, F. 2002; Coste, A. 2000; Lechapt-Zalcman, E. 2006; Pruliere-Escabasse, V. 2005). Toutes les expériences que nous avons réalisées ont utilisé des CENH entre les 14<sup>ième</sup> et 21<sup>ième</sup> jour de culture.

Parallèlement à l'utilisation des CENH, nous avons utilisé dans le deuxième article des cellules musculaires lisse bronchiques primaires humaines d'origine commerciale (Lonza, Basel, Switzerland) (Bosse, Y. 2006; Nishihara-Fujihara, M. 2010). L'utilisation de ces deux types cellulaires primaires humaines nous permettent d'éliminer les biais potentiels de la différence d'espèce, et celui de la lignée cellulaire.

### **3.3 Résultats complémentaires :**

#### **3.3.1 Immunomarquage:**

Les CENH, ensemencées sur des filtres de 1 cm<sup>2</sup> (pores de 0,4µm) (Transwell Clear, Costar, USA) sont exposées à 6 heures de normoxie, d'HI ou d'hypoxie chronique. Les filtres sont ensuite découpés, fixés au méthanol froid pendant 30 min., lavés trois fois avec du phosphate buffer saline (PBS) et laissées pendant 30 min. dans de l'albumine à 5%. Ils sont ensuite incubés avec l'anticorps primaire dirigé soit contre l'unité p50 NFκB (anticorps polyclonal de lapin), soit contre HIF-1α (anticorps monoclonal de souris), pendant 1 heure (Santa Cruz, TEBU BIO, Le Perray en Yvelines, France).

Les lames sont lavées 3 fois avec du PBS puis incubées avec le second anticorps couplé à un fluorochrome (Molecular Probes®, Invitrogen Life Technologies, Cergy-Pontoise, France) pendant 30 min.. Pour NFκB, l'anticorps secondaire était un anticorps de chèvre anti-lapin couplé à l'Alexa fluor® 568, pour HIF1α, l'anticorps secondaire était un anticorps de chèvre anti-souris couplé à l'Alexa fluor® 488. Après 3 lavages supplémentaires, les noyaux furent colorés avec du SYTOX® Green pour NFκB ou orange pour HIF1α (Invitrogen Life Technologies, Cergy-Pontoise, France). Nous avons effectué un montage entre lame et lamelle. L'observation s'est faite au microscope confocal CLSM – 510 – META (Carl Zeiss, Le Pecq, France).

### **3.3.2 Magnétocytométrie :**

En complément de l'évaluation du cytosquelette des CMLB par imagerie (marquage à l'actine), nous avons mené une évaluation dynamique par magnétocytométrie.

Cette technique permet d'évaluer les propriétés mécaniques des cellules en culture, et plus spécifiquement la rigidité de leur cytosquelette. Pour cela, des microbilles ferromagnétiques sont préalablement recouvertes d'un ligand peptidique spécifique capable d'interagir avec des récepteurs membranaires de type intégrine puis incubées avec les CMLB. Une fois fixées, les billes sont magnétisées dans une direction horizontale par un champ magnétique élevé, puis mises en rotation par un deuxième champ magnétique beaucoup plus faible et perpendiculaire au premier.

Cela permet d'évaluer l'angle de rotation des billes qui sera d'autant plus important que le cytosquelette est déformable. Il est ainsi possible de définir, par la relation entre la contrainte mécanique appliquée (champ magnétique perpendiculaire) et la déformation (c'est-à-dire l'angle de rotation), la rigidité du cytosquelette.



## 4 Articles :

### 4.1 Article 1 :

(soumis)

#### **Role for Human Epithelial Cells in Intermittent Hypoxia-Induced Airway Inflammation**

C. Philippe<sup>12</sup>, MD, Y. Boussadia<sup>3</sup>, BSc, H. Lepetit<sup>4</sup>, PhD, V. Prulière-Escabasse<sup>156</sup>, MD, PhD, JF Papon<sup>156</sup>, MD, PhD, C. Clérici<sup>3910</sup>, MD, PhD, D. Isabey<sup>1</sup>, PhD, A. Coste<sup>156</sup>, MD, PhD, E. Escudier<sup>78</sup>, MD, PhD, MP d'Ortho<sup>910</sup>, MD, PhD.

- 1- INSERM, U955, Equipe 13, Créteil, 94000, France
- 2- AP-HP, Hôpital Tenon, Service d'Explorations Fonctionnelles, Paris, 75020, France
- 3- INSERM U773, Equipe 8, Paris, 75018, France
- 4- URC, Créteil Paris Est, Créteil, 94000, France
- 5- Centre Hospitalier Intercommunal de Créteil, Service d'ORL, Créteil, 94000, France
- 6- Université Paris Est, Faculté de Médecine, Créteil, 94000, France
- 7- INSERM U933, Paris, 75012, France
- 8- AP-HP, Hôpital Armand-Trousseau, Service de Génétique et Embryologie Médicales, Paris, 75012, France.
- 9- AP-HP, Hôpital Bichat, Service de Physiologie - Explorations Fonctionnelles, Paris, 75018.
- 10- Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, F-75018 Paris, France

**Corresponding author:** C. Philippe, Service d'Explorations Fonctionnelles, Hôpital Tenon, 4 rue de la Chine, Paris 75020, France

Phone : 33 1 56 01 67 74; Fax: 33 1 56 01 70 03

E-mail: carole.philippe@tnn.aphp.fr

**Sources of funding:** This work was funded by the nonprofit Air-Liquide Foundation.

**Word count (body of manuscript): 2905**

### **Abbreviations**

AHI, apnea/hypopnea index

CPAP, continuous positive airway pressure

FCS, fetal calf serum

HNECs, human nasal epithelial cells

IHx, intermittent hypoxia

IL, interleukin

MMP, matrix metalloproteinases

OSAS, obstructive sleep apnea syndrome

PBS, phosphate buffer saline

PDGF, platelet-derived growth factor

SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

TNF, tumor necrosis factor

VEGF, vascular endothelial growth factor

## **Abstract**

**Background:** Obstructive sleep apnea is associated with systemic inflammation related to intermittent hypoxia. Whether the increased neutrophil and IL-8 levels in induced sputum reflect systemic inflammation or airway inflammation is unknown.

**Objective:** To assess the potential role for airway epithelial cells in airway inflammation induced by intermittent hypoxia.

**Methods:** Human nasal epithelial cells were cultured at an air-liquid interface allowing differentiation to airway epithelial cells. After intermittent hypoxia, epithelial cell-conditioned media were assessed for matrix metalloproteinase expression, growth factors, and cytokines. Chemotactic effects of conditioned media on human neutrophils were evaluated. Direct effects of intermittent hypoxia on migration of neutrophils from healthy volunteers and obstructive-sleep-apnea patients were compared.

**Results:** Intermittent hypoxia for 24 hours significantly increased MMP-9 and MMP-2 expression and pro-MMP-9 activation ( $P<0.05$ ), IL-8 ( $5112\pm3923$  versus  $2455\pm2738$  pg/ml,  $P<0.05$ ), PDGF AA ( $396\pm225$  versus  $189\pm73$  pg/ml,  $P<0.05$ ), and VEGF ( $1250\pm993$  versus  $220\pm229$  pg/ml,  $P<0.05$ ) compared to normoxia. TGF $\alpha$ , TGF $\beta$ , IL-1, and IL-6 were unchanged. Neutrophil chemotaxis was dramatically enhanced by conditioned media ( $112.00\pm4.80\%$  versus  $0.69\pm0.43\%$ ,  $P=0.0053$ ). Intermittent hypoxia increased spontaneous and IL-8-induced neutrophil migration. Migration was greater with neutrophils from patients than from controls.

**Conclusion:** These data suggest a specific inflammatory response of human nasal epithelial cells to intermittent hypoxia, independently from systemic events. In patients with obstructive sleep hypoxia, the systemic response to intermittent hypoxia may amplify the local inflammatory response.

### **Key Messages**

- Intermittent hypoxia induced a specific inflammatory response in the airway epithelium in an in vitro model of primary human nasal epithelial cell cultures.
- Intermittent hypoxia acted by increasing the release of IL-8, which enhanced neutrophil migration, and of other mediators such as PDGF AA, VEGF, and gelatinases.
- The systemic inflammation seen in obstructive sleep apnea syndrome may potentiate the local inflammatory airway response to intermittent hypoxia.

### **Capsule summary**

In an in vitro model of primary human nasal cell cultures, intermittent hypoxia induced local inflammation by increasing the release of IL-8 (thereby potentiating neutrophil migration) and other mediators.

**Keywords:** airway epithelial cells, neutrophils, intermittent hypoxia, inflammation, sleep apnea syndrome

## INTRODUCTION

Obstructive sleep apnea syndrome (OSAS) is characterized by episodes of upper airway collapse during sleep, which cause oxygen desaturation. Thus, OSAS results in cyclic intermittent hypoxia (IHx). The repeated cycles of brief hypoxia followed by rapid re-oxygenation preferentially activate inflammatory pathways, most notably those mediated by NF- $\kappa$ B. The activated inflammatory cells release various proinflammatory mediators. Numerous studies have shown that OSAS patients have higher levels of circulating proinflammatory cytokines (notably TNF $\alpha$ ), chemokines (IL-8), and adhesion molecules compared to matched controls (1-4) and that these high levels fall significantly with continuous positive airway pressure (CPAP) therapy (5).

To date, studies evaluating the impact of OSAS on airway inflammation used only sputum and breath condensates. Compared to breath condensates from controls, those from OSAS patients contained higher IL-6 concentrations and higher levels of the oxidative stress marker 8-isoprostane (6). The levels of both proinflammatory cytokines correlated positively with the apnea/hypopnea index (AHI) (6). In induced sputum from OSAS patients, the percentage of neutrophils was elevated compared to controls (7). IL-8 concentrations in induced sputum from OSAS patients were also elevated and correlated with the AHI (8). Finally, compared to healthy individuals, obese and non-obese OSAS patients had significantly increased levels of IL-8 and intercellular cell adhesion molecule-1 in plasma and exhaled gas, as well as higher neutrophil percentages in induced sputum (9).

Neutrophils are both a target and a source of various proinflammatory cytokines and chemokines. Many studies in patients with chronic pulmonary disease have established that

increased neutrophil infiltration of the airway is associated with significant IL-8 release by airway cells (10). Moreover, neutrophils produce large amounts of proteases, which degrade the extracellular matrix. Therefore, neutrophils undoubtedly play a key role in tissue remodeling.

Here, our objectives were to evaluate the potential role for airway epithelial cells in initiating IHx-induced inflammation. We used an in vitro model to allow an evaluation of local effects independently from systemic inflammation. In conditioned media of primary cultures of human nasal epithelial cells (HNECs), we measured cytokines, growth factor secretion, and matrix metalloproteinase (MMP) secretion under normoxia and IHx. We assessed the chemotactic properties of HNEC-supernatants on neutrophils from healthy individuals and we compared spontaneous and IL-8-induced neutrophil migration under normoxia and IHx.

## **METHODS**

### **1) Biological sample collection**

HNECs were obtained from adults undergoing surgery for nasal polyposis. The diagnosis of primary nasal polyposis was established based on the clinical history, endoscopic findings, and computed tomography images. Patients were asked to stop general and/or local nasal treatment one month before surgery. None of the patients had a history of allergic disease.

Neutrophils were obtained from peripheral blood of 15 patients with OSAS diagnosed by polysomnography. The controls were 10 healthy nonsmokers who had normal findings by pulse oximetry during sleep (Nonin-3100, Taema, Antony, France) and a negative history for sleep-related symptoms (i.e., snoring, witnessed apneas, or excessive daytime sleepiness) and. Noninclusion criteria were known cancer, chronic obstructive pulmonary disease, known hypertension or other cardiovascular disease, collagen vascular disease, and systemic infection within the last 2 weeks.

The study protocol was approved by the institutional review board of our institution (Comité Consultatif de Protection des Personnes pour la recherche biomédicale, CCPPRB, Hôpital Henri Mondor). Informed consent was obtained from all patients before the study.

### **2) Cell culture**

#### **Primary HNEC cultures**

Nasal polyposis samples were cultured at an air-liquid interface adapted from a culture model originally described with human tracheobronchial cells (11) and developed and

characterized in our INSERM unit over many years (12). Briefly, the samples were placed immediately in DMEM-Ham's F-12 (Invitrogen Life Technologies, Cergy-Pontoise, France) containing antibiotics (100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin, 2.5 µg/mL amphotericin B, and 100 mg/mL gentamicin), at 4°C, and transported to the laboratory. The samples were rinsed in phosphate buffer saline (PBS) with dithiothreitol (5 nM) then placed overnight at 4°C in a PBS-antibiotics solution containing 0.1% pronase (Sigma, St Quentin Fallavier, France). After pronase neutralization by incubation in DMEM/F12 with 5% fetal calf serum (FCS, Invitrogen, Gibco, Cergy-Pontoise, France), the cell pellets were resuspended in 0.25% trypsin-EDTA solution for 3 min and incubated in DMEM/F12-antibiotics with 5% FCS before centrifugation (300g, 7 min) and re-suspension.

Finally, the HNECs were plated ( $1 \cdot 10^6$  cells/insert) on permeable Transwell® supports (Transwell Clear, Costar, USA) previously coated with collagen IV (10-20 µg/cm<sup>2</sup>). For the first 24 h, HNECs were incubated in 1 mL of DMEM/F12-antibiotics with 2% Ultrosor G outside the insert and DMEM/F12-antibiotics with 5% FCS inside the insert. After 24 h, the medium inside the insert was removed to place the cells at an air-liquid interface. The medium outside the insert was changed daily.

Transepithelial resistance (about 1100 W·cm<sup>2</sup>, indicating the development of tight junctions) and transepithelial potential difference (-40 mV from the 4th day onward, indicating the existence of ion transport) were measured every 3 days using a microvoltmeter.



A well-differentiated state was reached after the first week, with the presence of ciliated and secretory cells. All experiments were performed using 14- to 21-day-old HNEC cultures, in which cell differentiation was stable.

### **Neutrophil preparation**

Blood was drawn in sterile disposable syringes containing EDTA. Plasma and neutrophils were separated using Ficoll-plaque™ (GE healthcare, Paris, France) according to the manufacturers' instructions. Neutrophil purity was assessed using the May-Grünwald Giemsa technique. The neutrophils were resuspended in serum-free medium at a concentration of  $2.5 \cdot 10^6$  cells/mL.

Importantly, all assays were conducted by investigators who were unaware of group status.

## **3) Intermittent hypoxia model**

### **Cell exposure to intermittent hypoxia**

IHx exposure consisted in six cycles of 30 min of hypoxia followed by 30 min of normoxia. Hypoxia was achieved by purging a humidified hermetic box with a hypoxic gas mixture of 0% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, and 95% N<sub>2</sub> (Air Products SAS, Paris, France). The oxygen concentration dropped to 0.5% 7 minutes after switching to hypoxia. A normoxic control experiment was run in parallel by keeping the cells under normoxia throughout the 6-hour

period. Chronic hypoxia was obtained by keeping the cells under hypoxia with the same gas mixture as for IHx for 6 hours.

The supernatants samples were collected after 6 h and 24 h and stored at -80°C.

#### **4) Soluble mediators: cytokines and gelatinases**

##### **Cytokine assays**

IL-8, IL-1 $\beta$ , IL-6, platelet-derived growth factors (PDGFs) AA and AB, TGF $\alpha$ , TGF $\beta$  (-1, -2, and -3), and vascular endothelial growth factor (VEGF) were measured in supernatants using the Milliplex Human Cytokine panel (Millipore, Molsheim, France) and the microassay platform at the Institut de Recherche en Santé, IFR65, Paris, France. Data were expressed as protein concentrations (pg/mL). Assays were done in duplicate.

##### **Gelatinase expression**

Basal HNEC gelatinase expression was detected using zymography on gelatine SDS-PAGE as previously described (13). This method detects both activated and latent forms of MMPs. We loaded 10-20  $\mu$ L of supernatants onto lanes of an 8% SDS-polyacrylamide gel with 1 mg/mL gelatin. Separation was by electrophoresis under nonreducing conditions. The gel was then washed for 30 min in 2.5% Triton X-100 and incubated overnight at 37°C in a buffer (100 mM Tris/HCL, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.6). After Coomassie Brilliant Blue R250 0.5% staining, gelatine-degrading enzymes were identified as clear zones against a blue background. Molecular masses of gelatinolytic bands were estimated using prestained

molecular mass markers. Quantitative evaluation was done using Image J software (NCBI, National Center for Biotechnology Information, NIH, Bethesda, USA).

## 5) Neutrophil migration assay

We used two methods to evaluate neutrophil chemotaxis.

### Chemotaxis on agarose

Agarose plates were assessed using the Nelson RD method (14). Agarose (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) was dissolved in sterile distilled water by heating in a boiling water bath for 10 minutes. After cooling to 48°C, the agarose was mixed with an equal volume of MEM 2X 137 mg of MgCl<sub>2</sub>, and 10% FCS. Agarose medium, 5 mL, was poured into a tissue culture dish (3 cm in diameter), allowed to harden, and transferred at 4°C for 30 minutes. Then, 12 equidistant wells were created using a biopsy punch.

The center well received a 4- $\mu$ L volume of the cell suspension containing 10<sup>6</sup> purified neutrophils. The inner well received 4  $\mu$ L of PBS (control medium) and the outer well either 4  $\mu$ L of fMLP 1  $\mu$ M (formyl-Met-Leu- Phe) as a positive control or 4  $\mu$ L of supernatants. After 2 h incubation at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> in air, the cells were fixed by addition of 3 mL absolute methanol for 30 minutes. The gel was then removed and the plates stained using the May-Grünwald Giemsa technique. Migration was measured as the linear distance traveled by the cells from the margin of the center well toward the chemotactic factor or control medium. Migration was expressed as the ratio of the distance traveled from the center well to the test well over the total distance between these two

wells. Results were as means of three independent experiments, each conducted in quadruplicate.

### **Chemotaxis across a membrane**

Migration assays were done in Transwell<sup>®</sup> inserts (8.0  $\mu\text{m}$  pore size) (Corning, VWR, Strasbourg, France) coated with solubilized basement membrane preparation extracted from Engelbreth-Holm-Swarm mouse sarcoma, diluted 1:4. The lower chambers were filled with serum-free medium, with or without 25 ng/mL of IL-8 (R&D Systems, Lille, France). Neutrophils were added to the upper chamber and allowed to migrate for 3 h under either normoxia or IHx. Each condition was run in duplicate. Migration was evaluated as the number of neutrophils in the lower chamber.

### **6) Statistical analysis**

Data were expressed as means $\pm$ SD. The Wilcoxon rank sum test was used for assessing differences between nonparametric data. The significance of between-group differences for quantitative variables was determined using the Kruskal-Wallis test followed by the Mann-Whitney U-Test. We used Statview 5.0 (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA). *P* values equal to or smaller than 0.05 were considered statistically significant.

## RESULTS

### HNEC inflammatory response induced by intermittent hypoxia

#### *Cytokine secretion*

No differences were found between normoxia and IHx regarding the production of TGF $\alpha$ , TGF $\beta$ , IL-1 $\beta$ , or IL-6. Figure 1 shows that IL-8 secretion by HNECs was increased after 24 h with IHx compared to normoxia, while no difference was observed after 6 h. Similarly, IHx exposure increased the release of PDGF AA and VEGF in the supernatants (Figure 1). When HNECs were exposed to continuous hypoxia for 6 h, the only significant difference after 24 h was an increase in VEGF secretion versus normoxia (726.2 $\pm$ 538 pg/mL versus 272.5 $\pm$ 259,  $P$ <0.05).

#### *Gelatinase expression*

After 6 h, MMP-9 was detected in its latent 92-kDa form without any significant difference between normoxia and IHx. MMP-2 was not detected in either condition. After 24 h, 92 kD pro-MMP-9 was significantly increased ( $P$ <0.05) and its active 88-kDa form was present in IHx supernatants compared to normoxic supernatants (Figure 2). IHx was also associated with a significant increase in 72 kD pro-MMP-2 expression compared to normoxia ( $P$ <0.05).

### Induction of neutrophil migration by HNEC supernatants

IHx supernatants induced strong chemoattraction of neutrophils compared to normoxic supernatants (112.00 $\pm$ 4.80% versus 0.69 $\pm$ 0.43%,  $P$ =0.0053). This chemotactic response was similar to that induced by fMLP (Figure 3).

### **Neutrophil response to intermittent hypoxia**

This experiment was done in 25 men including 15 patients with newly diagnosed OSAS, and 10 healthy volunteers. The two groups were similar for age, diabetes mellitus, hyperlipidemia, and smoking status. As expected, body mass index was significantly higher in the OSAS group (Table 1).

With neutrophils from healthy controls, IHx significantly enhanced migration compared to normoxia (Figure 4A). Adding IL-8 significantly increased neutrophil migration and potentiated the effect of IHx (Figure 4A). IHx alone had similar effects on neutrophils from healthy controls and from OSAS patients (Figure 4B). IL-8, in contrast, induced a greater increase in migration of neutrophils from OSAS patients than from healthy controls. Similarly, the migration increase induced by concomitant exposure to IHx and IL-8 was significantly greater in the OSAS group.

## DISCUSSION

Our main finding was that IHx induced IL-8 release by HNECs. Other soluble mediators were also increased, including PDGF AA, VEGF, and gelatinases. The released IL-8 was active, as shown by the ability of supernatants to induce neutrophil migration. In addition, IHx alone induced neutrophil migration, and IHx and IL-8 had an additive effect on neutrophil migration.

In our study, IHx consisted in six cycles of 30 min of hypoxia and 30 min of normoxia. In human OSAS, the episodes of hypoxia last less than 1 min. In a model similar to ours, with three or six cycles of 35 min of hypoxia followed by 25 min of normoxia, neutrophil apoptosis was delayed (15). In keeping with the results of this study (15), soluble mediator release by HNECs exposed to IHx differed clearly in our study from that seen with sustained hypoxia. A model involving very short periods of hypoxia and reoxygenation was used in studies of endothelial cells, but preconditioned hypoxic medium was also necessary to obtain a cell response (16).

A major strength of our study is the use of primary cultures from human samples. The use of human cells eliminated potential bias due to interspecies differences. The use of primary cultures instead of cell lines ensured that the cell responses were not linked to transformation. Another important strength is our use of an air-liquid interface, which allows epithelial cell differentiation and mimics the *in vivo* airway epithelium (17). Our cell cultures contained ciliated and secretory cells characteristic of an airway epithelium. In addition, the air-liquid interface allowed full exposure to hypoxic conditions without potential bias due to variations in oxygen diffusion through the supernatants.

To our knowledge, this is the first study demonstrating a direct effect of IHx on respiratory epithelial cells. Airway inflammation in response to OSAS has been investigated only by using sputum or breath condensates (6-9). The cardiovascular co-morbidities associated with OSAS prompted numerous in vitro studies of IHx effects on endothelial cells (16). Increased IL-8 secretion by endothelial cells was demonstrated in vitro (18). In accordance with this finding, supernatants from IHx-exposed HNECs increased neutrophil migration.

Other proinflammatory soluble factors were increased in our model, such as MMP2 and MMP9, PDGF AA, and VEGF. MMPs are known to promote extracellular matrix remodeling and to participate in inflammatory processes via shedding activity (24). PDGF AA is a potent mitogen involved in bronchial smooth muscle cell proliferation (25). VEGF production by HNEC has been reported previously (12). Interestingly, VEGF may contribute to bronchial inflammation (26).

Other cytokines including TGF $\alpha$ , TGF $\beta$ , and IL-1 were unchanged in our mode, but were elevated in diseases such as chronic obstructive pulmonary disease (COPD) (27) and asthma (28). Thus, the profile of inflammation may vary across diseases.

We found that IHx not only contributed to activate HNECs, but also induced neutrophil migration when used alone. Previous studies found several other effects of IHx on neutrophils. Circulating neutrophils from OSAS patients produced larger amounts of reactive oxygen species than those from controls, and this effect was reversed by CPAP therapy (29). In another study, IHx increased the production of intracellular reactive oxygen species in some granulocyte populations (4). Moreover, neutrophil apoptosis, an injury-limiting mechanism, was delayed in patients with OSAS (15), COPD (30) or unstable angina (31). The



delay in apoptosis involved the NF- $\kappa$ B and p38-MAPK signaling pathways and the cytokines TNF $\alpha$  and IL-8 (32). Altogether, these results indicate that IHx activates the neutrophils, which then express selectins and exhibit delayed apoptosis, two changes that may promote endothelial injury. The studies conducted until now focused on these alterations inasmuch as they may relate to cardiovascular disease associated with OSAS. Here, we obtained evidence that IHx contributed to airway inflammation both directly by activating airway epithelial cells and indirectly by promoting local neutrophil chemoattraction.

We found that IHx and IL-8 had additive effects on neutrophil migration in vitro. In keeping with this result, neutrophils from OSAS patients showed greater migration than those from controls. The migration increase seen in response to the IHx/IL-8 combination was more marked in neutrophils from OSAS patients than in those from healthy controls.

Epithelial cells have been reported to contribute to airway inflammation in other diseases such as asthma and COPD (19). Primary bronchial epithelial cells from COPD patients showed significant upregulation of IL-8 expression levels and secretion, compared to healthy smokers or non-smokers (20). This up-regulation was increased during disease exacerbations (21). Up-regulation of IL-8 production has also been shown in bronchial epithelial cells of patients with asthma (22). In a recent study, the intraepithelial expression of IL-8 mRNA in asthma patients was increased in smokers compared with nonsmokers (23). Our study shows that IHx is among the stressful conditions capable of inducing an inflammatory HNEC response that includes IL-8 secretion. Although far less severe, the bronchial inflammation seen in OSAS shares some similarities with that seen in COPD patients and in some subpopulations of patients with asthma. The cytokine levels in bronchoalveolar lavage fluid or sputum correlate with the number of inflammatory cells,

most notably neutrophils, and with disease severity (33). Activated neutrophils can cause lung destruction through the release of oxygen radicals and MMP (34). The result is a remodeling process that includes epithelial damage, glandular hyperplasia, subepithelial fibrosis, smooth muscle hyperplasia/hypertrophy, and angiogenesis (22). These changes have been implicated in the decline in pulmonary function (35). No study to date has demonstrated such histological changes in the bronchi of OSAS patients, but decreases in forced expiratory flows correlating negatively to OSAS severity have been reported. This correlation persisted when smoking history was taken into account, suggesting OSAS as an independent risk factor for small-airway disease (36).

Altogether, these results suggest synergistic effects of neutrophil and HNEC activation by IHx to promote neutrophil migration in the airways. These mechanisms may promote airway remodeling and bronchial hyperreactivity.

## **CONCLUSION**

IHx induced a specific inflammatory response in airway epithelial cells independently from systemic influences, explaining the neutrophil influx in sputum found in OSAS patients. Neutrophils activated by IHx result in synergistic effects that also contribute to the remodeling process.

## **Acknowledgements**

We warmly thank D. Bokar-Thire and L. Margarit for their technical assistance.

## References

- 1- Ryan S, Taylor CT, McNicholas WT. Predictors of elevated nuclear factor kappaBdependent genes in obstructive sleep apnea syndrome. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2006;174: 824–830.
- 2- Minoguchi K, Tazaki T, Yokoe T, Minoguchi H, Watanabe Y, Yamamoto M et al. Elevated production of tumor necrosis factoralpha by monocytes in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Chest* 2004;126:1473–1479.
- 3- Ciftci TU, Kokturk O, Bukan N, Bilgihan A. The relationship between serum cytokine levels with obesity and obstructive sleep apnea syndrome. *Cytokine* 2004;28:87–91.
- 4- 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;165:934–9.
- 5- Ohga E, Tomita T, Wada H, Yamamoto H, Nagase T, Ouchi Y. Effects of obstructive sleep apnea on circulating ICAM-1, IL-8, and MCP-1. *J Appl Physiol* 2003;94:179–84.
- 6- Carpagnano GE, Kharitonov SA, Resta O, Foschino-Barbaro MP, Gramiccioni E, Barnes PJ. Increased 8-Isoprostane and Interleukin-6 in Breath Condensate of Obstructive Sleep Apnea Patients. *Chest* 2002;122:1162-1167.
- 7- Salerno FG, Carpagnano E, Guido P, Bonsignore MR, Roberti A, Aliani M, Vignola AM, Spanevello A. Airway inflammation in patients affected by obstructive sleep apnea syndrome. *Respiratory Medicine* 2004;98:25-28.

- 8- Devouassoux G, Lévy P, Rossini E, Pin I, Fior-Gozlan M, Henry M et al. Sleep apnea is associated with bronchial inflammation and continuous positive airway pressure–induced airway hyperresponsiveness. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119(3):597-603.
- 9- Carpagnano GE, Spanevello A, Sabato R, Depalo A, Palladino GP, Bergantino L et al. Systemic and air way inflammation in sleep apnea and obesity: the role of ICAM-1 and IL-8. *Translational Research* 2010;155:35-43.
- 10- Woolhouse IS, Bayley DL, Stockley RA. Sputum chemotactic activity in chronic obstructive pulmonary disease: effect of alpha(1)-antitrypsin deficiency and the role of leukotriene B(4) and interleukin 8. *Thorax* 2002;57:709-14.
- 11- Gruenert D, Finkbeiner W, and Widicombe J. Culture and transformation of human airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 1995;268: L347-L360.
- 12- Coste A, Brugel L, Maître B, Boussat S, Papon JF, Wingerstmann L, Peynègre R, Escudier A. Inflammatory cells as well as epithelial cells in nasal polyps express vascular endothelial growth factor. *Eur Respir J* 2000; 15: 367-372.
- 13- d'Ortho MP, Clerici C, Yao PM, Delacourt C, Delclaux C, Franco-Montoya ML, Harf A, Lafuma C. Alveolar epithelial cells in vitro produce gelatinases and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2. *Am J Physiol* 1997; 273:L663-75.
- 14- Nelson RD, Quie PG, Simmons RL. Chemotaxis under agarose: a new and simple method for measuring chemotaxis and spontaneous migration of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes. *J. Immunol* 1975;115(6):1650-56.
- 15- Dyugovskaya L, Polyakov A, Lavie P, Lavie L. Delayed PMN Apoptosis in Patients with Sleep Apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;177:544-554.

- 16- Ryan S, Taylor CT, McNicholas WT. Selective activation of inflammatory pathways by intermittent hypoxia in obstructive sleep apnea syndrome. *Circulation* 2005;112:2660–67.
- 17- Botterel F, Cordonnier C, Barbier V, Wingerstmann L, Liance M, Coste A, et al. *Aspergillus fumigatus* causes in vitro electrophysiological and morphological modifications in human nasal epithelial cells. *Histol Histopathol* 2002;17(4):1095-101
- 18- Polotsky VY, Savransky V, Bevans-Fonti S, Reinke C, Li J, Grigoryev N et al. Intermittent and sustained hypoxia induce a similar gene expression profile in human aortic endothelial cells. *Physiol Genomics* 2010;41:306-314.
- 19- Wouters EFM, Reynaert NL, Dentener MA, Vernooij JHJ. Systemic and local Inflammation in Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Is there a connection ? *Proc Am Thorac Soc* 2009;(6):638-647.
- 20- Schulz C, Wolf K, Harth M, Krätzel K, Schughart LK, Pfeifer M. Expression and release of Interleukin-8 by human bronchial epithelial cells from patients with chronic obstructive pulmonary disease, smokers, and never smokers. *Respiration* 2003;70:254-261.
- 21- Qiu Y, Zhu J, Bandi V, Atmar RL, Hattotuwa K, Guntupalli KK et al. Biopsy PMNia, PMN Chemokine and Receptor Gene Expression in Severe Exacerbations of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168-:968-975.
- 22- Marini M, Vittori E, Hollemborg J, Mattoli S. Expression of the potent inflammatory cytokines, granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor and interleukin-6 and interleukin-8, in bronchial epithelial cells of patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1992;89(5):1001-9.
- 23- St-Laurent J, Bergeron C, Pagé N, Couture C, Laviolette M, Boulet L-P. Influence of smoking on airway inflammation and remodeling in asthma. *Clin and Exp Allergy* 2008;38:1582-1589.

- 24- Löffek S, Schilling O, Franzke CW. Biological role of matrix metalloproteinases : a critical balance. *Eur Respir J*, 2011;38:191-208.
- 25- Bossé Y, Thompson C, Stankova J, Rola-Pleszczynski M. Fibroblast growth factor 2 and transforming growth factor beta1 synergism in human bronchial smooth muscle cell proliferation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2006 Jun;34(6):746-53.
- 26- Lee YC, Kwak YG, Song CH. Contribution of vascular endothelial growth factor to airway hyperresponsiveness and inflammation in a murine model of toluene diisocyanate-induced asthma. *Immunol*. 2002;168(7):3595-600.
- 27- Wu L, Chau J, Young RP, Pokorný V, Mills GD, Hopkins R et al. Transforming growth factor-beta1 genotype and susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*.2004;59:126-9.
- 28- Kumar RK, Herbert C, Foster PS. Expression of growth factors by airway epithelial cells in a model of chronic asthma: regulation and relationship to subepithelial fibrosis. *Clin Exp Allergy* 2004;34:567-75.
- 29- Schulz R, Mahmoudi S, Hattar K, Sibelius U, Olschewski H, Mayer K et al. .Enhanced release of superoxide from polymorphonuclear PMN in obstructive sleep apnea. Impact of continuous positive airway pressure therapy. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;162:566-70.
- 30- Brown V, Elborn JS, Ennis M. Dysregulated apoptosis and NFkappaB expression in COPD subjects. *Respir Res* 2009;18:10-24.
- 31- Biasucci LM, Liuzzo G, Giubilato S, Della Bona R, Leo M, Pinnelli M, et al. Delayed PMN apoptosis in patients with unstable angina: relation to C-reactive protein and recurrence of instability. *Eur Heart J*. 2009;30(18):2220-5.

- 32- Dyugovskaya L, Polyakov A, Ginsberg D, Lavie P, Lavie L. Molecular pathways of spontaneous and TNF- $\alpha$ -mediated PMN apoptosis under intermittent hypoxia. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2011;45(1):154-62.
- 33- Wouters EFM. Local and systemic inflammation in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Proc Am Thorac Soc* 2005;(2)26-33.
- 34- Brusselle G, Joos GF, Bracke KR. New insights into the immunology of chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* 2011;378:1015-26.
- 35- Di Stefano A, Capelli A, Lusuardi M, Balbo P, Vecchio C, Maestrelli P et al. Severity of airflow limitation is associated with severity of airway inflammation in smokers. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;158(4):1277-85.
- 36- Zerah-Lancner F, Lofaso F, Coste F, Ricolfi F, Goldenberg F, Harf A. Pulmonary Function in Obese Snorers with or without Sleep Apnea Syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997;156:522-27.

**Table 1 Characteristics of patients and controls whose neutrophils were tested for migration induced by intermittent hypoxia**

	Healthy controls	OSAS patients
Nb. of patients	10	15
Age, years	37.8±3.6	50.1±3.6
BMI, kg/m <sup>2</sup>	23.8±0.7	27.7±0.8*
AHI, events/h	ND	43.7±0.8***
SpO <sub>2</sub> <90%, min.	0	70.3±30.5**
Desaturation index (events/h)	1.4±0.4	30.7±30.5**
Lowest SpO <sub>2</sub>	92±0.9	79.6±2.4**

*Values are means±SEM.*

*BMI, body mass index; AHI, apnea/hypopnea index; ND, not determined; SpO<sub>2</sub>, transcutaneous oxygen saturation; SpO<sub>2</sub><90%: time spent with SpO<sub>2</sub> below 90% during the night*

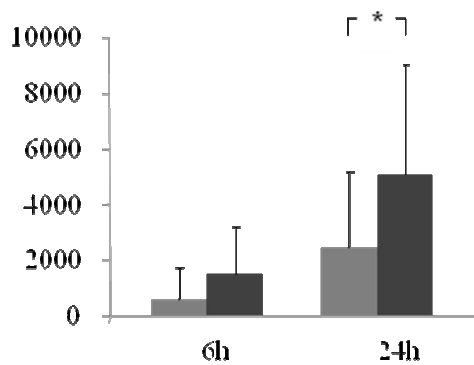
*\*P<0.05*

*\*\*P<0.005*

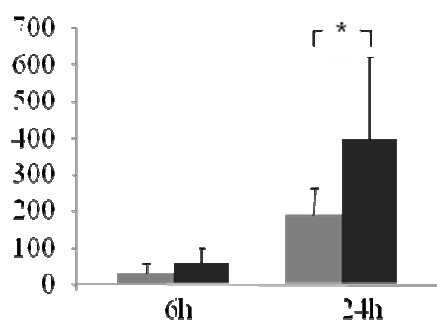
*\*\*\*P<0.0001*



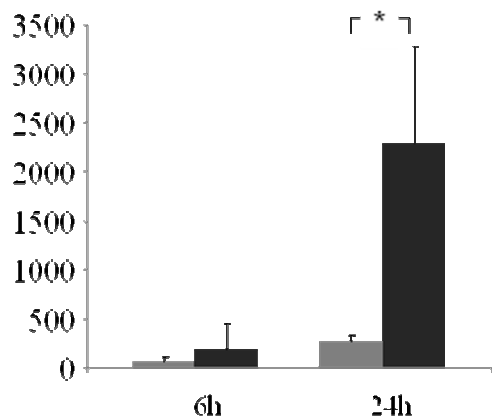
(A) IL-8 (pg/ml)



(B) PDGF-AA (pg/ml)

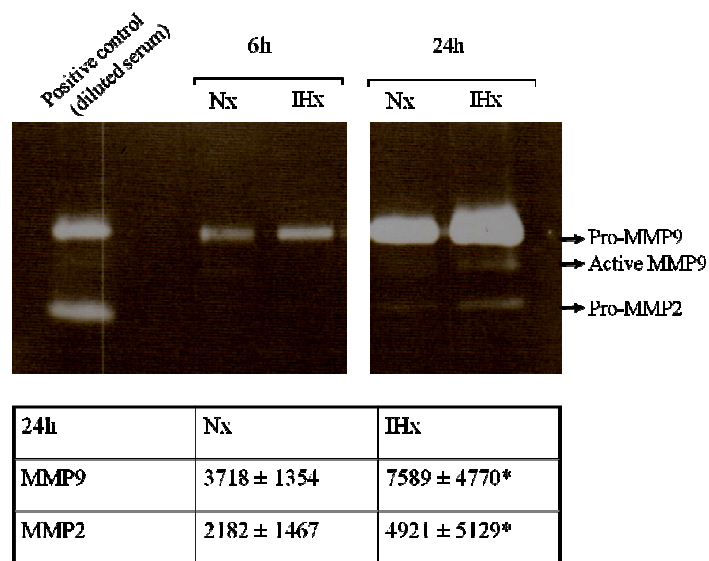


(C) VEGF (pg/ml)



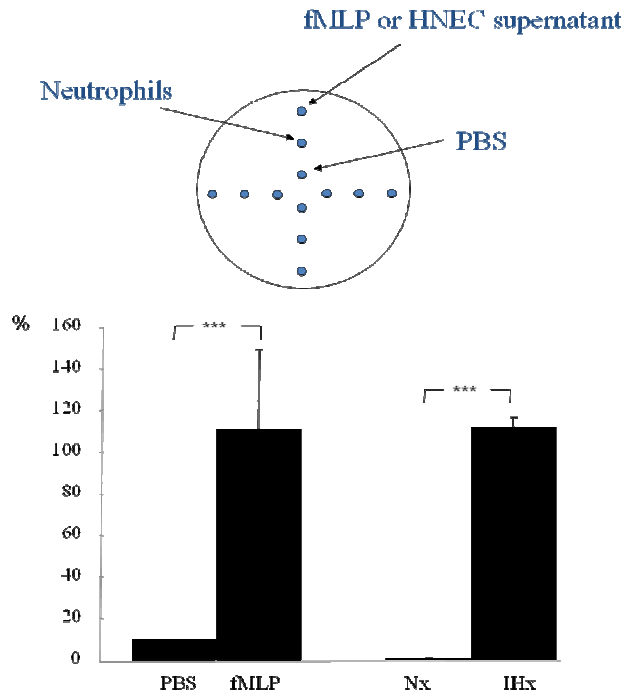
**Figure 1: Effects of intermittent hypoxia (IHx) (■) compared to normoxia (Nx) (□) on cytokine secretion by human nasal epithelial cells (HNECs) after 6 and 24 hours**

IL-8 (A), PDGF-AA (B), VEGF (C). The data are means±SDs. Statistically significant differences are indicated (\* $P$ <0.05).



**Figure 2: Effects of IHx on gelatinase expression by human nasal epithelial cells (HNECs) after 6 and 24 hours**

Top: representative zymogram for HNEC supernatants, with enzyme molecular masses on the left. Bands at 88 kDa and 92 kDa: active MMP-9 and latent MMP-9 (pro MMP-9), respectively. MMP-2 appears as a 72-kDa band. Quantitative zymogram analysis showing significant increases in MMP-9 and MMP-2 after 24 h.

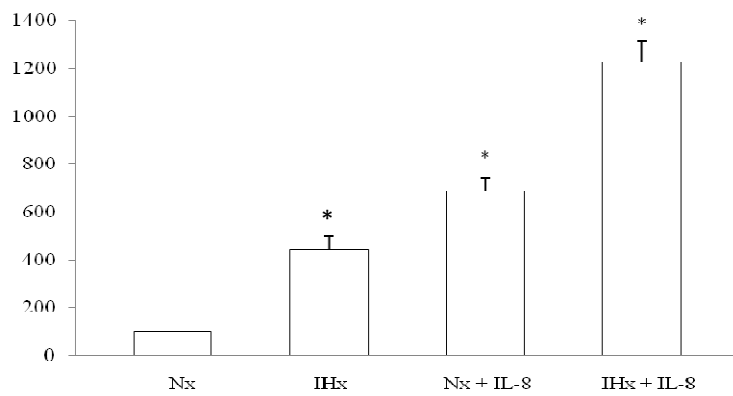


**Figure 3: Chemotaxis of human neutrophils induced by human nasal epithelial cell (HNEC) supernatants**

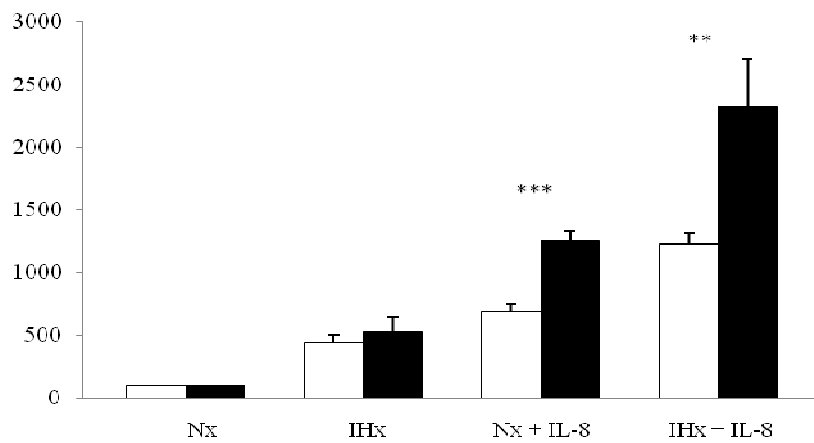
Migration was expressed as the ratio of the distance traveled by neutrophils from the center well to the test well over the total distance between these two wells.

Data are means±SDs. Statistically significant differences are indicated (\*\*\*)P=0.005).

**A**



**B**



**Figure 4: Effects of IHx and IL-8 on PMN migration**

The data are the percentages relative to normoxia. Panel A shows results with neutrophils from healthy controls. Asterisks indicate significant differences among all conditions. Panel B shows the comparison of OSAS ■ and healthy controls □.

## 4.2 Article 2

### **Response of Bronchial Smooth Muscle Cells and interactions with airway epithelial cells to intermittent hypoxia.**

C. Philippe<sup>12</sup>, MD, Y. Boussadia<sup>8</sup>, BSc, V. Prulière-Escabasse<sup>145</sup>, MD, PhD, JF Papon<sup>145</sup>, MD, PhD, C. Clérici<sup>389</sup>, MD, PhD, D. Isabey<sup>1</sup>, PhD, A. Coste<sup>145</sup>, MD, PhD, E. Escudier<sup>67</sup>, MD, PhD, MP d'Ortho<sup>89</sup>, MD, PhD.

11- INSERM, U955, Equipe 13, Créteil, 94000, France

12- AP-HP, Hôpital Tenon, Service d'Explorations Fonctionnelles, Paris, 75020, France

13- INSERM U700, Paris, 75018, France

14- Centre Hospitalier Intercommunal de Créteil, Service d'ORL, Créteil, 94000, France

15- Université Paris Est, Faculté de Médecine, Créteil, 94000, France

16- INSERM U933, Paris, 75012, France

17- AP-HP, Hôpital Armand-Trousseau, Service de Génétique et Embryologie Médicales, Paris, 75012, France.

18- AP-HP, Hôpital Bichat, Service de Physiologie - Explorations Fonctionnelles, Paris, 75018.

19- Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, F-75018 Paris, France

**Corresponding author** : C. Philippe, Service de Physiologie-Explorations Fonctionnelles,

Hôpital Tenon, 4 rue de la Chine, Paris 75020.

Phone : + 33 1 56 01 67 74 Fax : + 33 1 56 01 70 03

E-mail : carole.philippe@tnn.aphp.fr

**Sources of funding** : This work was funded by the nonprofit Air-Liquide Foundation

**Conflicts of interests** : the authors declare no COI related to this work.

## **Abbreviations**

AHI, apnea/hypopnea index

BSMCs, bronchial smooth muscles cells

CPAP, continuous positive airway pressure

FCS, fetal calf serum

HNECs, human nasal epithelial cells

IH, intermittent hypoxia

IL, interleukin

MMPs, matrix metalloproteinases

Nx, normoxia

OSA, obstructive sleep apnea syndrome

PBS, phosphate buffer saline

PDGF, platelet-derived growth factor

SH, sustained hypoxia

SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

TNF, tumor necrosis factor

VEGF, vascular endothelial growth factor

## **Abstract**

### **Background:**

A local respiratory inflammation has been described in obstructive sleep apnea syndrome with increased neutrophils and IL-8 in induced sputum. Induced secretion of IL-8 and PDGF by airway epithelial cells (AEC) , by intermittent hypoxia was recently described an in vitro model. Activation of smooth muscle cells and their interactions with epithelial cells has not yet been explored.

### **Objective:**

Our objective was to investigate the response of Bronchial Smooth Muscle Cells (BSMC) and the interplay between AEC and BSMC, to intermittent hypoxia (IH) *in vitro*.

### **Methods:**

Primary human BSMC and AEC were exposed to IH, sustained hypoxia (SH) of the same duration or normoxia (Nx). BSMC supernatants were assessed for matrix metalloproteinase, growth factor and cytokine secretion. The role of IH on their migration capacities was evaluated and the effect of supernatants from AEC exposed to IH or not, tested.

### **Results:**

IH induced a significant increase at 24h in VEGF secretion by BSMC (217 pg/ml +/-155 versus 98+/-66, p=0.04) . It also increased their migration capacities (p=0.018), and induced stress fiber formation. The effect of IH was more important that the one induced by SH (62+/-55 versus 44+/-52, p=0.028). Supernatants of AEC exposed to IH induced a major increase in migration capacities (247+/-76 versus 21+/-23, p=0.009) that was abolished in presence of a blocking antibody towards PDGF AA.

### **Conclusion:**

These data show that BSMC respond to IH by increased secretion of VEGF and increased migration. In addition, interplay between AEC and BSMC is suggested, that depends on PDGF AA secretion.

## **Key Messages**

- Intermittent hypoxia induced a specific response in the human primary bronchial smooth muscle cells
- Intermittent hypoxia induced a significant release of VEGF and a little raise of IL-8, it also increased capacities of BSMC migration.
- Airway epithelial cells contribute to BSMC activation by IH as supernatant of primary culture AEC induced an important increase of the BSMC capacities of migration, that depend on PDGF-secretion.

## **Capsule summary**

Intermittent hypoxia activated bronchial smooth muscle cells, with increased mediator secretion and migration. Crosstalk between cell types play a role in BSMC migration, the later being triggered by PDGF-AA released by AEC activated by IH.

**Keywords : bronchial smooth muscular cells, airway epithelial cells, intermittent hypoxia, inflammation, sleep apnea syndrome.**



## INTRODUCTION

The desaturation-reoxygenation sequence is a typical pattern coupled with a majority of respiratory events, resulting in intermittent hypoxia (IH). The IH most often encountered occurs in obstructive sleep apnea syndrome (OSAS). IH is notably implicated in the cardiovascular complications of OSAS triggering the activation of pro-inflammatory pathways (1). It may directly promote oxidative stress with formation of reactive oxygen species (ROS) (2), cytokine production and inflammatory circulating cell activation (3).

If systemic inflammation has been extensively studied in clinical cohorts or *in vivo* and *in vitro* models of IH (4), little is known about local airway inflammation. Clinical studies have been realized on sputum or breath condensates and concluded to a specific inflammation including higher neutrophil percentages (5, 6), higher level of IL-8 (6, 7), IL-6, and oxidative stress marker 8-isoprostane (8). In an *in vivo* model of chronic IH in mice, the role for the pro-inflammatory NF- $\kappa$ B pathway has been explored in different tissues with higher expression in lungs under IH (9). However contribution of specific cell types have not been questioned. In a previous work, we found that IH induced a specific inflammatory response in primary human nasal epithelial cell (HNEC) used as airway epithelial cells (AEC). Increased release of IL-8, PDGF AA, VEGF and gelatinases was shown.

To our knowledge, no study exists concerning the role of bronchial smooth muscles cells (BSMC) in this local inflammation and potential crosstalk between AEC and BSMC.

Therefore, the objectives of this investigation were 2-fold. First, we evaluated effects of IH in primary cultures of human BSMC on cytokine, growth factors and gelatinase secretion in cell-supernatants, and assessed migration capacities under IH compared to normoxia (Nx) and sustained hypoxia (SH). Second, we analyzed the effect for airway epithelial cells, under IH compared to Nx, on the BSMC migration capacities.

## **METHODS**

### **1) Cell culture :**

#### **BSMC**

**Human** primary bronchial smooth muscular cells (BSMC) (Lonza, Basel, Switzerland) were used for all the experiments. Upon reception, cryopreserved cells were cultured in T-25 flasks in Smooth muscle Basal Medium (SmBM), supplemented with growth factors, including fibroblast growth factor 2 (FGF-2: 2 ng/ml), epidermal growth factor (EGF:0.5ng/ml), and insulin (5µg/ml), as well as a mixture of antibiotics, including Gentamicin (100 ng/ml) and Amphotericin B (0.1ng/ml) and 5% fetal calf serum. Thawing, subculturing, and harvesting procedures were performed according to the manufacturer's instructions. Experiments were performed with cells at passages 2 to 4.

#### **HNEC :**

AEC used were human nasal epithelial cells (HNEC), obtained from adult patients undergoing surgery for nasal polyposis. The diagnosis of primary nasal polyposis was established on the basis of clinical history, endoscopic findings, and computed tomography results. Patients were asked to stop general and/or local nasal treatment 1 month before surgery. The study protocol was approved by the institutional review board of our institution (Comité Consultatif de Protection des Personnes pour la recherche biomédicale, CCPPRB, Hôpital Henri Mondor). Informed consent was obtained from all patients before the study.

Nasal polyposis samples were cultured at an air liquid interface adapted from a culture model originally described with human tracheobronchials cells (10) and further developed and characterized (11). Briefly, the samples were placed immediately in DMEM-Ham's F-12 (Invitrogen Life Technologies, Cergy-Pontoise, France) containing antibiotics (100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin, 2.5 µg/mL amphotericin B, and 100 mg/mL gentamicin), at 4°C, for transportation. The samples were then rinsed in phosphate buffer saline (PBS)

with dithiothreitol (5 nM) and placed overnight at 4°C in a PBS-antibiotics solution containing 0.1% pronase (Sigma, St Quentin Fallavier, France). After pronase neutralization by incubation in DMEM/F12 with 5% fetal calf serum (FCS, Invitrogen, Gibco, Cergy-Pontoise, France), the cell pellets were resuspended in 0.25% trypsin-EDTA solution for 3 min and incubated in DMEM/F12-antibiotics with 5% FCS before centrifugation (300g, 7 min) and re-suspension.

Finally, the HNECs were plated ( $1 \cdot 10^6$  cells/insert) on permeable Transwell® supports (Transwell Clear, Costar, USA) previously coated with collagen IV (10-20  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). For the first 24 h, HNECs were incubated in 1 mL of DMEM/F12-antibiotics with 2% Ultrosor G outside the insert and DMEM/F12-antibiotics with 5% FCS inside the insert. After 24 h, the medium inside the insert was then removed to place the cells at an air-liquid interface. The medium outside the insert was changed daily.

Transepithelial resistance (about 1100  $\text{W} \cdot \text{cm}^2$ , indicating the development of tight junctions) and transepithelial potential difference (-40 mV from the 4th day onward, indicating the existence of ion transport) were measured every 3 days using a microvoltmeter (EVOM®, World Precision Instrument, GB).

A well-differentiated state was reached after the first week, with the presence of ciliated and secretory cells. All experiments were performed using 14- to 21-day-old HNEC cultures, in which cell differentiation was stable.

## **2) Intermittent hypoxia model**

### **Cell exposure to intermittent hypoxia**

IH exposure consisted in six cycles of 30 min of hypoxia followed by 30 min of normoxia. Hypoxia was achieved by purging a humidified hermetic box with a hypoxic gas mixture of 0%  $\text{O}_2$ , 5%  $\text{CO}_2$ , and 95%  $\text{N}_2$  (Air Products SAS, Paris, France). The oxygen concentration dropped to 0.5% 7 minutes after switching to hypoxia. A normoxic control

experiment was run in parallel by keeping the cells under normoxia throughout the 6-hour period. Sustained hypoxia (SH) was obtained by keeping the cells under hypoxia with the same gas mixture as for IHx for 6 hours. Cell viability was checked at the end of hypoxia by trypan blue exclusion.

The supernatants samples were collected at the end of hypoxia exposure (6 h) and at 24h and stored at -80°C.

### **3) Soluble mediators : Cytokines and gelatinases**

#### **Cytokine assays:**

IL-8, IL-1  $\beta$ , platelet-derived growth factors (PDGFs) AA and AB, TGF  $\beta$  (-1, -2, -3), and vascular endothelial growth factor (VEGF), were measured in BSMC supernatants using the Milliplex Human Cytokine panel (Millipore, Molsheim, France) and the microassay platform at the Institut de Recherche en Santé, IFR65, Paris, France. Data are expressed as protein concentrations (pg/ml). Assays were done in duplicate, in five independent experiments.

#### **Gelatinase expression:**

Basal HNEC gelatinase expression was detected using zymography on gelatine SDS-PAGE as previously described (12). This method detects both activated and latent forms of MMPs. We loaded 10-20  $\mu$ L of supernatants onto lanes of an 8% SDS-polyacrylamide gel with 1 mg/mL gelatin. Separation was by electrophoresis under nonreducing conditions. The gel was then washed for 30 min in 2.5% Triton X-100 and incubated overnight at 37°C in a buffer (100 mM Tris/HCL, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.6). After Coomassie Brilliant Blue R250 0.5% staining, gelatine-degrading enzymes were identified as clear zones against a blue background. Molecular masses of gelatinolytic bands were estimated using prestained molecular mass markers. Quantitative evaluation was done using Image J software (NCBI, National Center for Biotechnology Information, NIH, Bethesda, USA).

#### **4) BSMC migration assay :**

Migration assays were done in Transwell® inserts (8.0 µm pore size) (Dutsher Dominique, Brumath, France). 2.5.10<sup>4</sup> BSMC were added in the upper chamber filled with 250µl of SmBM. BSMC were allowed to migrate for 6 hours, either under normoxia or IH. To test HNEC-induced BSMC migration, the lower chambers were filled with non-conditioned HNEC basal medium (control) or HNEC-supernatants obtained under normoxia or IH condition for 4 hours. The cells were fixed with cold methanol for 30 minutes, then washed three times with PBS, and stained by May-Grünwald Giemsa (Sigma Aldrich, St Quentin Fallavier, France). The cells on the upper surface of the membrane were removed by gently scraping with a cotton swab. The cells that had migrated through the membrane and adherent to the lower part of the filter were then fixed with ethanol and stained with the modified Giemsa staining kit (Biosciences, Eppelheim, Germany). Cells were observed under microscope (Inverted optical microscope, ZEISS: AXIOVERTIO, Carl Zeiss, Le Pecq, France) and counted in 3 different fields (100 magnification) for each of the triplicate membrane. Migration was evaluated as the number of BSMCs per field at the lower face of the filter. A full set of additional experiment was conducted to test the role of PDGF AA in BSMC migration induced by IH exposed AEC, by using a blocking antibody against PDGF AA (Millipore, Molsheim, France). The antibody was preincubated with supernatants for 1 hour at a concentration of 10µg/ml (13).

#### **5) Actin staining :**

Actin staining was performed under Nx, IH, SH, or after stimulation of BSCM with 5ng/ml PDGFAB (Sigma Aldrich, St Quentin Fallavier, France) in Nx. BSMC were plated in Lab-Tek (Dutsher Dominique, Brumath, France) dedicated for immunofluorescence. They were rinsed three times with PBS, and fixed using 1% glutaraldehyde at 37°C, for 30 min. Glutaraldehyde was removed, and samples were rinsed three times with PBS. The cells were permeabilized with 2% Triton X-100 for 20 min. Wells were rinsed three times with PBS and stained with Alexa Fluor 568 Phalloidin (Invitrogen Life Technologies, Cergy-Pontoise, France) for 30 min. After 3 washes, the cells were incubated for 3 min. with SYTOX® Green (Invitrogen Life Technologies, Cergy-Pontoise, France) to stain nuclei. The Lab-Tek were mounted using

IMMU-MOUNT (Pittsburgh, USA). F-actin was visualized by confocal microscopy using the CLSM – 510 – META (Carl Zeiss, Le Pecq, France) (40 magnification).

#### **6) Statistical analysis:**

Data were expressed as means +/- SD. Statistical analysis was performed with Wilcoxon rank sum test for non parametric data. Using Statview 5.0 (SAS Institute Inc, Cary NC, USA), *p* values equal to or smaller than 0.05 were considered statistically significant.

## **Results:**

### **Inflammation response of BSMC stimulated by intermittent hypoxia:**

#### *Cytokine and growth factor secretions:*

No differences were found between Nx and IH conditions regarding secretion of IL-1 $\beta$ , TGF $\beta$ , and PDGF. At 24 hours, a significant increase in VEGF (217 pg/ml $\pm$ 155 versus 98 $\pm$ 66,  $p=0.04$ ) and a trend toward an increase in IL-8 (161 $\pm$ 92 pg/ml versus 102 $\pm$ 49pg/ml,  $p=0.079$ ) were found with IH compared to Nx. In SH conditions, we found only a significant increase in VEGF (275 $\pm$ 187 pg/ml,  $p=0.04$ ), with no statistical difference when compared to SH (Figure 1A).

#### *Gelatinase expression:*

In line with previous work, zymographic analysis of gelatinase activities in the BSMC-supernatant showed at basal state only a 72-kDa band, corresponding to the molecular mass of latent MMP-2 (14). There was no modification under IH (Figure 1B).

#### *Induction of BSMC migration by IH :*

IH induced increased migration of BSMC across the membrane of the Transwell<sup>®</sup> inserts, compared to a small spontaneous migration in Nx condition (62 $\pm$ 55 versus 9 $\pm$ 7,  $p=0.018$ ), as did SH. Of note, BSMC-IH induced migration was greater than the one observed in SH condition (62 $\pm$ 55 versus 44 $\pm$ 52,  $p=0.028$ ) (Figure 2A).

#### *Analysis of BSMC morphology :*

According to this increased capacities of migration, actin stress fiber formation was observed under IH condition in BSMC (Figure 2B). It was more pronounced than under SH or than the one induced by 5 ng/ml PDGF.

### **Induction of BSMC migration by HNEC supernatants under HI :**

Supernatants of IH exposed-HNEC induced a major increase in capacities of BSMC migration compared to supernatants of Nx exposed-HNEC (247 $\pm$ 76 versus 21 $\pm$ 23,  $p=0.009$ ). This increase was blunted by the use of an anti-PDGF AA (247 $\pm$ 76 versus 10 $\pm$ 2,  $p=0.014$ ) (Figure 3).

## DISCUSSION

Our main finding is that IH activates BSMC, as shown by increase release of VEGF and increased migration capabilities. Of note, supernatants of HNEC exposed to IHx could also triggered BSMC migration that was blunted by blocking antibody toward PDGF AA..

We acknowledge limitations of our study, specially due to the IH model. It consisted in six cycles of 30 min. of hypoxia followed by 30 min. of Nx.that, by far, does not reflect,the IH cycling in the course of OSAS. However similar cycling has successfully been used in previous studies (3, 15, 16). Other *in vitro* models of IH have been developed to obtain more rapid cycles, using preconditioned hypoxic medium (17), or to ensure proper diffusion of oxygen through the culture media (18). However, changes of culture medium may be responsible for shear stress that can interfere with HI effects, in addition the method does not allow supernatants collection. A major strength of our study is the use of primary cultures from human cells, obtained either tissue samples (HNEC) or from commercial origin (BSCM). The use of human cells eliminated potential bias due to interspecies differences. The use of primary cultures instead of cell lines ensured that the cell responses were not linked to transformation.

To our knowledge, this is the first study reporting a direct effect of IH on BSMC. We have found a significant increase in VEGF-secretion, similar to those observed under SH. In lung, production of VEGF by BSMC has been reported (19, 20), as well as bronchial and alveolar epithelial cells, fibroblasts and macrophages. Hypoxia is the major stimulus of VEGF. Studies of the lung from VEGF transgenic mice suggest that it mediates both vascular remodeling as well as extravascular remodeling and inflammation (21). Indeed, overexpression of VEGF has been shown to induce leucocyte infiltration in the lung, increased mucus production, collagen deposition and smooth muscle hyperplasia, together with marked angiogenesis. Other inflammatory mediators, namely TGF $\beta$  and PDGF, were not modified by IH, neither was gelatinase MMP-2.



Various mediators induce BSMC migration in vitro, included PDGF (22), fibroblast growth factor, TGF- $\beta$ , cytokines such as IL-1 $\beta$ , components of extracellular matrix (collagen and fibronectin) and chemokines whose IL-8 (23, 24). The present study also found that IH *per se* also induced BSMC-migration. A part of the effect of IH could be due to the increase of IL-8 secretion and autocrine stimulation of BSMC. Interestingly, the effect of IH on migration was greater than the one of SH. In line with increased migration, IH induced stress fiber formation. Such cytoskeleton reorganization starting by actin polymerization had previously been described (25).

We previously showed that IH induced PDGF secretion by HNEC. Accordingly, we found that supernatant of HNEC exposed to IH induced BSMC migration and that the migration was blunted by a blocking antibody against PDGF. BSMC-epithelium interactions are known for a long time, illustrated by co-cultures (26) or by incubation of BSMC with supernatants of bronchial epithelial cells elicited by TNF- $\alpha$  (24). Such studies concludes that the airway epithelium modulates BSMC migration via RANTES or IL-8 (24) and BSMC proliferation via other soluble mediators, such as IL-6, IL-8 and MCP-1 and MMP-9 (26). Here, we showed in addition that AEC may produce PDGF AA that triggers BSMC migration.

Despite an existing controversy over their role in health, airway smooth muscle cells are implicated in the pathophysiology of bronchial inflammation (27, 28). These cell are capable of contraction, migration, proliferation and mediator synthesis in response to various stimuli such as histamine, eicosanoids, and various cytokines. They are now considered as inflammatory cells *per se* (29). They play a role in the structural remodeling in the course of asthma and chronic obstructive lung disease (COPD). This remodeling is defined by several structural changes including epithelial cell mucus metaplasia, alteration in extracellular matrix, subepithelial fibrosis, angiogenesis, and increase in peribronchial smooth muscle mass. The latter appears to be the most important feature of bronchial remodeling since increased BSMC mass is associated with a decrease in lung function in severe asthma (30). No such modification are described yet in patients with OSAS, however

bronchial responsiveness and decrease in distal flow have been reported (27) that, together with bronchial inflammation found in induced sputum and breath condensate could reflect early phase of bronchial remodeling

## **CONCLUSION**

IH induced a specific response in BSMCs independently from systemic influences, with enhanced migration and mediator release. Moreover, we showed that airway epithelial cells elicited by IH triggered BSMC migration via PDGF secretion. Altogether, these results suggest synergistic effects of IH on HNEC and BSMC activation that may explain airway inflammation and airway remodeling.

**Aknowledgement :**

This work was supported by the Foundation Air-Liquide.

We warmly thank Djibril Bokar-Thire and L. Margarit for their technical assistance and Dr A. Wolfe for the help in preparing the manuscript.

## References :

1. Garvey JF, Taylor CT, McNicholas WT. Cardiovascular disease in obstructive sleep apnoea syndrome: The role of intermittent hypoxia and inflammation. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 2009;33:1195-1205.
2. Lavie L. Obstructive sleep apnoea syndrome--an oxidative stress disorder. *Sleep medicine reviews* 2003;7:35-51.
3. Dyugovskaya L, Polyakov A, Lavie P, Lavie L. Delayed neutrophil apoptosis in patients with sleep apnea. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2008;177:544-554.
4. Levy P, Tamisier R, Minville C, Launois S, Pepin JL. Sleep apnoea syndrome in 2011: Current concepts and future directions. *European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society* 2011;20:134-146.
5. Salerno FG, Carpagnano E, Guido P, Bonsignore MR, Roberti A, Aliani M, Vignola AM, Spanevello A. Airway inflammation in patients affected by obstructive sleep apnea syndrome. *Respiratory medicine* 2004;98:25-28.
6. Devouassoux G, Levy P, Rossini E, Pin I, Fior-Gozlan M, Henry M, Seigneurin D, Pepin JL. Sleep apnea is associated with bronchial inflammation and continuous positive airway pressure-induced airway hyperresponsiveness. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2007;119:597-603.
7. Carpagnano GE, Spanevello A, Sabato R, Depalo A, Palladino GP, Bergantino L, Foschino Barbaro MP. Systemic and airway inflammation in sleep apnea and obesity: The role of icam-1 and il-8. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine* 2010;155:35-43.
8. Carpagnano GE, Kharitonov SA, Resta O, Foschino-Barbaro MP, Gramiccioni E, Barnes PJ. Increased 8-isoprostane and interleukin-6 in breath condensate of obstructive sleep apnea patients. *Chest* 2002;122:1162-1167.
9. Greenberg H, Ye X, Wilson D, Htoo AK, Hendersen T, Liu SF. Chronic intermittent hypoxia activates nuclear factor-kappaB in cardiovascular tissues in vivo. *Biochemical and biophysical research communications* 2006;343:591-596.
10. Gruenert DC, Finkbeiner WE, Widdicombe JH. Culture and transformation of human airway epithelial cells. *The American journal of physiology* 1995;268:L347-360.
11. Coste A, Brugel L, Maitre B, Boussat S, Papon JF, Wingerstmann L, Peynegre R, Escudier E. Inflammatory cells as well as epithelial cells in nasal polyps express vascular endothelial growth factor. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 2000;15:367-372.
12. d'Ortho MP, Clerici C, Yao PM, Delacourt C, Delclaux C, Franco-Montoya ML, Harf A, Lafuma C. Alveolar epithelial cells in vitro produce gelatinases and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2. *The American journal of physiology* 1997;273:L663-675.
13. Bosse Y, Thompson C, Stankova J, Rola-Pleszczynski M. Fibroblast growth factor 2 and transforming growth factor beta1 synergism in human bronchial smooth muscle cell proliferation. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2006;34:746-753.
14. Nishihara-Fujihara M, Shoji S, Maeda I, Shimoda T, Nishima S, Okamoto K. Involvement of fibronectin and matrix metalloproteinases in airway smooth muscle cell

migration for the process of airway remodeling. *Allergology international : official journal of the Japanese Society of Allergology* 2010;59:267-275.

15. Gozal E, Sachleben LR, Jr., Rane MJ, Vega C, Gozal D. Mild sustained and intermittent hypoxia induce apoptosis in pc-12 cells via different mechanisms. *American journal of physiology Cell physiology* 2005;288:C535-542.

16. Lattimore JD, Wilcox I, Nakhla S, Langenfeld M, Jessup W, Celermajer DS. Repetitive hypoxia increases lipid loading in human macrophages-a potentially atherogenic effect. *Atherosclerosis* 2005;179:255-259.

17. Ryan S, Taylor CT, McNicholas WT. Selective activation of inflammatory pathways by intermittent hypoxia in obstructive sleep apnea syndrome. *Circulation* 2005;112:2660-2667.

18. Baumgardner JE, Otto CM. In vitro intermittent hypoxia: Challenges for creating hypoxia in cell culture. *Respiratory physiology & neurobiology* 2003;136:131-139.

19. Mura M, dos Santos CC, Stewart D, Liu M. Vascular endothelial growth factor and related molecules in acute lung injury. *J Appl Physiol* 2004;97:1605-1617.

20. Ribatti D, Puxeddu I, Crivellato E, Nico B, Vacca A, Levi-Schaffer F. Angiogenesis in asthma. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 2009;39:1815-1821.

21. Lee CG, Link H, Baluk P, Homer RJ, Chapoval S, Bhandari V, Kang MJ, Cohn L, Kim YK, McDonald DM, Elias JA. Vascular endothelial growth factor (vegf) induces remodeling and enhances th2-mediated sensitization and inflammation in the lung. *Nature medicine* 2004;10:1095-1103.

22. Goncharova EA, Billington CK, Irani C, Vorotnikov AV, Tkachuk VA, Penn RB, Krymskaya VP, Panettieri RA, Jr. Cyclic amp-mobilizing agents and glucocorticoids modulate human smooth muscle cell migration. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2003;29:19-27.

23. Govindaraju V, Michoud MC, Al-Chalabi M, Ferraro P, Powell WS, Martin JG. Interleukin-8: Novel roles in human airway smooth muscle cell contraction and migration. *American journal of physiology Cell physiology* 2006;291:C957-965.

24. Takeda N, Sumi Y, Prefontaine D, Al Abri J, Al Heialy N, Al-Ramli W, Michoud MC, Martin JG, Hamid Q. Epithelium-derived chemokines induce airway smooth muscle cell migration. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 2009;39:1018-1026.

25. Gerthoffer WT. Migration of airway smooth muscle cells. *Proceedings of the American Thoracic Society* 2008;5:97-105.

26. Malavia NK, Raub CB, Mahon SB, Brenner M, Panettieri RA, Jr., George SC. Airway epithelium stimulates smooth muscle proliferation. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2009;41:297-304.

27. Jeffery PK. Remodeling in asthma and chronic obstructive lung disease. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2001;164:S28-38.

28. Joubert P, Hamid Q. Role of airway smooth muscle in airway remodeling. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2005;116:713-716.

29. Bara I, Ozier A, Tunon de Lara JM, Marthan R, Berger P. Pathophysiology of bronchial smooth muscle remodelling in asthma. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 2010;36:1174-1184.

30. Kaminska M, Foley S, Maghni K, Storness-Bliss C, Coxson H, Ghezzi H, Lemiere C, Olivenstein R, Ernst P, Hamid Q, Martin J. Airway remodeling in subjects with severe asthma with or without chronic persistent airflow obstruction. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2009;124:45-51 e41-44.

## Figure legends

### Figure 1 :

**Effects of intermittent hypoxia (IH) (■) compared to normoxia Nx (□) and sustained hypoxia (SH) (■) on mediator secretion by bronchial smooth muscle cells (BSMCs) after 24 hours.**

VEGF (panel A), IL-8 (panel B). The data are means±SDs. Statistically significant differences are indicated (\* $P$ <0.05).

Panel C : Effects of IH on gelatinase expression by BSMCs after 6 and 24 hours with representative zymogram of BSMC supernatants, gelatinase molecular masses are given on the left. 92 kDa corresponds to MMP-9 , 72-kDa: to MMP-2. First lane is positive control (1/100 diluted serum).

### Figure 2:

**(A) Effects of IH (■) on BSMC migration after 6 hours compared to Nx (□) and SH (■)**

Data were expressed as the number of BSMCs / field observed on the lower face of the Transwell® insert. Statistically significant differences are indicated (\* $P$ <0.05).

**(B) Effects of IH on BSMC morphology**

Staining of F-actin showed stress fiber formation in IH and SH compared to NX. Stress fiber formation in IH and SH was comparable to that induced by 10 ng/ml PDGF.

**Figure 3: Effects of supernatants of human nasal epithelial cells (HNECs) on BSMC migration after 4 hours.**

**(A)** Optical microscopy of BSMC migration induced by HNEC supernatants under Nx or IH condition showing strong increase in the number of cells adherent to the lower part of the Transwell® insert, with typical pattern of migrating cells.

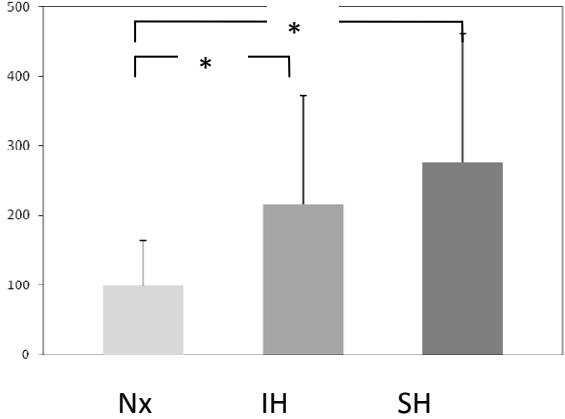
**(B)** Effects of supernatants of HNEC exposed to Nx (□) compared to supernatants of HNEC exposed to IH (■). Addition of a blocking antibody directed against PDGF AA completely abolished BSMC migration (■).

Data were expressed as the number of BSMCs / field. Statistically significant differences are indicated (\*\* $P < 0.001$ , \* $P < 0.05$ ).

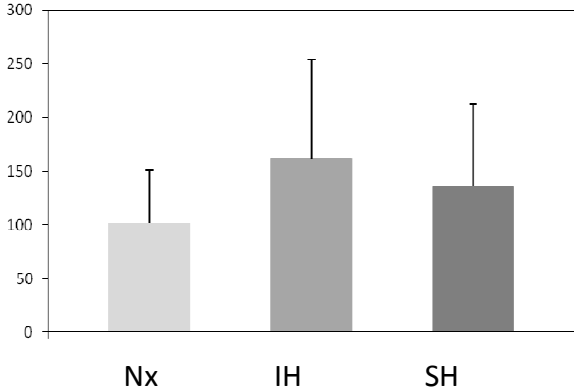


**Figure 1**

**(A) VEGF (pg/ml)**



**(B) IL-8 (pg/ml)**



**(C)**

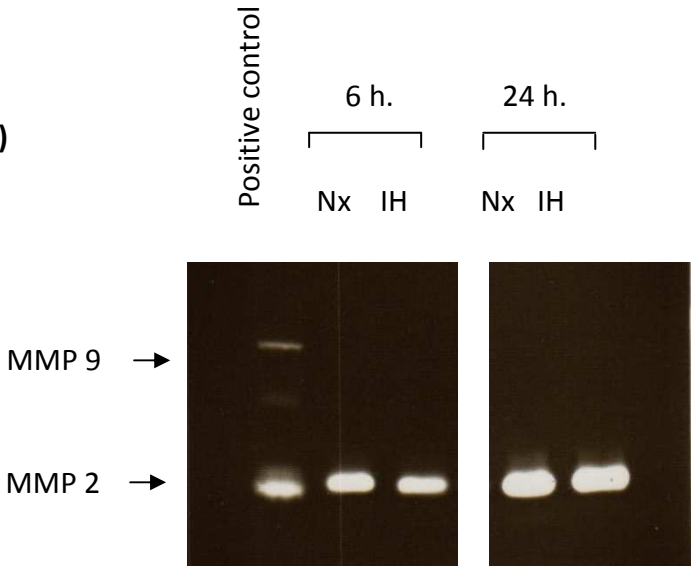
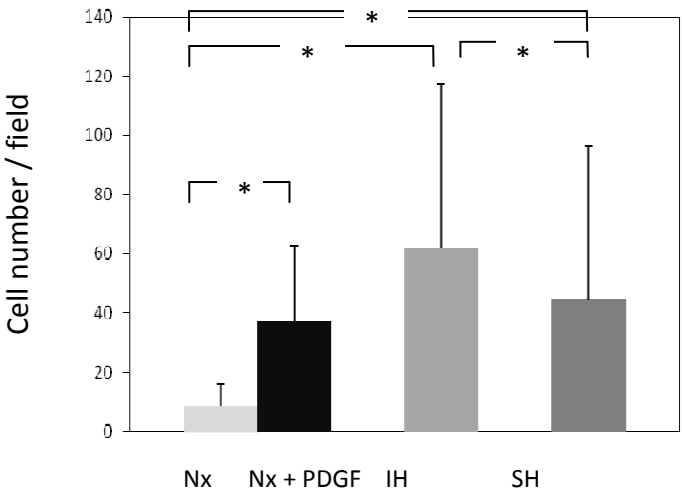


Figure 2

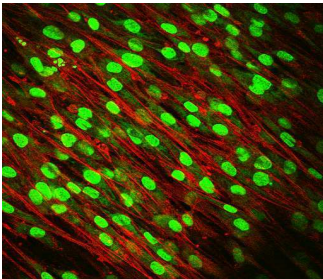
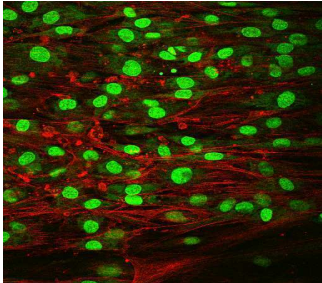
(A)



(B)

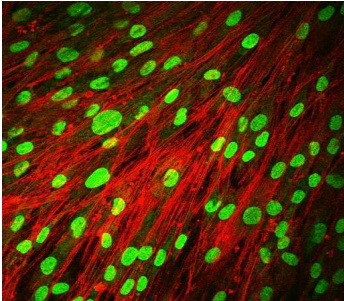
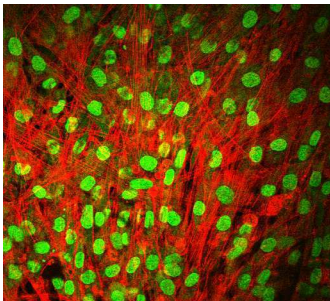
Nx

Nx + PDGF



IH

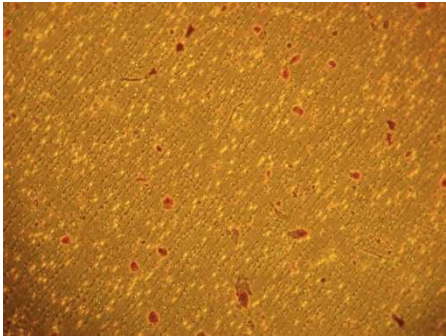
SH



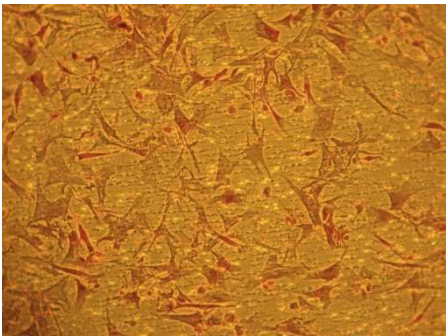
**Figure 3**

**(A)**

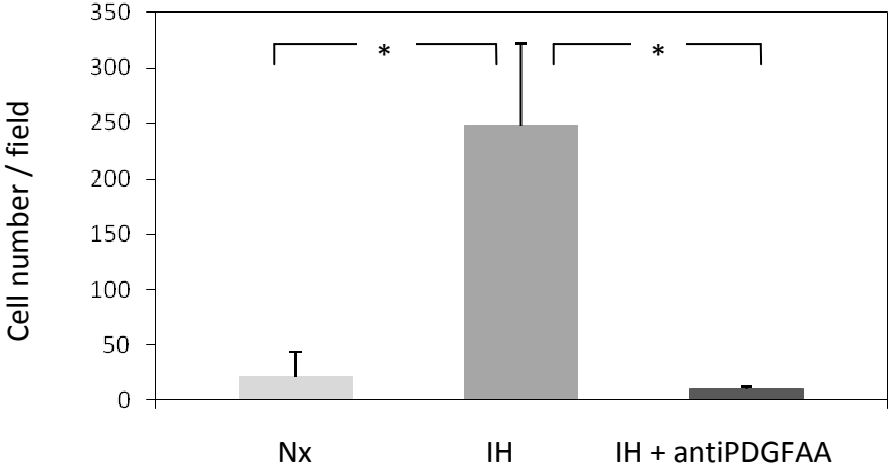
**Nx**



**IH**



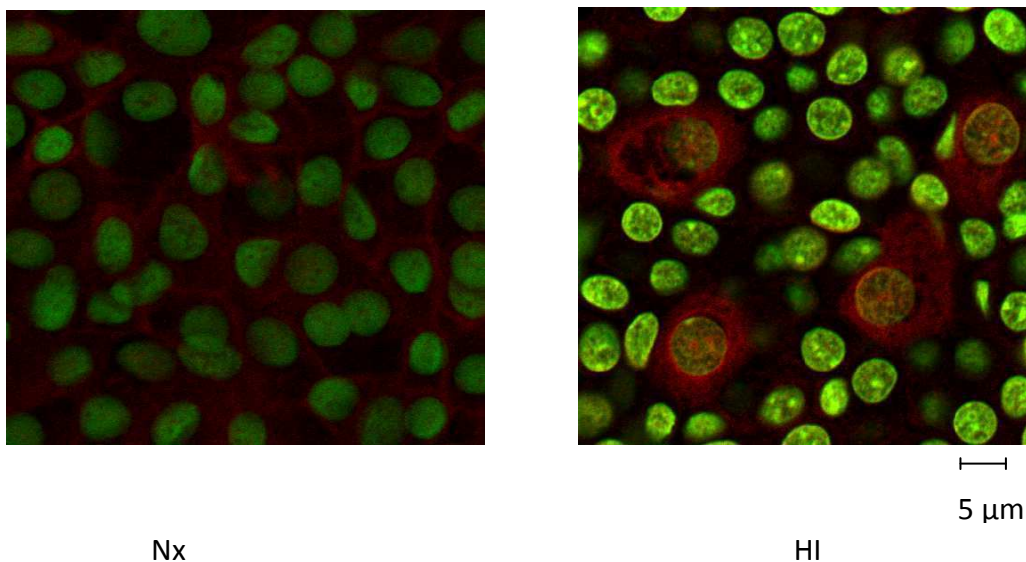
**(B)**



### 4.3 Résultats complémentaires :

#### 4.3.1 Immunomarquage

Les sécrétions d'IL-8 et de VEGF observées sont sous la dépendance de deux voies de signalisation, impliquant respectivement NF- $\kappa$ B et HIF-1 $\alpha$  dont les interrelations sont complexes (cf paragraphe 1.2.4.4 et 1.2.4.5.2). Des résultats préliminaires réalisés sur les CENH ont permis de montrer qu'après 6 heures d'HI, un marquage nucléaire de NF- $\kappa$ B était nettement visible.



**Figure 15 :** exemple représentatif d'immunomarquage NF- $\kappa$ B après 6 heures d'HI comparée à 6 heures de Nx. La barre représente 5  $\mu$ m.

En revanche, nous n'avons pas observé de marquage nucléaire pour HIF-1 $\alpha$  en IH, alors qu'il était fortement exprimé en hypoxie chronique.

Des expériences complémentaires sont en cours afin d'analyser la cinétique d'apparition de l'expression nucléaire de ces deux facteurs de transcription.

### **4.3.2 Magnétocytométrie :**

La rigidité des CMLB a été mesurée à 276,24 (157,92) Pa en normoxie ce qui est significativement supérieure à celle observée dans les cellules soumises à une hypoxie intermittente où la rigidité était de 175,91 (98,26) Pa. Ces résultats sont difficiles à mettre en perspective avec l'apparition de fibres de stress.

#### 4.4 Discussion et Perspectives

Dans le premier article, nous avons caractérisé le profil inflammatoire des CENH en réponse à l'HI et mis en évidence une augmentation significative de la production d'IL-8, de PDGF AA, de VEGF et de gélatinases. L'IL-8 sécrétée était active comme en atteste le pouvoir chimotactique majeur des surnageants de CENH envers les neutrophiles. De plus, nous avons montré que l'HI *per se* était responsable d'une augmentation de la migration de neutrophiles et que l'addition d'IL-8 potentialisait cet effet, d'autant plus qu'elle agissait sur des neutrophiles de patients apnéiques, déjà activés.

Dans le second article, nous avons mis en évidence une réponse spécifique des cellules musculaires lisses bronchiques à l'HI avec une production de VEGF et surtout une augmentation de leurs capacités de migration. De surcroît, nous avons montré que le surnageant des CENH soumises à l'HI induisait une augmentation majeure de ces capacités de migration, dépendant de la sécrétion de PDGFAA.

Notre modèle d'HI est loin de mimer l'HI observée chez des patients apnéiques en terme de fréquence et de durée. Mais, il est comparable à celui utilisé par Dyugovskaya et coll et Gozal et coll (Dyugovskaya, L. 2008; Gozal, E. 2005), conduisant à 1 cycle/heure pendant 3 ou 6 heures. D'autres modèles *in vitro* décrits au paragraphe 1.1.2.2. assurent des cyclages plus rapides utilisant du milieu préconditionné (Ryan, S. 2005) ou permettent une meilleure diffusion de l'oxygène au sein de la culture cellulaire (Baumgardner, J.E.Otto, C.M. 2003). Cependant, le changement des milieux de culture peut entraîner du « shear stress » risquant d'interférer avec les conséquences de l'HI, et surtout ces modèles ne permettent pas le recueil de surnageants pour le dosage des différents médiateurs synthétisés au cours et au décours de l'HI.

Nos études montrent que l'HI induit une réponse inflammatoire des cellules résidentes de l'arbre trachéobronchique, cellules épithéliales et musculaires lisses. L'utilisation d'un modèle *in vitro* a permis d'isoler cette réponse tissulaire spécifique de l'influence d'une

inflammation vasculaire et systémique. Nos modèles *in vitro* ont permis de mettre en évidence la coopération entre cellules épithéliales et musculaires lisses, les premières stimulant la migration des secondes, à travers la production de PDGF AA.

Nos modèles *in vitro* ont également permis l'étude des interactions entre cellules résidentes et polynucléaires neutrophiles. Nous avons montré que l'HI est capable d'activer les neutrophiles en accord avec les travaux de Schulz (Schulz, R. 2000) et de Dyugovskaya (Dyugovskaya, L. 2002; Dyugovskaya, L. 2008). Ces travaux avaient montré une production accrue de DRO, une augmentation de l'expression de la L-sélectine CD15 et une diminution de l'apoptose des neutrophiles, réversibles sous PPC, concluant à leur très probable implication dans les lésions endothéliales observées chez les patients apnéiques.

Pour notre part, nous montrons que l'HI induit une chimiokinèse accrue qu'elle soit spontanée ou en réponse à l'IL-8. En outre, la migration induite par l'HI de neutrophiles issus de patients SAHOS est supérieure à celle des sujets contrôles, témoignant d'un « priming » des neutrophiles cohérent avec leur activation décrite dans le SAHOS.

La production d'IL-8 par les CENH et dans une moindre mesure par les cellules musculaires lisses que nous montrons en réponse à l'HI, explique probablement en partie la neutrophilie observée dans les expectorations des patients apnéiques (Carpagnano, G.E. 2010; Salerno, F.G. 2004), à l'instar de celle observée au cours d'autres pathologies chroniques telles que l'asthme (Marini, M. 1992) ou la BPCO (Schulz, C. 2003).

En termes de coopération cellulaire entre cellules épithéliales et cellules musculaires lisses, l'anticorps bloquant anti PDGF bloque complètement la migration des cellules musculaires lisses, rendant peu probable l'implication d'un autre médiateur soluble, tel que l'IL-8, bien que son rôle ait été suggéré dans d'autres pathologies comme l'asthme ou la BPCO (Govindaraju, V. 2006; Takeda, N. 2009).

Enfin, le rôle du VEGF est possible. Nous montrons l'augmentation de sa production tant par les CENH que les BSMC. Son implication dans le remodelage vasculaire et inflammatoire pulmonaire a été montrée (Bhandari, V. 2006; Lee, C.G. 2004).

Enfin, nous avons mis en évidence une augmentation de l'expression des gélatinases MMP-2 et MMP-9 par les CENH soumises à l'HI. Les gélatinases font partie des MMP, famille d'endo peptidases calcium- et zinc- dépendantes, capable de dégrader les différents composants de la matrice extracellulaire. Leur implication dans le remodelage tissulaire au cours des pathologies respiratoires est largement montrée (Loffek, S. 2011).

Ainsi la synthèse exagérée de ces médiateurs, même si elle n'est que modérée et partielle, pourrait, si ce n'est déclencher, tout du moins aggraver un processus de remodelage bronchique (Jeffery, P.K. 2001). Ce remodelage bronchique associe lésion épithéliale, hyperplasie glandulaire, fibrose sous épithéliale, hyperplasie/hypertrophie musculaire lisse et angiogénèse dans lequel les cellules épithéliales et musculaires lisses jouent un rôle primordial. Ce remodelage contribue au déclin de la fonction respiratoire (Pascual, R.M.Peters, S.P. 2005). L'ensemble de ces résultats pourrait expliquer les données cliniques montrant que les débits expiratoires sont corrélés à la sévérité du SAHOS (Zerah-Lancner, F. 1997).

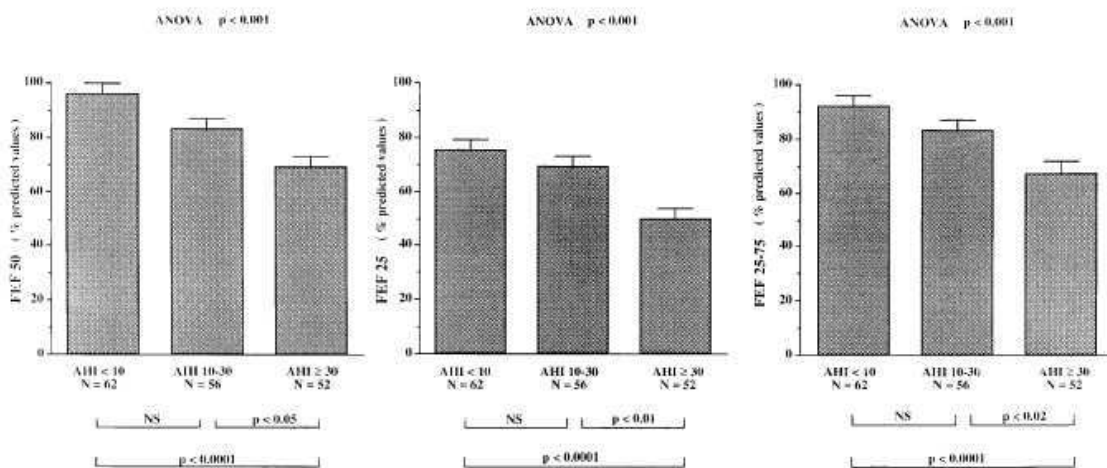


Figure 16 : Selon (Zerah-Lancner, F. 1997) : modifications des différents débits expiratoires en fonction de l'IAH



## **PARTIE II : Travaux antérieurs**

Au préalable de mes fonctions hospitalières comme responsable du secteur « sommeil » dans le service de physiologie de l'hôpital Tenon, j'avais déjà eu un investissement en recherche fondamentale. En effet, j'ai réalisé mon stage de DEA en 1990 sous la direction du Pr Baud dans l'unité INSERM 64 dirigée par le Pr Ardaillou. J'ai poursuivi des activités de recherche dans la même unité dans le cadre de mes fonctions d'assistant hospitalo universitaire de 1991 à 1995.

Ces travaux de recherche portaient sur l'importance du TNF $\alpha$  en pathologie infectieuse (exemple de la tuberculose), et son mode d'action (expression des récepteurs membranaires et solubles, étude du système de signalisation). Ces travaux sont exposés dans les pages suivantes. Par ailleurs, j'ai participé à d'autres travaux listés p : 148.

Comme les autres cytokines, le TNF $\alpha$  est un polypeptide ; sa forme humaine comporte 157 acides aminés. Il est synthétisé majoritairement par les monocytes/macrophages en réponse à une activation par les LPS, les complexes immuns ou encore diverses cytokines. Sa synthèse commence par l'élaboration d'un précurseur, une molécule transmembranaire de 26 kDa conduisant par clivage à la formation d'un peptide mature de 17 kDa. L'action biologique du TNF $\alpha$  dépend de sa liaison à des récepteurs membranaires spécifiques. Le nombre de ces récepteurs est variable selon le type cellulaire, de 200 à 50 000 sites par cellule avec une constante d'affinité variant entre 0,1 et 3 nM. Il existe deux types de récepteurs : un récepteur de 75 kDa de type A ou II, prédominant à la surface des monocytes et un récepteur de 55 kDa de type I ou B, prédominant à la surface des cellules épithéliales. Dans certains cas, ces récepteurs sont clivés pour former des récepteurs solubles, inhibiteurs potentiels de l'action du TNF $\alpha$ .

### 1) Importance du TNF $\alpha$ en pathologie infectieuse (exemple de la tuberculose) :

L'importance de la formation du TNF $\alpha$  au cours de l'infection par *Mycobacterium Tuberculosis* a été déduite de plusieurs observations. *In vivo*, les signes cliniques de la tuberculose associent fièvre et amaigrissement. Du fait de ses effets sur la thermorégulation et le métabolisme des protéines et des lipides, le TNF $\alpha$  pouvait jouer un rôle important dans ces manifestations. *In vitro*, les monocytes produisent du TNF $\alpha$  en réponse à des composants du *Mycobacterium Tuberculosis* dont le lipoarabinomannan. En retour, en interagissant avec les lymphocytes T et les monocytes, le TNF $\alpha$  participe à la mycobactéricidie et à la formation et au maintien des granulomes.

Pour confirmer l'importance du TNF $\alpha$  au cours de l'infection par *Mycobacterium Tuberculosis*, la synthèse du TNF $\alpha$  par les cellules mononucléées du sang veineux de sujets sains et de patients porteurs de tuberculose pulmonaire a été déterminée. La concentration de TNF $\alpha$  a été mesurée dans le surnageant à la fois par dosage biologique et par dosage radioimmunométrique, la concentration de prostaglandine E2 (PGE2) a été mesurée dans les mêmes conditions par dosage immunoenzymatique (ELISA).

Nous avons pu établir que

1) spontanément, les cellules mononucléées des patients tuberculeux produisent significativement plus de TNF $\alpha$  et plus de PGE2 que celles des sujets contrôles. Ce taux est corrélé positivement à la sévérité de la fièvre et de l'amaigrissement. Afin de déterminer une possible interaction entre les synthèses de PGE2 et de TNF $\alpha$ , des expériences ont été réalisées en présence d'indométacine, inhibiteur classique de la cyclooxygénase. La production de TNF $\alpha$  apparaît alors augmentée chez les sujets contrôles et non chez les patients tuberculeux,

2) pour savoir si cette augmentation de production du TNF $\alpha$  était due à l'exposition des cellules mononucléées à des antigènes mycobactériens *in vivo*, nous avons stimulé les cellules mononucléées des sujets contrôles par l'antigène mycobactérien « tuberculin protein purified derivative » (PPD). Le PPD, comme le LPS, induit une augmentation de la production de TNF $\alpha$  et de PGE2. Mais, alors que la production de TNF $\alpha$  est comparable à

celle obtenue avec les cellules mononucléées de patients tuberculeux non activées, la production de PGE2 est beaucoup plus importante,

3) la même stimulation *in vitro* des cellules mononucléées de sujets tuberculeux par le PPD est à l'origine d'une augmentation plus importante de TNF $\alpha$  mais d'une augmentation moindre de PGE2.

Toutes ces expériences suggèrent qu'une partie de la dysfonction immunitaire observée chez les patients tuberculeux se traduit par une diminution de la capacité de synthèse de PGE2.

Parce que l'action biologique du TNF $\alpha$  dépend de sa liaison aux récepteurs membranaires des cellules cibles, nous avons poursuivi ce travail par l'étude de l'expression des récepteurs du TNF $\alpha$  à la surface des monocytes. Les expériences de liaison ont été réalisées sur des monocytes isolés du sang veineux de sujets sains ou tuberculeux et incubés pendant deux heures à 4°C en présence de <sup>125</sup>I- TNF $\alpha$ . Cette liaison paraît être sensiblement mais non significativement plus élevée sur les monocytes isolés des patients tuberculeux. Lorsque les monocytes sont préincubés dans un tampon HCl-glycine pour dévoiler les récepteurs préalablement occupés par du TNF $\alpha$  endogène, l'augmentation devient significative. Cette augmentation concerne à la fois les récepteurs présents à la surface des monocytes (représentés par la radioactivité libérée dans le milieu après exposition des cellules au tampon HCl-glycine), et les récepteurs internalisés (représentés par la radioactivité comptée après solubilisation des cellules par de la soude). Cette différence de liaison est due à une augmentation du nombre de récepteurs sans modification de l'affinité. Elle disparaît après 3 mois de traitement.

CADRANEL J, PHILIPPE C, PEREZ J, MILLERON B, AKOUN G, ARDAILLOU R, BAUD L : *In vitro* production of tumour necrosis factor and prostaglandin E2 by peripheral blood mononuclear cells from tuberculosis patients. Clin. Exp. Immunol. 1990, 81 : 319-324.

CADRANEL J, PHILIPPE C, PHILIPPE B, MILLERON B, FOUQUERAY B, MAYAUD C, BAUD L : Increased expression and occupancy of receptors for tumour necrosis factor on blood monocytes from tuberculosis patients. Clin. Exp. Immunol. 1993, 94 : 51-56.

CADRANEL J, PHILIPPE C, FOUQUERAY B, MILLERON B, AKOUN G, BAUD L. Increased expression and occupancy of receptors for tumor necrosis factor on blood monocytes from tuberculosis patients. Annual Meeting of the American Thoracic Society/American lung Association. Miami. 1992, abstract in Am. Rev. Resp. Dis. 145 : A274.

## 2) Mode d'action du TNF $\alpha$ :

### Expression des récepteurs : rôle de la production autocrine des formes actives dérivées de l'oxygène

Parce que TNF $\alpha$  et DRO sont impliqués dans les mêmes situations pathologiques et proviennent de sources cellulaires identiques, leurs interactions n'étaient pas inattendues. Il est connu que le TNF $\alpha$  stimule la production de DRO par les monocytes comme par les cellules mésangiales, et qu'en retour, les DRO augmentent la production de TNF $\alpha$  par les macrophages et par les cellules mésangiales, et enfin les DRO diminuent la liaison du TNF $\alpha$  à ses récepteurs membranaires. En effet, l'exposition des cellules mésangiales, des monocytes circulants ou des fibroblastes à une source externe d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entraîne une diminution de 50% du nombre des récepteurs et une diminution parallèle des effets cellulaires du TNF $\alpha$ . Nous nous sommes posée la question de savoir si les DRO d'origine endogène modifiaient aussi l'expression des récepteurs du TNF $\alpha$  à la surface des monocytes circulants humains. Ce travail a représenté mon mémoire de DEA. La préparation des monocytes et les études de liaison ont été réalisées dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment. Les résultats démontrent que le blocage de la formation de radicaux hydroxyl (OH $\cdot$ ) par la desferrioxamine (DFX), chélateur du fer, induit une augmentation de l'expression des récepteurs du TNF $\alpha$  à la surface des monocytes. Cette augmentation dépend de la dose de DFX et du temps d'incubation. Elle est expliquée par une augmentation du nombre de récepteurs elle-même due à un allongement de leur demi-vie. Le mécanisme d'action de la DFX pourrait comporter une réduction de l'oxydation des récepteurs du TNF $\alpha$  riches en cystéine.

La même étude réalisée en présence de LPS met aussi en évidence une augmentation de la liaison du <sup>125</sup>I- TNF $\alpha$  à la surface des monocytes traités par la DFX. Mais, dans ce cas, l'augmentation n'est pas due à une variation du nombre ou de l'affinité des récepteurs mais à un accroissement de leur disponibilité par réduction de leur occupation par le TNF $\alpha$  endogène. En accord avec ce mécanisme, la synthèse monocyttaire de TNF $\alpha$  mesurée par dosages immunoradiométrique et biologique apparaît moindre en présence de DFX. La

diminution atteint 40% pour le TNF $\alpha$  immunoréactif et 80% pour le TNF $\alpha$  biologiquement actif. La comparaison de ces deux résultats a permis d'estimer l'inactivation des molécules de TNF $\alpha$  libérées. Cette inactivation atteint 57% après deux heures et 78% après 12 heures en l'absence de DFX, et 82% après deux heures et 94% après 12 heures en présence de DFX. Elle serait expliquée par la liaison du TNF $\alpha$  à un inhibiteur, par exemple la forme soluble de son récepteur. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons mesuré la liaison du <sup>125</sup>I- TNF $\alpha$  aux protéines libérées dans les surnageants de monocytes (ligand-blot). Cette liaison est apparue supérieure dans les surnageants de monocytes traités par la DFX. Un argument en faveur de l'implication de la forme soluble du récepteur du TNF $\alpha$  dans cette liaison nous a été donné par les résultats de son dosage immunoenzymatique dans les mêmes surnageants. Le récepteur soluble de type II est détectable dans ces surnageants alors que le récepteur soluble de type I ne l'est pas. Sa concentration augmente après exposition des monocytes à des concentrations croissantes de LPS et/ou de DFX. La DFX pourrait donc être active en augmentant le clivage de la forme membranaire du récepteur II et /ou en prévenant sa dégradation.

Dans leur ensemble, ces résultats suggèrent que les DRO produits en même temps que le TNF $\alpha$  limitent l'action locale de cette cytokine en réduisant l'expression des récepteurs à la surface des monocytes et favorisent son action à distance en augmentant sa sécrétion et en réduisant son inhibition par les récepteurs solubles.

PHILIPPE C, FOUQUERAY B, PEREZ J, BAUD L : Upregulation of tumour necrosis factor-alpha receptors on monocytes by desferrioxamine. Clin. Exp. Immunol. 1992, 87 : 499-503.

PHILIPPE C, ROUX-LOMBARD P, FOUQUERAY B, PEREZ J, DAYER JM, BAUD L : Membrane expression and shedding of tumour necrosis factor receptors during activation of human blood monocytes : regulation by desferrioxamine. Immunology. 1993, 80 : 300-305. BAUD L,

PHILIPPE C, FOUQUERAY B, PEREZ J : Upregulation of tumor necrosis factor (TNF) receptors on monocytes by desferrioxamine (DFX). 23<sup>rd</sup> Annual Meeting of the American Society of Nephrology. Washington. 1990, abstract in J. Am. Soc. Nephrol. 1990, 1 : 437.

### **Modulation de son action par les plaquettes :**

Nous avons fait l'hypothèse que d'autres cellules présentes au sein d'un foyer tumoral ou inflammatoire pouvaient moduler la synthèse et/ou l'action du TNF $\alpha$  produit par les monocytes/macrophages. Les plaquettes sont des acteurs importants de l'inflammation et sont responsables de la libération de facteurs cytotoxiques. L'adhésion entre monocytes/macrophages et plaquettes survient au sein de la paroi vasculaire et dans les plaques athéromateuses mais également dans le courant sanguin, alors appelé « platelet satellitism », phénomène attribué aux désordres thrombotiques, comme les accidents vasculaires cérébraux (Reuter, S.Lang, D. 2009; van Gils, J.M. 2009).

Pour mettre en évidence cette interaction, nous avons isolé des plaquettes à partir de sang veineux de volontaires sains et étudié leur action sur la cytolyse induite par le TNF $\alpha$  sur des cellules cibles L929 . Nous avons observé un effet inhibiteur des plaquettes sur la cytotoxicité et la cytolyse du TNF $\alpha$ , déterminées par la libération de <sup>51</sup>Cr et la fragmentation du DNA. Cet effet dépend du nombre des plaquettes et peut atteindre 50%. Il est indépendant d'une réduction de la fixation de TNF $\alpha$  à la surface des L929 et indépendant d'une dégradation de cette cytokine. Cet effet est également observé lorsque les L929 sont mises en présence de surnageant de plaquettes incubées au moins 24 heures à 37°C. Ces résultats sont en faveur de l'existence d'un facteur soluble responsable d'une modification de la signalisation intracellulaire suivant la liaison du TNF $\alpha$  à son récepteur. Nous avons montré que ce facteur était un lipide de bas poids moléculaire, ayant une grande affinité pour l'albumine grâce à des expériences d'éluion à partir d'une filtration sur « Sephacryl S-200 ». Parmi les facteurs lipidiques sécrétés par les plaquettes, le seul qui ait permis de reproduire la diminution de l'activité cytolytique induite par le TNF $\alpha$  est l'acide 12(S) hydroxyeicosatétraénoïque. Le thromboxane A<sub>2</sub> et le platelet activating factor (PAF) sont sans effet.

La présence de plaquettes est donc à prendre en compte lorsque l'on étudie l'activité cytotoxique et cytolytique du TNF $\alpha$  .

PHILIPPE C, PHILIPPE B, FOUQUERAY B, PEREZ J, LEBRET M, BAUD L : Protection from tumor necrosis factor-mediated cytotoxicity by platelets. Am. J. Pathol, 1993, 143 : 1713-1723. BAUD L, PHILIPPE C, FOUQUERAY B, PHILIPPE B, PEREZ J. Protection from tumor necrosis factor (TNF)-mediated cytotoxicity by platelet secretory product. 25<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society of Nephrology. Baltimore. 1992, abstract in J. Am. Soc. Nephrol. 1992, 3 : 451.



## **Etude du système de signalisation du TNF $\alpha$ dans les cellules épithéliales glomérulaires humaines :**

Dans ce travail, nous avons analysé la cascade des événements intracellulaires provoqués par la liaison du TNF $\alpha$  à la surface des cellules cibles glomérulaires. Le modèle choisi a été l'expression de l'ARN messager de l'IL-8 et la production d'IL-8 par des cellules glomérulaires en culture exposées au TNF $\alpha$ .

Les lésions glomérulaires observées au cours de processus immunologiques (formation de complexes immuns) ou non immunologiques (atteintes ischémiques et toxiques) ont essentiellement pour cause la libération de médiateurs à partir de monocytes/macrophages infiltrant le flocculus ou à partir de cellules glomérulaires elles-mêmes. Ces médiateurs incluent à la fois des lipides (prostaglandines, leucotriènes), des facteurs de la coagulation, des protéines de la matrice extracellulaire, des enzymes, des DRO et des cytokines. Les cytokines le plus souvent impliquées dans les glomérulopathies sont l'IL-1, l'IL-6, le TNF $\alpha$  et les interférons. Le rôle du TNF $\alpha$  a été largement démontré en physiopathologie rénale (glomérulonéphrites expérimentales, lupus érythémateux, modèle de choc septique). Des études *in vitro* suggèrent que le TNF $\alpha$  entraîne une diminution du débit de filtration glomérulaire, la formation de thrombi intracapillaires et l'infiltration des glomérules par des cellules d'origine médullaire via la production par les cellules mésangiales de facteurs chimiotactiques dont l'IL-8 pour les neutrophiles.

Nous avons montré que 1) Les cellules épithéliales glomérulaires sont une source d'IL-8 et que cette production est augmentée par le TNF $\alpha$ . 2) Les récepteurs concernés sont de type TNF-R-55 et non de type TNF-R-75. 3) Au moins deux facteurs de transcription nucléaire sont impliqués. En effet, des expériences de retardement sur gel ont montré l'implication de NF $\kappa$ B puis de AP-1. Le TNF $\alpha$  induit d'abord l'activation de NF $\kappa$ B qui apparaît dans le noyau après moins d'une heure, puis celle d'AP-1 dont la concentration est maximale après 4 heures. L'utilisation de deux inhibiteurs (APDC pour NF $\kappa$ B et curcumine pour AP-1) a démontré que le rôle de NF $\kappa$ B était plus important dans l'induction de la transcription du gène de l'IL-8 à 2 heures. Cependant, AP-1 pourrait jouer un rôle à un temps ultérieur

puisque après 4 heures, l'APDC rétablit pour une part la production d'IL-8 TNF $\alpha$ -dépendante. Puisque l'APDC bloque l'activité des DRO, ces résultats suggèrent que dans les cellules épithéliales glomérulaires en culture, les DRO favorisent l'expression de NF $\kappa$ B et au contraire limitent celle de AP-1. 4) Enfin, le rôle des tyrosine-kinases a été mis en évidence par des expériences utilisant des inhibiteurs spécifiques (vanadate : inhibiteur des phosphotyrosine-phosphatases et génistéine : inhibiteur des tyrosine-kinases).

Ces travaux ont fait l'objet du DEA de Me Agnès Belhassen que j'ai encadré et ont été publiés sous forme d'abstract.

DEA Physiologie et Physiopathologie rénales. 5/09/1994. Agnès Belhassen. Etude du système de signalisation du TNF $\alpha$  dans les cellules épithéliales glomérulaires humaines.

PHILIPPE C, FOUQUERAY B, ARDAILLOU N, BAUD L. Tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) induced expression of interleukin-8 (IL-8) in human glomerular epithelial cells (GEC) : Potential signaling pathways. 27<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society of Nephrology. Orlando. 1994, abstract in J. Am. Soc. Nephrol. 1994 5 : 728.

## Bibliographie

AASM (1999). "Sleep-disordered breathing disorders in adults: recommendations for syndrome definition and measurement techniques in clinical research. The Report of an American Academy of Sleep Medicine Task Force." Sleep **22**(5): 667-669.

Adhikary, G., Kline, D., Yuan, G., Kumar, G. K., Simonson, M. S., Cherniack, N. S. and Prabhakar, N. R. (2001). "Gene regulation during intermittent hypoxia: evidence for the involvement of reactive oxygen species." Adv Exp Med Biol **499**: 297-302.

Akashiba, T., Akahoshi, T., Kawahara, S., Majima, T. and Horie, T. (2005). "Effects of long-term nasal continuous positive airway pressure on C-reactive protein in patients with obstructive sleep apnea syndrome." Intern Med **44**(8): 899-900.

Alberti, A., Sarchielli, P., Gallinella, E., Floridi, A., Mazzotta, G. and Gallai, V. (2003). "Plasma cytokine levels in patients with obstructive sleep apnea syndrome: a preliminary study." J Sleep Res **12**(4): 305-311.

Aloia, M. S., Arnedt, J. T., Davis, J. D., Riggs, R. L. and Byrd, D. (2004). "Neuropsychological sequelae of obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome: a critical review." J Int Neuropsychol Soc **10**(5): 772-785.

Alzoghaibi, M. A. and Bahammam, A. S. (2005). "Lipid peroxides, superoxide dismutase and circulating IL-8 and GCP-2 in patients with severe obstructive sleep apnea: a pilot study." Sleep Breath **9**(3): 119-126.

Arnaud, C., Beguin, P. C., Lantuejoul, S., Pepin, J. L., Guillermet, C., Pelli, G., Burger, F., Buatois, V., Ribuot, C., Baguet, J. P., Mach, F., Levy, P. and Dematteis, M. (2011). "The Inflammatory Pre-Atherosclerotic Remodeling Induced by Intermittent Hypoxia is Attenuated by RANTES/CCL5 Inhibition." Am J Respir Crit Care Med.

Aron-Wisnewsky, J., Minville, C., Tordjman, J., Levy, P., Bouillot, J. L., Basdevant, A., Bedossa, P., Clement, K. and Pepin, J. L. (2011). "Chronic intermittent hypoxia is a major trigger for non-alcoholic fatty liver disease in morbid obese." J Hepatol.

Babu, A. R., Herdegen, J., Fogelfeld, L., Shott, S. and Mazzone, T. (2005). "Type 2 diabetes, glycemic control, and continuous positive airway pressure in obstructive sleep apnea." Arch Intern Med **165**(4): 447-452.

Baguet, J. P., Hammer, L., Levy, P., Pierre, H., Launois, S., Mallion, J. M. and Pepin, J. L. (2005). "The severity of oxygen desaturation is predictive of carotid wall thickening and plaque occurrence." Chest **128**(5): 3407-3412.

Baguet, J. P., Levy, P., Barone-Rochette, G., Tamisier, R., Pierre, H., Peeters, M., Mallion, J. M. and Pepin, J. L. (2008). "Masked hypertension in obstructive sleep apnea syndrome." J Hypertens **26**(5): 885-892.

Bao, G., Metreveli, N. and Fletcher, E. C. (1999). "Acute and chronic blood pressure response to recurrent acoustic arousal in rats." Am J Hypertens **12**(5): 504-510.

Barcelo, A., Barbe, F., Llompарт, E., Mayoralas, L. R., Ladaria, A., Bosch, M. and Agusti, A. G. (2004). "Effects of obesity on C-reactive protein level and metabolic disturbances in male patients with obstructive sleep apnea." Am J Med **117**(2): 118-121.

Barcelo, A., Miralles, C., Barbe, F., Vila, M., Pons, S. and Agusti, A. G. (2000). "Abnormal lipid peroxidation in patients with sleep apnoea." Eur Respir J **16**(4): 644-647.

Baumgardner, J. E. and Otto, C. M. (2003). "In vitro intermittent hypoxia: challenges for creating hypoxia in cell culture." Respir Physiol Neurobiol **136**(2-3): 131-139.

Beckman, J. S. and Koppenol, W. H. (1996). "Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly." Am J Physiol **271**(5 Pt 1): C1424-1437.

Belaiba, R. S., Bonello, S., Zahringer, C., Schmidt, S., Hess, J., Kietzmann, T. and Gorch, A. (2007). "Hypoxia up-regulates hypoxia-inducible factor-1alpha transcription by involving phosphatidylinositol 3-kinase and nuclear factor kappaB in pulmonary artery smooth muscle cells." Mol Biol Cell **18**(12): 4691-4697.

Belozeroff, V., Berry, R. B., SAHOSsoon, C. S. and Khoo, M. C. (2002). "Effects of CPAP therapy on cardiovascular variability in obstructive sleep apnea: a closed-loop analysis." Am J Physiol Heart Circ Physiol **282**(1): H110-121.

Benjamin, J. A., Moller, M., Ebden, P., Bartle, I. and Lewis, K. E. (2008). "Serum angiotensin converting enzyme and the obstructive sleep apnea hypopnea syndrome." J Clin Sleep Med **4**(4): 325-331.

Bhandari, V., Choo-Wing, R., Chapoval, S. P., Lee, C. G., Tang, C., Kim, Y. K., Ma, B., Baluk, P., Lin, M. I., McDonald, D. M., Homer, R. J., Sessa, W. C. and Elias, J. A. (2006). "Essential role of nitric oxide in VEGF-induced, asthma-like angiogenic, inflammatory, mucus, and physiologic responses in the lung." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(29): 11021-11026.

Bickelmann, A. G., Burwell, C. S., Robin, E. D. and Whaley, R. D. (1956). "Extreme obesity associated with alveolar hypoventilation; a Pickwickian syndrome." Am J Med **21**(5): 811-818.

Bixler, E. O., Vgontzas, A. N., Lin, H. M., Ten Have, T., Leiby, B. E., Vela-Bueno, A. and Kales, A. (2000). "Association of hypertension and sleep-disordered breathing." Arch Intern Med **160**(15): 2289-2295.

Blankenberg, S., Rupprecht, H. J., Bickel, C., Peetz, D., Hafner, G., Tiret, L. and Meyer, J. (2001). "Circulating cell adhesion molecules and death in patients with coronary artery disease." Circulation **104**(12): 1336-1342.

Boekholdt, S. M., Peters, R. J., Hack, C. E., Day, N. E., Luben, R., Bingham, S. A., Wareham, N. J., Reitsma, P. H. and Khaw, K. T. (2004). "IL-8 plasma concentrations and the risk of future coronary artery disease in apparently healthy men and women: the EPIC-Norfolk prospective population study." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(8): 1503-1508.

Bonizzi, G. and Karin, M. (2004). "The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity." Trends Immunol **25**(6): 280-288.

Bonsignore, M. R., Parati, G., Insalaco, G., Marrone, O., Castiglioni, P., Romano, S., Di Rienzo, M., Mancina, G. and Bonsignore, G. (2002). "Continuous positive airway pressure treatment improves baroreflex control of heart rate during sleep in severe obstructive sleep apnea syndrome." Am J Respir Crit Care Med **166**(3): 279-286.

Bosse, Y., Thompson, C., Stankova, J. and Rola-Pleszczynski, M. (2006). "Fibroblast growth factor 2 and transforming growth factor beta1 synergism in human bronchial smooth muscle cell proliferation." Am J Respir Cell Mol Biol **34**(6): 746-753.

Botros, N., Concato, J., Mohsenin, V., Selim, B., Doctor, K. and Yaggi, H. K. (2009). "Obstructive sleep apnea as a risk factor for type 2 diabetes." Am J Med **122**(12): 1122-1127.

Botterel, F., Cordonnier, C., Barbier, V., Wingerstmann, L., Liance, M., Coste, A., Escudier, E. and Bretagne, S. (2002). "Aspergillus fumigatus causes in vitro electrophysiological and morphological modifications in human nasal epithelial cells." Histol Histopathol **17**(4): 1095-1101.

Bowie, A. and O'Neill, L. A. (2000). "Oxidative stress and nuclear factor-kappaB activation: a reassessment of the evidence in the light of recent discoveries." Biochem Pharmacol **59**(1): 13-23.

Boyd, J. H., Petrof, B. J., Hamid, Q., Fraser, R. and Kimoff, R. J. (2004). "Upper airway muscle inflammation and denervation changes in obstructive sleep apnea." Am J Respir Crit Care Med **170**(5): 541-546.

Braga, V. A., Soriano, R. N. and Machado, B. H. (2006). "Sympathoexcitatory response to peripheral chemoreflex activation is enhanced in juvenile rats exposed to chronic intermittent hypoxia." Exp Physiol **91**(6): 1025-1031.

Brooks, D., Horner, R. L., Kozar, L. F., Render-Teixeira, C. L. and Phillipson, E. A. (1997). "Obstructive sleep apnea as a cause of systemic hypertension. Evidence from a canine model." J Clin Invest **99**(1): 106-109.

Caligiuri, G., Rudling, M., Ollivier, V., Jacob, M. P., Michel, J. B., Hansson, G. K. and Nicoletti, A. (2003). "Interleukin-10 deficiency increases atherosclerosis, thrombosis, and low-density lipoproteins in apolipoprotein E knockout mice." Mol Med **9**(1-2): 10-17.

Campen, M. J., Shimoda, L. A. and O'Donnell, C. P. (2005). "Acute and chronic cardiovascular effects of intermittent hypoxia in C57BL/6J mice." J Appl Physiol **99**(5): 2028-2035.

Cao, J. J., Arnold, A. M., Manolio, T. A., Polak, J. F., Psaty, B. M., Hirsch, C. H., Kuller, L. H. and Cushman, M. (2007). "Association of carotid artery intima-media thickness, plaques, and C-reactive protein with future cardiovascular disease and all-cause mortality: the Cardiovascular Health Study." Circulation **116**(1): 32-38.

Carlson, J. T., Hedner, J., Elam, M., Ejnell, H., Sellgren, J. and Wallin, B. G. (1993). "Augmented resting sympathetic activity in awake patients with obstructive sleep apnea." Chest **103**(6): 1763-1768.

Carlson, J. T., Hedner, J. A., Sellgren, J., Elam, M. and Wallin, B. G. (1996). "Depressed baroreflex sensitivity in patients with obstructive sleep apnea." Am J Respir Crit Care Med **154**(5): 1490-1496.

Carneiro, G., Togeiro, S. M., Ribeiro-Filho, F. F., Truksinas, E., Ribeiro, A. B., Zanella, M. T. and Tufik, S. (2009). "Continuous positive airway pressure therapy improves hypoalbuminemia in severe obese men with obstructive sleep apnea without changes in insulin resistance." Metab Syndr Relat Disord **7**(6): 537-542.

Carpagnano, G. E., Foschino-Barbaro, M. P., Resta, O. and Barnes, P. J. (2005). "Oxidative stress and cardiovascular complications in sleep apnea." Chest **127**(6): 2294.

Carpagnano, G. E., Spanevello, A., Sabato, R., Depalo, A., Palladino, G. P., Bergantino, L. and Foschino Barbaro, M. P. (2010). "Systemic and airway inflammation in sleep apnea and obesity: the role of ICAM-1 and IL-8." Transl Res **155**(1): 35-43.

Chin, K., Nakamura, T., Shimizu, K., Mishima, M., Miyasaka, M. and Ohi, M. (2000). "Effects of nasal continuous positive airway pressure on soluble cell adhesion molecules in patients with obstructive sleep apnea syndrome." Am J Med **109**(7): 562-567.

Chin, K., Nakamura, T., Takahashi, K., Sumi, K., Ogawa, Y., Masuzaki, H., Muro, S., Hattori, N., Matsumoto, H., Niimi, A., Chiba, T., Nakao, K., Mishima, M. and Ohi, M. (2003). "Effects of

obstructive sleep apnea syndrome on serum aminotransferase levels in obese patients." Am J Med **114**(5): 370-376.

Christou, K., Moulas, A. N., Pastaka, C. and Gourgoulianis, K. I. (2003). "Antioxidant capacity in obstructive sleep apnea patients." Sleep Med **4**(3): 225-228.

Chung, K. F. (2006). "Cytokines as targets in chronic obstructive pulmonary disease." Curr Drug Targets **7**(6): 675-681.

Ciftci, T. U., Kokturk, O., Bukan, N. and Bilgihan, A. (2004). "The relationship between serum cytokine levels with obesity and obstructive sleep apnea syndrome." Cytokine **28**(2): 87-91.

Constantinidis, J., Ereladis, S., Angouridakis, N., Konstantinidis, I., Vital, V. and Angouridaki, C. (2008). "Cytokine changes after surgical treatment of obstructive sleep apnoea syndrome." Eur Arch Otorhinolaryngol **265**(10): 1275-1279.

Coste, A., Brugel, L., Maitre, B., Bousat, S., Papon, J. F., Wingerstmann, L., Peynegre, R. and Escudier, E. (2000). "Inflammatory cells as well as epithelial cells in nasal polyps express vascular endothelial growth factor." Eur Respir J **15**(2): 367-372.

d'Ortho, M.-P., Clerici, C., Yao, P. M., Delacourt, C., Delclaux, C., Franco-Montoya, M.-L., Harf, A. and Lafuma, C. (1997). "Type II pneumocytes in vitro produce type IV collagenases and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 (TIMP-2)." Am J Physiol **273**: L663-L675.

Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, R., Giustarini, D. and Milzani, A. (2006). "Biomarkers of oxidative damage in human disease." Clin Chem **52**(4): 601-623.

Dawson, A., Abel, S. L., Loving, R. T., Dailey, G., Shadan, F. F., Cronin, J. W., Kripke, D. F. and Kline, L. E. (2008). "CPAP therapy of obstructive sleep apnea in type 2 diabetics improves glycemic control during sleep." J Clin Sleep Med **4**(6): 538-542.

Dematteis, M., Godin-Ribuot, D., Arnaud, C., Ribuot, C., Stanke-Labesque, F., Pepin, J. L. and Levy, P. (2009). "Cardiovascular consequences of sleep-disordered breathing: contribution of animal models to understanding the human disease." ILAR J **50**(3): 262-281.

Dematteis, M., Julien, C., Guillermet, C., Sturm, N., Lantuejoul, S., Mallaret, M., Levy, P. and Gozal, E. (2008). "Intermittent hypoxia induces early functional cardiovascular remodeling in mice." Am J Respir Crit Care Med **177**(2): 227-235.

Devouassoux, G., Levy, P., Rossini, E., Pin, I., Fior-Gozman, M., Henry, M., Seigneurin, D. and Pepin, J. L. (2007). "Sleep apnea is associated with bronchial inflammation and continuous positive airway pressure-induced airway hyperresponsiveness." J Allergy Clin Immunol.

Dickens, C. (1837). "The posthumous Papers of the Pickwick Club." **1**(4).

Drager, L. F., Bortolotto, L. A., Figueiredo, A. C., Krieger, E. M. and Lorenzi, G. F. (2007). "Effects of continuous positive airway pressure on early signs of atherosclerosis in obstructive sleep apnea." Am J Respir Crit Care Med **176**(7): 706-712.

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**(5): 613-618.

Duchna, H. W., Guilleminault, C., Stoohs, R. A., Faul, J. L., Moreno, H., Hoffman, B. B. and Blaschke, T. F. (2000). "Vascular reactivity in obstructive sleep apnea syndrome." Am J Respir Crit Care Med **161**(1): 187-191.

Dyugovskaya, L., Lavie, P., Hirsh, M. and Lavie, L. (2005a). "Activated CD8+ T-lymphocytes in obstructive sleep apnoea." Eur Respir J **25**(5): 820-828.

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**(7): 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**(2): 242-249.

Dyugovskaya, L., Lavie, P. and Lavie, L. (2005b). "Lymphocyte activation as a possible measure of atherosclerotic risk in patients with sleep apnea." Ann N Y Acad Sci **1051**: 340-350.

Dyugovskaya, L., Polyakov, A., Lavie, P. and Lavie, L. (2008). "Delayed neutrophil apoptosis in patients with sleep apnea." Am J Respir Crit Care Med **177**(5): 544-554.

Eisensehr, I. and Noachtar, S. (2001). "Haematological aspects of obstructive sleep apnoea." Sleep Med Rev **5**(3): 207-221.

El-Solh, A. A., Mador, M. J., Sikka, P., Dhillon, R. S., Amsterdam, D. and Grant, B. J. (2002). "Adhesion molecules in patients with coronary artery disease and moderate-to-severe obstructive sleep apnea." Chest **121**(5): 1541-1547.



El Solh, A. A., Saliba, R., Bosinski, T., Grant, B. J., Berbary, E. and Miller, N. (2006). "Allopurinol improves endothelial function in sleep apnoea: a randomised controlled study." Eur Respir J **27**(5): 997-1002.

Elhage, R., Jawien, J., Rudling, M., Ljunggren, H. G., Takeda, K., Akira, S., Bayard, F. and Hansson, G. K. (2003). "Reduced atherosclerosis in interleukin-18 deficient apolipoprotein E-knockout mice." Cardiovasc Res **59**(1): 234-240.

Farre, R., Rotger, M., Montserrat, J. M., Calero, G. and Navajas, D. (2003). "Collapsible upper airway segment to study the obstructive sleep apnea/hypopnea syndrome in rats." Respir Physiol Neurobiol **136**(2-3): 199-209.

Fletcher, E. (1990). "Chronic lung disease in the sleep apnea syndrome." Lung **168 Suppl**: 751-761.

Fletcher, E. C. (2001). "Invited review: Physiological consequences of intermittent hypoxia: systemic blood pressure." J Appl Physiol **90**(4): 1600-1605.

Fletcher, E. C., Lesske, J., Behm, R., Miller, C. C., 3rd, Stauss, H. and Unger, T. (1992a). "Carotid chemoreceptors, systemic blood pressure, and chronic episodic hypoxia mimicking sleep apnea." J Appl Physiol **72**(5): 1978-1984.

Fletcher, E. C., Lesske, J., Culman, J., Miller, C. C. and Unger, T. (1992b). "Sympathetic denervation blocks blood pressure elevation in episodic hypoxia." Hypertension **20**(5): 612-619.

Fletcher, E. C., Lesske, J., Qian, W., Miller, C. C., 3rd and Unger, T. (1992c). "Repetitive, episodic hypoxia causes diurnal elevation of blood pressure in rats." Hypertension **19**(6 Pt 1): 555-561.

Fletcher, E. C., Miller, J., Schaaf, J. W. and Fletcher, J. G. (1987). "Urinary catecholamines before and after tracheostomy in patients with obstructive sleep apnea and hypertension." Sleep **10**(1): 35-44.

Fletcher, E. C., Orolinova, N. and Bader, M. (2002). "Blood pressure response to chronic episodic hypoxia: the renin-angiotensin system." J Appl Physiol **92**(2): 627-633.

Foster, G. E., Brugniaux, J. V., Pialoux, V., Duggan, C. T., Hanly, P. J., Ahmed, S. B. and Poulin, M. J. (2009). "Cardiovascular and cerebrovascular responses to acute hypoxia following exposure to intermittent hypoxia in healthy humans." J Physiol **587**(Pt 13): 3287-3299.

Gagnadoux, F. (2010). "Recommendations for clinical practice in the management of obstructive sleep apnea syndrome in adults. ." Revue des Maladies Respiratoires **27**(S3).

Gami, A. S., Rader, S., Svatikova, A., Wolk, R., Herold, D. L., Huyber, C., Winnicki, M. and Somers, V. K. (2007). "Familial premature coronary artery disease mortality and obstructive sleep apnea." Chest **131**(1): 118-121.

Garvey, J. F., Taylor, C. T. and McNicholas, W. T. (2009). "Cardiovascular disease in obstructive sleep apnoea syndrome: the role of intermittent hypoxia and inflammation." Eur Respir J **33**(5): 1195-1205.

Gastaut, H., Tassinari, C. A. and Duron, B. (1965). "[Polygraphic study of diurnal and nocturnal (hypnic and respiratory) episodal manifestations of Pickwick syndrome]." Rev Neurol (Paris) **112**(6): 568-579.

Goldbart, A. D., Goldman, J. L., Li, R. C., Brittan, K. R., Tauman, R. and Gozal, D. (2004). "Differential expression of cysteinyl leukotriene receptors 1 and 2 in tonsils of children with obstructive sleep apnea syndrome or recurrent infection." Chest **126**(1): 13-18.

Goldbart, A. D., Goldman, J. L., Veling, M. C. and Gozal, D. (2005). "Leukotriene modifier therapy for mild sleep-disordered breathing in children." Am J Respir Crit Care Med **172**(3): 364-370.

Govindaraju, V., Michoud, M. C., Al-Chalabi, M., Ferraro, P., Powell, W. S. and Martin, J. G. (2006). "Interleukin-8: novel roles in human airway smooth muscle cell contraction and migration." Am J Physiol Cell Physiol **291**(5): C957-965.

Gozal, D., Daniel, J. M. and Dohanich, G. P. (2001). "Behavioral and anatomical correlates of chronic episodic hypoxia during sleep in the rat." J Neurosci **21**(7): 2442-2450.

Gozal, E., Sachleben, L. R., Jr., Rane, M. J., Vega, C. and Gozal, D. (2005). "Mild sustained and intermittent hypoxia induce apoptosis in PC-12 cells via different mechanisms." Am J Physiol Cell Physiol **288**(3): C535-542.

Greenberg, G. D., Watson, R. K. and Deptula, D. (1987). "Neuropsychological dysfunction in sleep apnea." Sleep **10**(3): 254-262.

Greenberg, H., Ye, X., Wilson, D., Htoo, A. K., Hendersen, T. and Liu, S. F. (2006). "Chronic intermittent hypoxia activates nuclear factor-kappaB in cardiovascular tissues in vivo." Biochem Biophys Res Commun **343**(2): 591-596.

Grote, L., Ploch, T., Heitmann, J., Knaack, L., Penzel, T. and Peter, J. H. (1999). "Sleep-related breathing disorder is an independent risk factor for systemic hypertension." Am J Respir Crit Care Med **160**(6): 1875-1882.

Guilleminault, C., Eldridge, F. L. and Dement, W. C. (1973). "Insomnia with sleep apnea: a new syndrome." Science **181**(102): 856-858.

Guilleminault, C., Kirisoglu, C. and Ohayon, M. M. (2004). "C-reactive protein and sleep-disordered breathing." Sleep **27**(8): 1507-1511.

Haentjens, P., Van Meerhaeghe, A., Moscariello, A., De Weerd, S., Poppe, K., Dupont, A. and Velkeniers, B. (2007). "The impact of continuous positive airway pressure on blood pressure in patients with obstructive sleep apnea syndrome: evidence from a meta-analysis of placebo-controlled randomized trials." Arch Intern Med **167**(8): 757-764.

Haim, M., Tanne, D., Boyko, V., Reshef, T., Goldbourt, U., Leor, J., Mekori, Y. A. and Behar, S. (2002). "Soluble intercellular adhesion molecule-1 and long-term risk of acute coronary events in patients with chronic coronary heart disease. Data from the Bezafibrate Infarction Prevention (BIP) Study." J Am Coll Cardiol **39**(7): 1133-1138.

Hamrahi, H., Chan, B. and Horner, R. L. (2001a). "On-line detection of sleep-wake states and application to produce intermittent hypoxia only in sleep in rats." J Appl Physiol **90**(6): 2130-2140.

Hamrahi, H., Stephenson, R., Mahamed, S., Liao, K. S. and Horner, R. L. (2001b). "Selected Contribution: Regulation of sleep-wake states in response to intermittent hypoxic stimuli applied only in sleep." J Appl Physiol **90**(6): 2490-2501.

Harsch, I. A., Schahin, S. P., Radespiel-Troger, M., Weintz, O., Jahreiss, H., Fuchs, F. S., Wiest, G. H., Hahn, E. G., Lohmann, T., Konturek, P. C. and Ficker, J. H. (2004a). "Continuous positive airway pressure treatment rapidly improves insulin sensitivity in patients with obstructive sleep apnea syndrome." Am J Respir Crit Care Med **169**(2): 156-162.

Harsch, I. A., Wallaschofski, H., Koenig, C., Pour Schahin, S., Hahn, E. G., Ficker, J. H. and Lohmann, T. (2004b). "Adiponectin in patients with obstructive sleep apnea syndrome: course and physiological relevance." Respiration **71**(6): 580-586.

Haverkate, F., Thompson, S. G., Pyke, S. D., Gallimore, J. R. and Pepys, M. B. (1997). "Production of C-reactive protein and risk of coronary events in stable and unstable angina. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study Group." Lancet **349**(9050): 462-466.

Hayashi, M., Fujimoto, K., Urushibata, K., Takamizawa, A., Kinoshita, O. and Kubo, K. (2006). "Hypoxia-sensitive molecules may modulate the development of atherosclerosis in sleep apnoea syndrome." Respirology **11**(1): 24-31.

Hendricks, J. C., Kline, L. R., Kovalski, R. J., O'Brien, J. A., Morrison, A. R. and Pack, A. I. (1987). "The English bulldog: a natural model of sleep-disordered breathing." J Appl Physiol **63**(4): 1344-1350.

Holgate, S. T. (2004). "Cytokine and anti-cytokine therapy for the treatment of asthma and allergic disease." Cytokine **28**(4-5): 152-157.

Hwang, S. J., Ballantyne, C. M., Sharrett, A. R., Smith, L. C., Davis, C. E., Gotto, A. M., Jr. and Boerwinkle, E. (1997). "Circulating adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease cases: the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study." Circulation **96**(12): 4219-4225.

Iiyori, N., Alonso, L. C., Li, J., Sanders, M. H., Garcia-Ocana, A., O'Doherty, R. M., Polotsky, V. Y. and O'Donnell, C. P. (2007). "Intermittent hypoxia causes insulin resistance in lean mice independent of autonomic activity." Am J Respir Crit Care Med **175**(8): 851-857.

Ip, M. S., Lam, B., Ng, M. M., Lam, W. K., Tsang, K. W. and Lam, K. S. (2002). "Obstructive sleep apnea is independently associated with insulin resistance." Am J Respir Crit Care Med **165**(5): 670-676.

Isono, S., Feroah, T. R., Hajduk, E. A., Brant, R., Whitelaw, W. A. and Remmers, J. E. (1997). "Interaction of cross-sectional area, driving pressure, and airflow of passive velopharynx." J Appl Physiol **83**(3): 851-859.

Itzhaki, S., Dorchin, H., Clark, G., Lavie, L., Lavie, P. and Pillar, G. (2007). "The effects of 1-year treatment with a Herbst mandibular advancement splint on obstructive sleep apnea, oxidative stress, and endothelial function." Chest **131**(3): 740-749.

Jeffery, P. K. (2001). "Remodeling in asthma and chronic obstructive lung disease." Am J Respir Crit Care Med **164**(10 Pt 2): S28-38.

Jelic, S., Lederer, D. J., Adams, T., Padeletti, M., Colombo, P. C., Factor, P. H. and Le Jemtel, T. H. (2010). "Vascular inflammation in obesity and sleep apnea." Circulation **121**(8): 1014-1021.

Johnson, K. G. and Johnson, D. C. (2010). "Frequency of sleep apnea in stroke and TIA patients: a meta-analysis." J Clin Sleep Med **6**(2): 131-137.

Julien, C., Bayat, S. and Levy, P. (2003). "Vascular reactivity to norepinephrine and acetylcholine after chronic intermittent hypoxia in mice." Respir Physiol Neurobiol **139**(1): 21-32.

Jun, J. and Polotsky, V. Y. (2009). "Metabolic consequences of sleep-disordered breathing." ILAR J **50**(3): 289-306.

Kalaria, R. N., Spoor, L., Laude, E. A., Emery, C. J., Thwaites-Bee, D., Fairlie, J., Oakley, A. E., Barer, D. H. and Barer, G. R. (2004). "Hypoxia of sleep apnoea: cardiopulmonary and cerebral changes after intermittent hypoxia in rats." Respir Physiol Neurobiol **140**(1): 53-62.

Kanbay, A., Kokturk, O., Ciftci, T. U., Tavil, Y. and Bukan, N. (2008). "Comparison of serum adiponectin and tumor necrosis factor-alpha levels between patients with and without obstructive sleep apnea syndrome." Respiration **76**(3): 324-330.

Karin, M. and Ben-Neriah, Y. (2000). "Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity." Annu Rev Immunol **18**: 621-663.

Kato, M., Roberts-Thomson, P., Phillips, B. G., Haynes, W. G., Winnicki, M., Accurso, V. and Somers, V. K. (2000). "Impairment of endothelium-dependent vasodilation of resistance vessels in patients with obstructive sleep apnea." Circulation **102**(21): 2607-2610.

Kaynak, D., Goksan, B., Kaynak, H., Degirmenci, N. and Daglioglu, S. (2003). "Is there a link between the severity of sleep-disordered breathing and atherosclerotic disease of the carotid arteries?" Eur J Neurol **10**(5): 487-493.

Khera, A., de Lemos, J. A., Peshock, R. M., Lo, H. S., Stanek, H. G., Murphy, S. A., Wians, F. H., Jr., Grundy, S. M. and McGuire, D. K. (2006). "Relationship between C-reactive protein and subclinical atherosclerosis: the Dallas Heart Study." Circulation **113**(1): 38-43.

Kiely, J. L. and McNicholas, W. T. (2000). "Cardiovascular risk factors in patients with obstructive sleep apnoea syndrome." Eur Respir J **16**(1): 128-133.

Kimoff, R. J., Hamid, Q., Divangahi, M., Hussain, S., Bao, W., Naor, N., Payne, R. J., Ariyaratnam, A., Mulrain, K. and Petrof, B. J. (2011). "Increased upper airway cytokines and oxidative stress in severe obstructive sleep apnoea." Eur Respir J **38**(1): 89-97.

Kirkness, J. P., Madronio, M., Stavrinou, R., Wheatley, J. R. and Amis, T. C. (2003). "Relationship between surface tension of upper airway lining liquid and upper airway collapsibility during sleep in obstructive sleep apnea hypopnea syndrome." J Appl Physiol **95**(5): 1761-1766.

Klein, J. B., Barati, M. T., Wu, R., Gozal, D., Sachleben, L. R., Jr., Kausar, H., Trent, J. O., Gozal, E. and Rane, M. J. (2005). "Akt-mediated valosin-containing protein 97 phosphorylation regulates its association with ubiquitinated proteins." J Biol Chem **280**(36): 31870-31881.

Koenig, W., Sund, M., Frohlich, M., Fischer, H. G., Lowel, H., Doring, A., Hutchinson, W. L. and Pepys, M. B. (1999). "C-Reactive protein, a sensitive marker of inflammation, predicts future risk of coronary heart disease in initially healthy middle-aged men: results from the MONICA (Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease) Augsburg Cohort Study, 1984 to 1992." Circulation **99**(2): 237-242.

Kohler, M., Ayers, L., Pepperell, J. C., Packwood, K. L., Ferry, B., Crosthwaite, N., Craig, S., Siccoli, M. M., Davies, R. J. and Stradling, J. R. (2009). "Effects of continuous positive airway pressure on systemic inflammation in patients with moderate to severe obstructive sleep apnoea: a randomised controlled trial." Thorax **64**(1): 67-73.

Kokturk, O., Ciftci, T. U., Mollarecep, E. and Ciftci, B. (2005). "Elevated C-reactive protein levels and increased cardiovascular risk in patients with obstructive sleep apnea syndrome." Int Heart J **46**(5): 801-809.

Kraiczi, H., Hedner, J., Peker, Y. and Carlson, J. (2000). "Increased vasoconstrictor sensitivity in obstructive sleep apnea." J Appl Physiol **89**(2): 493-498.

Kumar, G. K., Kim, D. K., Lee, M. S., Ramachandran, R. and Prabhakar, N. R. (2003). "Activation of tyrosine hydroxylase by intermittent hypoxia: involvement of serine phosphorylation." J Appl Physiol **95**(2): 536-544.

Kumar, G. K., Rai, V., Sharma, S. D., Ramakrishnan, D. P., Peng, Y. J., Souvannakitti, D. and Prabhakar, N. R. (2006). "Chronic intermittent hypoxia induces hypoxia-evoked catecholamine efflux in adult rat adrenal medulla via oxidative stress." J Physiol **575**(Pt 1): 229-239.

Kuri, B. A., Khan, S. A., Chan, S. A., Prabhakar, N. R. and Smith, C. B. (2007). "Increased secretory capacity of mouse adrenal chromaffin cells by chronic intermittent hypoxia: involvement of protein kinase C." J Physiol **584**(Pt 1): 313-319.

Laaban, J. P., Daenen, S., Leger, D., Pascal, S., Bayon, V., Slama, G. and Elgrably, F. (2009). "Prevalence and predictive factors of sleep apnoea syndrome in type 2 diabetic patients." Diabetes Metab **35**(5): 372-377.

Lai, C. J., Yang, C. C., Hsu, Y. Y., Lin, Y. N. and Kuo, T. B. (2006). "Enhanced sympathetic outflow and decreased baroreflex sensitivity are associated with intermittent hypoxia-induced systemic hypertension in conscious rats." J Appl Physiol **100**(6): 1974-1982.

Lam, J. C., Lam, B., Yao, T. J., Lai, A. Y., Ooi, C. G., Tam, S., Lam, K. S. and Ip, M. S. (2010). "A randomised controlled trial of nasal continuous positive airway pressure on insulin sensitivity in obstructive sleep apnoea." Eur Respir J **35**(1): 138-145.

Lattimore, J. D., Wilcox, I., Nakhla, S., Langenfeld, M., Jessup, W. and Celermajer, D. S. (2005). "Repetitive hypoxia increases lipid loading in human macrophages-a potentially atherogenic effect." Atherosclerosis **179**(2): 255-259.

Launois, S. H., Averill, N., Abraham, J. H., Kirby, D. A. and Weiss, J. W. (2001). "Cardiovascular responses to nonrespiratory and respiratory arousals in a porcine model." J Appl Physiol **90**(1): 114-120.

Lavie, L., Dyugovskaya, L. and Lavie, P. (2005). "Sleep-apnea-related intermittent hypoxia and atherogenesis: adhesion molecules and monocytes/endothelial cells interactions." Atherosclerosis **183**(1): 183-184.

Lavie, L., Dyugovskaya, L. and Polyakov, A. (2008). "Biology of peripheral blood cells in obstructive sleep apnea--the tip of the iceberg." Arch Physiol Biochem **114**(4): 244-254.

Lavie, L., Kraiczi, H., Hefetz, A., Ghandour, H., Perelman, A., Hedner, J. and Lavie, P. (2002). "Plasma vascular endothelial growth factor in sleep apnea syndrome: effects of nasal continuous positive air pressure treatment." Am J Respir Crit Care Med **165**(12): 1624-1628.

Lavie, L., Vishnevsky, A. and Lavie, P. (2004). "Evidence for lipid peroxidation in obstructive sleep apnea." Sleep **27**(1): 123-128.

Lavie, P., Herer, P. and Hoffstein, V. (2000). "Obstructive sleep apnoea syndrome as a risk factor for hypertension: population study." BMJ **320**(7233): 479-482.

Lechapt-Zalcman, E., Pruliere-Escabasse, V., Advenier, D., Galiacy, S., Charriere-Bertrand, C., Coste, A., Harf, A., d'Ortho, M. P. and Escudier, E. (2006). "Transforming growth factor-beta1 increases airway wound repair via MMP-2 upregulation: a new pathway for epithelial wound repair?" Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **290**(6): L1277-1282.

Lee, C. G., Link, H., Baluk, P., Homer, R. J., Chapoval, S., Bhandari, V., Kang, M. J., Cohn, L., Kim, Y. K., McDonald, D. M. and Elias, J. A. (2004). "Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces remodeling and enhances TH2-mediated sensitization and inflammation in the lung." Nat Med **10**(10): 1095-1103.

Lee, E. J., Woodske, M. E., Zou, B. and O'Donnell, C. P. (2009). "Dynamic arterial blood gas analysis in conscious, unrestrained C57BL/6J mice during exposure to intermittent hypoxia." J Appl Physiol **107**(1): 290-294.

Lesske, J., Fletcher, E. C., Bao, G. and Unger, T. (1997). "Hypertension caused by chronic intermittent hypoxia--influence of chemoreceptors and sympathetic nervous system." J Hypertens **15**(12 Pt 2): 1593-1603.

Levy, P., Pepin, J. L., Arnaud, C., Baguet, J. P., Dematteis, M. and Mach, F. (2009). "Obstructive sleep apnea and atherosclerosis." Prog Cardiovasc Dis **51**(5): 400-410.

Li, C., Zhang, X. L., Liu, H., Wang, Z. G. and Yin, K. S. (2009). "Association among plasma interleukin-18 levels, carotid intima-media thickness and severity of obstructive sleep apnea." Chin Med J (Engl) **122**(1): 24-29.

Li, J., Bosch-Marce, M., Nanayakkara, A., Savransky, V., Fried, S. K., Semenza, G. L. and Polotsky, V. Y. (2006). "Altered metabolic responses to intermittent hypoxia in mice with partial deficiency of hypoxia-inducible factor-1alpha." Physiol Genomics **25**(3): 450-457.

Li, J., Grigoryev, D. N., Ye, S. Q., Thorne, L., Schwartz, A. R., Smith, P. L., O'Donnell, C. P. and Polotsky, V. Y. (2005a). "Chronic intermittent hypoxia upregulates genes of lipid biosynthesis in obese mice." J Appl Physiol **99**(5): 1643-1648.

Li, J., Savransky, V., Nanayakkara, A., Smith, P. L., O'Donnell, C. P. and Polotsky, V. Y. (2007). "Hyperlipidemia and lipid peroxidation are dependent on the severity of chronic intermittent hypoxia." J Appl Physiol **102**(2): 557-563.

Li, J., Thorne, L. N., Punjabi, N. M., Sun, C. K., Schwartz, A. R., Smith, P. L., Marino, R. L., Rodriguez, A., Hubbard, W. C., O'Donnell, C. P. and Polotsky, V. Y. (2005b). "Intermittent hypoxia induces hyperlipidemia in lean mice." Circ Res **97**(7): 698-706.

Li, R. C., Row, B. W., Gozal, E., Kheirandish, L., Fan, Q., Brittan, K. R., Guo, S. Z., Sachleben, L. R., Jr. and Gozal, D. (2003). "Cyclooxygenase 2 and intermittent hypoxia-induced spatial deficits in the rat." Am J Respir Crit Care Med **168**(4): 469-475.

Li, R. C., Row, B. W., Kheirandish, L., Brittan, K. R., Gozal, E., Guo, S. Z., Sachleben, L. R., Jr. and Gozal, D. (2004). "Nitric oxide synthase and intermittent hypoxia-induced spatial learning deficits in the rat." Neurobiol Dis **17**(1): 44-53.

Li, Y., Chongsuvivatwong, V., Geater, A. and Liu, A. (2008). "Are biomarker levels a good follow-up tool for evaluating obstructive sleep apnea syndrome treatments?" Respiration **76**(3): 317-323.

Libby, P. (2002). "Inflammation in atherosclerosis." Nature **420**(6917): 868-874.

Lin, C. C. and Lin, C. Y. (1995). "Obstructive sleep apnea syndrome and bronchial hyperreactivity." Lung **173**(2): 117-126.

Lin, M., Ai, J., Li, L., Huang, C., Chapleau, M. W., Liu, R., Gozal, D., Wead, W. B., Wurster, R. D. and Cheng, Z. J. (2008). "Structural remodeling of nucleus ambiguus projections to cardiac ganglia following chronic intermittent hypoxia in C57BL/6J mice." J Comp Neurol **509**(1): 103-117.



Lin, M., Liu, R., Gozal, D., Wead, W. B., Chapleau, M. W., Wurster, R. and Cheng, Z. J. (2007). "Chronic intermittent hypoxia impairs baroreflex control of heart rate but enhances heart rate responses to vagal efferent stimulation in anesthetized mice." Am J Physiol Heart Circ Physiol **293**(2): H997-1006.

Lin, M. T., Hessinger, D. A., Pearce, W. J. and Longo, L. D. (2003). "Developmental differences in Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel activity in ovine basilar artery." Am J Physiol Heart Circ Physiol **285**(2): H701-709.

Liu, A., Pichard, L., Schneider, H., Patil, S. P., Smith, P. L., Polotsky, V. and Schwartz, A. R. (2008). "Neuromechanical control of the isolated upper airway of mice." J Appl Physiol **105**(4): 1237-1245.

Loffek, S., Schilling, O. and Franzke, C. W. (2011). "Series "matrix metalloproteinases in lung health and disease": Biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance." Eur Respir J **38**(1): 191-208.

Loneragan, R. P., 3rd, Ware, J. C., Atkinson, R. L., Winter, W. C. and Suratt, P. M. (1998). "Sleep apnea in obese miniature pigs." J Appl Physiol **84**(2): 531-536.

Luc, G., Bard, J. M., Juhan-Vague, I., Ferrieres, J., Evans, A., Amouyel, P., Arveiler, D., Fruchart, J. C. and Ducimetiere, P. (2003). "C-reactive protein, interleukin-6, and fibrinogen as predictors of coronary heart disease: the PRIME Study." Arterioscler Thromb Vasc Biol **23**(7): 1255-1261.

Marin, J. M., Carrizo, S. J., Vicente, E. and Agusti, A. G. (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 **365**(9464): 1046-1053.

Marini, M., Vittori, E., Hollemborg, J. and Mattoli, S. (1992). "Expression of the potent inflammatory cytokines, granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor and interleukin-6 and interleukin-8, in bronchial epithelial cells of patients with asthma." J Allergy Clin Immunol **89**(5): 1001-1009.

Marrone, O., Riccobono, L., Salvaggio, A., Mirabella, A., Bonanno, A. and Bonsignore, M. R. (1993). "Catecholamines and blood pressure in obstructive sleep apnea syndrome." Chest **103**(3): 722-727.

Masa, J. F., Rubio, M. and Findley, L. J. (2000). "Habitually sleepy drivers have a high frequency of automobile crashes associated with respiratory disorders during sleep." Am J Respir Crit Care Med **162**(4 Pt 1): 1407-1412.

McArdle, N., Hillman, D., Beilin, L. and Watts, G. (2007). "Metabolic risk factors for vascular disease in obstructive sleep apnea: a matched controlled study." Am J Respir Crit Care Med **175**(2): 190-195.

McGown, A. D., Makker, H., Elwell, C., Al Rawi, P. G., Valipour, A. and Spiro, S. G. (2003). "Measurement of changes in cytochrome oxidase redox state during obstructive sleep apnea using near-infrared spectroscopy." Sleep **26**(6): 710-716.

Mehra, R., Storer-Isser, A., Kirchner, H. L., Johnson, N., Jenny, N., Tracy, R. P. and Redline, S. (2006). "Soluble interleukin 6 receptor: A novel marker of moderate to severe sleep-related breathing disorder." Arch Intern Med **166**(16): 1725-1731.

Meslier, N., Gagnadoux, F., Giraud, P., Person, C., Ouksel, H., Urban, T. and Racineux, J. L. (2003). "Impaired glucose-insulin metabolism in males with obstructive sleep apnoea syndrome." Eur Respir J **22**(1): 156-160.

Milleron, O., Pilliere, R., Foucher, A., de Roquefeuil, F., Aegerter, P., Jondeau, G., Raffestin, B. G. and Dubourg, O. (2004). "Benefits of obstructive sleep apnoea treatment in coronary artery disease: a long-term follow-up study." Eur Heart J **25**(9): 728-734.

Minoguchi, K., Tazaki, T., Yokoe, T., Minoguchi, H., Watanabe, Y., Yamamoto, M. and Adachi, M. (2004). "Elevated production of tumor necrosis factor-alpha by monocytes in patients with obstructive sleep apnea syndrome." Chest **126**(5): 1473-1479.

Minoguchi, K., Yokoe, T., Tazaki, T., Minoguchi, H., Tanaka, A., Oda, N., Okada, S., Ohta, S., Naito, H. and Adachi, M. (2005). "Increased carotid intima-media thickness and serum inflammatory markers in obstructive sleep apnea." Am J Respir Crit Care Med **172**(5): 625-630.

Moller, D. S., Lind, P., Strunge, B. and Pedersen, E. B. (2003). "Abnormal vasoactive hormones and 24-hour blood pressure in obstructive sleep apnea." Am J Hypertens **16**(4): 274-280.

Mooe, T., Franklin, K. A., Holmstrom, K., Rabben, T. and Wiklund, U. (2001). "Sleep-disordered breathing and coronary artery disease: long-term prognosis." Am J Respir Crit Care Med **164**(10 Pt 1): 1910-1913.

Morrell, M. J., Arabi, Y., Zahn, B. and Badr, M. S. (1998). "Progressive retropalatal narrowing preceding obstructive apnea." Am J Respir Crit Care Med **158**(6): 1974-1981.

Nacher, M., Serrano-Mollar, A., Farre, R., Panes, J., Segui, J. and Montserrat, J. M. (2007). "Recurrent obstructive apneas trigger early systemic inflammation in a rat model of sleep apnea." Respir Physiol Neurobiol **155**(1): 93-96.

Nanduri, J., Yuan, G., Kumar, G. K., Semenza, G. L. and Prabhakar, N. R. (2008). "Transcriptional responses to intermittent hypoxia." Respir Physiol Neurobiol **164**(1-2): 277-281.

Narkiewicz, K., van de Borne, P. J., Montano, N., Dyken, M. E., Phillips, B. G. and Somers, V. K. (1998). "Contribution of tonic chemoreflex activation to sympathetic activity and blood pressure in patients with obstructive sleep apnea." Circulation **97**(10): 943-945.

Narkiewicz, K., van de Borne, P. J., Pesek, C. A., Dyken, M. E., Montano, N. and Somers, V. K. (1999). "Selective potentiation of peripheral chemoreflex sensitivity in obstructive sleep apnea." Circulation **99**(9): 1183-1189.

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. and Pickering, T. G. (2000). "Association of sleep-disordered breathing, sleep apnea, and hypertension in a large community-based study. Sleep Heart Health Study." JAMA **283**(14): 1829-1836.

Nishihara-Fujihara, M., Shoji, S., Maeda, I., Shimoda, T., Nishima, S. and Okamoto, K. (2010). "Involvement of fibronectin and matrix metalloproteinases in airway smooth muscle cell migration for the process of airway remodeling." Allergol Int **59**(3): 267-275.

Ohga, E., Tomita, T., Wada, H., Yamamoto, H., Nagase, T. and Ouchi, Y. (2003). "Effects of obstructive sleep apnea on circulating ICAM-1, IL-8, and MCP-1." J Appl Physiol **94**(1): 179-184.

Olopade, C. O., Christon, J. A., Zakkar, M., Hua, C., Swedler, W. I., Scheff, P. A. and Rubinstein, I. (1997). "Exhaled pentane and nitric oxide levels in patients with obstructive sleep apnea." Chest **111**(6): 1500-1504.

Pae, E. K., Chien, P. and Harper, R. M. (2005). "Intermittent hypoxia damages cerebellar cortex and deep nuclei." Neurosci Lett **375**(2): 123-128.

Pasceri, V., Cheng, J. S., Willerson, J. T. and Yeh, E. T. (2001). "Modulation of C-reactive protein-mediated monocyte chemoattractant protein-1 induction in human endothelial cells by anti-atherosclerosis drugs." Circulation **103**(21): 2531-2534.

Pascual, R. M. and Peters, S. P. (2005). "Airway remodeling contributes to the progressive loss of lung function in asthma: an overview." J Allergy Clin Immunol **116**(3): 477-486; quiz 487.

Paulsen, F. P., Steven, P., Tsokos, M., Jungmann, K., Muller, A., Verse, T. and Pirsig, W. (2002). "Upper airway epithelial structural changes in obstructive sleep-disordered breathing." Am J Respir Crit Care Med **166**(4): 501-509.

Peker, Y., Hedner, J., Kraiczi, H. and Loth, S. (2000). "Respiratory disturbance index: an independent predictor of mortality in coronary artery disease." Am J Respir Crit Care Med **162**(1): 81-86.

Peng, Y. J., Overholt, J. L., Kline, D., Kumar, G. K. and Prabhakar, N. R. (2003). "Induction of sensory long-term facilitation in the carotid body by intermittent hypoxia: implications for recurrent apneas." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(17): 10073-10078.

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**(19): 1378-1384.

Pepperell, J. C., Ramdassingh-Dow, S., Crosthwaite, N., Mullins, R., Jenkinson, C., Stradling, J. R. and Davies, R. J. (2002). "Ambulatory blood pressure after therapeutic and subtherapeutic nasal continuous positive airway pressure for obstructive sleep apnoea: a randomised parallel trial." Lancet **359**(9302): 204-210.

Perry, J. C., D'Almeida, V., Souza, F. G., Schoorlemmer, G. H., Colombari, E. and Tufik, S. (2007). "Consequences of subchronic and chronic exposure to intermittent hypoxia and sleep deprivation on cardiovascular risk factors in rats." Respir Physiol Neurobiol **156**(3): 250-258.

Phillips, B. G., Kato, M., Narkiewicz, K., Choe, I. and Somers, V. K. (2000). "Increases in leptin levels, sympathetic drive, and weight gain in obstructive sleep apnea." Am J Physiol Heart Circ Physiol **279**(1): H234-237.

Phillips, B. G., Narkiewicz, K., Pesek, C. A., Haynes, W. G., Dyken, M. E. and Somers, V. K. (1999). "Effects of obstructive sleep apnea on endothelin-1 and blood pressure." J Hypertens **17**(1): 61-66.

Polotsky, V. Y., Li, J., Punjabi, N. M., Rubin, A. E., Smith, P. L., Schwartz, A. R. and O'Donnell, C. P. (2003). "Intermittent hypoxia increases insulin resistance in genetically obese mice." J Physiol **552**(Pt 1): 253-264.

Polotsky, V. Y., Patil, S. P., Savransky, V., Laffan, A., Fonti, S., Frame, L. A., Steele, K. E., Schweitzer, M. A., Clark, J. M., Torbenson, M. S. and Schwartz, A. R. (2009). "Obstructive sleep apnea, insulin resistance, and steatohepatitis in severe obesity." Am J Respir Crit Care Med **179**(3): 228-234.

Polotsky, V. Y., Rubin, A. E., Balbir, A., Dean, T., Smith, P. L., Schwartz, A. R. and O'Donnell, C. P. (2006). "Intermittent hypoxia causes REM sleep deficits and decreases EEG delta power in NREM sleep in the C57BL/6J mouse." Sleep Med **7**(1): 7-16.

Polotsky, V. Y., Savransky, V., Bevans-Fonti, S., Reinke, C., Li, J., Grigoryev, D. N. and Shimoda, L. A. (2010). "Intermittent and Sustained Hypoxia Induce a Similar Gene Expression Profile in the Human Aortic Endothelial Cells." Physiol Genomics.

Prabhakar, N. R. (2001). "Oxygen sensing during intermittent hypoxia: cellular and molecular mechanisms." J Appl Physiol **90**(5): 1986-1994.

Prabhakar, N. R., Peng, Y. J., Jacono, F. J., Kumar, G. K. and Dick, T. E. (2005). "Cardiovascular alterations by chronic intermittent hypoxia: importance of carotid body chemoreflexes." Clin Exp Pharmacol Physiol **32**(5-6): 447-449.

Pruliere-Escabasse, V., Fanen, P., Dazy, A. C., Lechapt-Zalcman, E., Rideau, D., Edelman, A., Escudier, E. and Coste, A. (2005). "TGF-beta 1 downregulates CFTR expression and function in nasal polyps of non-CF patients." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **288**(1): L77-83.

Punjabi, N. M., Ahmed, M. M., Polotsky, V. Y., Beamer, B. A. and O'Donnell, C. P. (2003). "Sleep-disordered breathing, glucose intolerance, and insulin resistance." Respir Physiol Neurobiol **136**(2-3): 167-178.

Punjabi, N. M. and Beamer, B. A. (2009). "Alterations in Glucose Disposal in Sleep-disordered Breathing." Am J Respir Crit Care Med **179**(3): 235-240.

Punjabi, N. M., Caffo, B. S., Goodwin, J. L., Gottlieb, D. J., Newman, A. B., O'Connor, G. T., Rapoport, D. M., Redline, S., Resnick, H. E., Robbins, J. A., Shahar, E., Unruh, M. L. and Samet, J. M. (2009). "Sleep-disordered breathing and mortality: a prospective cohort study." PLoS Med **6**(8): e1000132.

Punjabi, N. M. and Polotsky, V. Y. (2005). "Disorders of glucose metabolism in sleep apnea." J Appl Physiol **99**(5): 1998-2007.

Punjabi, N. M., Shahar, E., Redline, S., Gottlieb, D. J., Givelber, R. and Resnick, H. E. (2004). "Sleep-disordered breathing, glucose intolerance, and insulin resistance: the Sleep Heart Health Study." Am J Epidemiol **160**(6): 521-530.

Punjabi, N. M., Sorkin, J. D., Katzel, L. I., Goldberg, A. P., Schwartz, A. R. and Smith, P. L. (2002). "Sleep-disordered breathing and insulin resistance in middle-aged and overweight men." Am J Respir Crit Care Med **165**(5): 677-682.

Redline, S., Yenokyan, G., Gottlieb, D. J., Shahar, E., O'Connor, G. T., Resnick, H. E., Diener-West, M., Sanders, M. H., Wolf, P. A., Geraghty, E. M., Ali, T., Lebowitz, M. and Punjabi, N. M. (2010). "Obstructive sleep apnea-hypopnea and incident stroke: the sleep heart health study." Am J Respir Crit Care Med **182**(2): 269-277.

Reichmuth, K. J., Austin, D., Skatrud, J. B. and Young, T. (2005). "Association of sleep apnea and type II diabetes: a population-based study." Am J Respir Crit Care Med **172**(12): 1590-1595.

Remmers, J. E., deGroot, W. J., Sauerland, E. K. and Anch, A. M. (1978). "Pathogenesis of upper airway occlusion during sleep." J Appl Physiol **44**(6): 931-938.

Reuter, S. and Lang, D. (2009). "Life span of monocytes and platelets: importance of interactions." Front Biosci **14**: 2432-2447.

Rey, S., Del Rio, R., Alcayaga, J. and Iturriaga, R. (2004). "Chronic intermittent hypoxia enhances cat chemosensory and ventilatory responses to hypoxia." J Physiol **560**(Pt 2): 577-586.

Rey, S., Del Rio, R. and Iturriaga, R. (2008). "Contribution of endothelin-1 and endothelin A and B receptors to the enhanced carotid body chemosensory responses induced by chronic intermittent hypoxia." Adv Exp Med Biol **605**: 228-232.

Ridker, P. M., Buring, J. E. and Rifai, N. (2001). "Soluble P-selectin and the risk of future cardiovascular events." Circulation **103**(4): 491-495.

Ridker, P. M., Rifai, N., Pfeffer, M., Sacks, F., Lepage, S. and Braunwald, E. (2000). "Elevation of tumor necrosis factor-alpha and increased risk of recurrent coronary events after myocardial infarction." Circulation **101**(18): 2149-2153.

Riha, R. L. (2009). "Genetic aspects of the obstructive sleep apnoea/hypopnoea syndrome--is there a common link with obesity?" Respiration **78**(1): 5-17.

Robinson, G. V., Pepperell, J. C., Segal, H. C., Davies, R. J. and Stradling, J. R. (2004). "Circulating cardiovascular risk factors in obstructive sleep apnoea: data from randomised controlled trials." Thorax **59**(9): 777-782.

Row, B. W. (2007). "Intermittent hypoxia and cognitive function: implications from chronic animal models." Adv Exp Med Biol **618**: 51-67.

Row, B. W., Kheirandish, L., Li, R. C., Guo, S. Z., Brittan, K. R., Hardy, M., Bazan, N. G. and Gozal, D. (2004). "Platelet-activating factor receptor-deficient mice are protected from experimental sleep apnea-induced learning deficits." J Neurochem **89**(1): 189-196.

Ryan, S., Nolan, G. M., Hannigan, E., Cunningham, S., Taylor, C. and McNicholas, W. T. (2007). "Cardiovascular risk markers in obstructive sleep apnoea syndrome and correlation with obesity." Thorax **62**(6): 509-514.

Ryan, S., Taylor, C. T. and McNicholas, W. T. (2005). "Selective activation of inflammatory pathways by intermittent hypoxia in obstructive sleep apnea syndrome." Circulation **112**(17): 2660-2667.

Ryan, S., Taylor, C. T. and McNicholas, W. T. (2006). "Predictors of elevated nuclear factor-kappaB-dependent genes in obstructive sleep apnea syndrome." Am J Respir Crit Care Med **174**(7): 824-830.

Sahin, M., Durand, D. M. and Haxhiu, M. A. (1999). "Chronic recordings of hypoglossal nerve activity in a dog model of upper airway obstruction." J Appl Physiol **87**(6): 2197-2206.

Salerno, F. G., Carpagnano, E., Guido, P., Bonsignore, M. R., Roberti, A., Aliani, M., Vignola, A. M. and Spanevello, A. (2004). "Airway inflammation in patients affected by obstructive sleep apnea syndrome." Respir Med **98**(1): 25-28.

Saunamaki, T. and Jehkonen, M. (2007a). "Depression and anxiety in obstructive sleep apnea syndrome: a review." Acta Neurol Scand **116**(5): 277-288.

Saunamaki, T. and Jehkonen, M. (2007b). "A review of executive functions in obstructive sleep apnea syndrome." Acta Neurol Scand **115**(1): 1-11.

Savransky, V., Bevans, S., Nanayakkara, A., Li, J., Smith, P. L., Torbenson, M. S. and Polotsky, V. Y. (2007a). "Chronic intermittent hypoxia causes hepatitis in a mouse model of diet-induced fatty liver." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **293**(4): G871-877.

Savransky, V., Nanayakkara, A., Li, J., Bevans, S., Smith, P. L., Rodriguez, A. and Polotsky, V. Y. (2007b). "Chronic intermittent hypoxia induces atherosclerosis." Am J Respir Crit Care Med **175**(12): 1290-1297.

Savransky, V., Nanayakkara, A., Vivero, A., Li, J., Bevans, S., Smith, P. L., Torbenson, M. S. and Polotsky, V. Y. (2007c). "Chronic intermittent hypoxia predisposes to liver injury." Hepatology **45**(4): 1007-1013.

Schafer, H., Koehler, U., Ewig, S., Hasper, E., Tasci, S. and Luderitz, B. (1999). "Obstructive sleep apnea as a risk marker in coronary artery disease." Cardiology **92**(2): 79-84.

Schulz, C., Wolf, K., Harth, M., Kratzel, K., Kunz-Schughart, L. and Pfeifer, M. (2003). "Expression and release of interleukin-8 by human bronchial epithelial cells from patients with chronic obstructive pulmonary disease, smokers, and never-smokers." Respiration **70**(3): 254-261.

Schulz, R., Mahmoudi, S., Hattar, K., Sibelius, U., Olschewski, H., Mayer, K., Seeger, W. and Grimminger, F. (2000). "Enhanced release of superoxide from polymorphonuclear neutrophils in obstructive sleep apnea. Impact of continuous positive airway pressure therapy." Am J Respir Crit Care Med **162**(2 Pt 1): 566-570.

Schulz, R., Seeger, W., Fegbeutel, C., Husken, H., Bodeker, R. H., Tillmanns, H. and Grebe, M. (2005). "Changes in extracranial arteries in obstructive sleep apnoea." Eur Respir J **25**(1): 69-74.

Schwab, R. J., Pasirstein, M., Pierson, R., Mackley, A., Hachadoorian, R., Arens, R., Maislin, G. and Pack, A. I. (2003). "Identification of upper airway anatomic risk factors for obstructive sleep apnea with volumetric magnetic resonance imaging." Am J Respir Crit Care Med **168**(5): 522-530.

Schwartz, A. R., Smith, P. L., Wise, R. A., Gold, A. R. and Permutt, S. (1988). "Induction of upper airway occlusion in sleeping individuals with subatmospheric nasal pressure." J Appl Physiol **64**(2): 535-542.

Scortegagna, M., Cataisson, C., Martin, R. J., Hicklin, D. J., Schreiber, R. D., Yuspa, S. H. and Arbeit, J. M. (2008). "HIF-1 $\alpha$  regulates epithelial inflammation by cell autonomous NF $\kappa$ B activation and paracrine stromal remodeling." Blood **111**(7): 3343-3354.

Sekosan, M., Zakkar, M., Wenig, B. L., Olopade, C. O. and Rubinstein, I. (1996). "Inflammation in the uvula mucosa of patients with obstructive sleep apnea." Laryngoscope **106**(8): 1018-1020.

Series, F., Chakir, J. and Boivin, D. (2004). "Influence of weight and sleep apnea status on immunologic and structural features of the uvula." Am J Respir Crit Care Med **170**(10): 1114-1119.

Series, F., Cote, C., Simoneau, J. A., Gelinias, Y., St Pierre, S., Leclerc, J., Ferland, R. and Marc, I. (1995). "Physiologic, metabolic, and muscle fiber type characteristics of musculus uvulae in sleep apnea hypopnea syndrome and in snorers." J Clin Invest **95**(1): 20-25.

Shahar, E., Whitney, C. W., Redline, S., Lee, E. T., Newman, A. B., Javier Nieto, F., O'Connor, G. T., Boland, L. L., Schwartz, J. E. and Samet, J. M. (2001). "Sleep-disordered breathing and cardiovascular disease: cross-sectional results of the Sleep Heart Health Study." Am J Respir Crit Care Med **163**(1): 19-25.

Shamsuzzaman, A. S., Winnicki, M., Lanfranchi, P., Wolk, R., Kara, T., Accurso, V. and Somers, V. K. (2002). "Elevated C-reactive protein in patients with obstructive sleep apnea." Circulation **105**(21): 2462-2464.

Sharma, S. K., Kumpawat, S., Goel, A., Banga, A., Ramakrishnan, L. and Chaturvedi, P. (2007). "Obesity, and not obstructive sleep apnea, is responsible for metabolic abnormalities in a cohort with sleep-disordered breathing." Sleep Med **8**(1): 12-17.

Shimizu, K., Chin, K., Nakamura, T., Masuzaki, H., Ogawa, Y., Hosokawa, R., Niimi, A., Hattori, N., Nohara, R., SAHOSayama, S., Nakao, K., Mishima, M. and Ohi, M. (2002). "Plasma leptin levels and cardiac sympathetic function in patients with obstructive sleep apnoea-hypopnoea syndrome." Thorax **57**(5): 429-434.

Silvestrini, M., Rizzato, B., Placidi, F., Baruffaldi, R., Bianconi, A. and Diomedi, M. (2002). "Carotid artery wall thickness in patients with obstructive sleep apnea syndrome." Stroke **33**(7): 1782-1785.



Skoog, T., Dichtl, W., Boquist, S., Skoglund-Andersson, C., Karpe, F., Tang, R., Bond, M. G., de Faire, U., Nilsson, J., Eriksson, P. and Hamsten, A. (2002). "Plasma tumour necrosis factor-alpha and early carotid atherosclerosis in healthy middle-aged men." Eur Heart J **23**(5): 376-383.

Somers, V. K., Dyken, M. E., Clary, M. P. and Abboud, F. M. (1995). "Sympathetic neural mechanisms in obstructive sleep apnea." J Clin Invest **96**(4): 1897-1904.

Sorajja, D., Gami, A. S., Somers, V. K., Behrenbeck, T. R., Garcia-Touchard, A. and Lopez-Jimenez, F. (2008). "Independent association between obstructive sleep apnea and subclinical coronary artery disease." Chest **133**(4): 927-933.

Steiropoulos, P., Tsara, V., Nena, E., Fiteli, C., Kataropoulou, M., Froudarakis, M., Christaki, P. and Bouros, D. (2007). "Effect of continuous positive airway pressure treatment on serum cardiovascular risk factors in patients with obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome." Chest **132**(3): 843-851.

Sullivan, C. E., Issa, F. G., Berthon-Jones, M. and Eves, L. (1981). "Reversal of obstructive sleep apnoea by continuous positive airway pressure applied through the nares." Lancet **1**(8225): 862-865.

Suzuki, M., Otsuka, K. and Guilleminault, C. (1993). "Long-term nasal continuous positive airway pressure administration can normalize hypertension in obstructive sleep apnea patients." Sleep **16**(6): 545-549.

Tagaito, Y., Polotsky, V. Y., Campen, M. J., Wilson, J. A., Balbir, A., Smith, P. L., Schwartz, A. R. and O'Donnell, C. P. (2001). "A model of sleep-disordered breathing in the C57BL/6J mouse." J Appl Physiol **91**(6): 2758-2766.

Tahawi, Z., Orolinova, N., Joshua, I. G., Bader, M. and Fletcher, E. C. (2001). "Altered vascular reactivity in arterioles of chronic intermittent hypoxic rats." J Appl Physiol **90**(5): 2007-2013; discussion 2000.

Taheri, S., Austin, D., Lin, L., Nieto, F. J., Young, T. and Mignot, E. (2007). "Correlates of serum C-reactive protein (CRP)--no association with sleep duration or sleep disordered breathing." Sleep **30**(8): 991-996.

Takahashi, S., Nakamura, Y., Nishijima, T., Sakurai, S. and Inoue, H. (2005). "Essential roles of angiotensin II in vascular endothelial growth factor expression in sleep apnea syndrome." Respir Med **99**(9): 1125-1131.

Takeda, N., Sumi, Y., Prefontaine, D., Al Abri, J., Al Heialy, N., Al-Ramli, W., Michoud, M. C., Martin, J. G. and Hamid, Q. (2009). "Epithelium-derived chemokines induce airway smooth muscle cell migration." Clin Exp Allergy **39**(7): 1018-1026.

- Tamisier, R., Gilmartin, G. S., Launois, S. H., Pepin, J. L., Nespoulet, H., Thomas, R., Levy, 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 **107**(1): 17-24.
- Tangel, D. J., Mezzanotte, W. S. and White, D. P. (1991). "Influence of sleep on tensor palatini EMG and upper airway resistance in normal men." J Appl Physiol **70**(6): 2574-2581.
- Tanigawa, T., Tachibana, N., Yamagishi, K., Muraki, I., Umesawa, M., Shimamoto, T. and Iso, H. (2004). "Usual alcohol consumption and arterial oxygen desaturation during sleep." JAMA **292**(8): 923-925.
- Tanne, F., Gagnadoux, F., Chazouilleres, O., Fleury, B., Wendum, D., Lasnier, E., Lebeau, B., Poupon, R. and Serfaty, L. (2005). "Chronic liver injury during obstructive sleep apnea." Hepatology **41**(6): 1290-1296.
- Tasali, E., Leproult, R., Ehrmann, D. A. and Van Cauter, E. (2008). "Slow-wave sleep and the risk of type 2 diabetes in humans." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(3): 1044-1049.
- Thannickal, V. J. and Fanburg, B. L. (2000). "Reactive oxygen species in cell signaling." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **279**(6): L1005-1028.
- Turmel, J., Series, F., Boulet, L. P., Poirier, P., Tardif, J. C., Rodes-Cabeau, J., Larose, E. and Bertrand, O. F. (2009). "Relationship between atherosclerosis and the sleep apnea syndrome: an intravascular ultrasound study." Int J Cardiol **132**(2): 203-209.
- Ursavas, A., Karadag, M., Rodoplu, E., Yilmaztepe, A., Oral, H. B. and Gozu, R. O. (2007). "Circulating ICAM-1 and VCAM-1 levels in patients with obstructive sleep apnea syndrome." Respiration **74**(5): 525-532.
- Valipour, A., Litschauer, B., Mittermayer, F., Rauscher, H., Burghuber, O. C. and Wolzt, M. (2004). "Circulating plasma levels of vascular endothelial growth factor in patients with sleep disordered breathing." Respir Med **98**(12): 1180-1186.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M. and Telser, J. (2007). "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease." Int J Biochem Cell Biol **39**(1): 44-84.
- Van Cauter, E., Spiegel, K., Tasali, E. and Leproult, R. (2008). "Metabolic consequences of sleep and sleep loss." Sleep Med **9 Suppl 1**: S23-28.

van Gils, J. M., Zwaginga, J. J. and Hordijk, P. L. (2009). "Molecular and functional interactions among monocytes, platelets, and endothelial cells and their relevance for cardiovascular diseases." J Leukoc Biol **85**(2): 195-204.

van Uden, P., Kenneth, N. S. and Rocha, S. (2008). "Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by NF-kappaB." Biochem J **412**(3): 477-484.

Veasey, S. C., Davis, C. W., Fenik, P., Zhan, G., Hsu, Y. J., Pratico, D. and Gow, A. (2004a). "Long-term intermittent hypoxia in mice: protracted hypersomnolence with oxidative injury to sleep-wake brain regions." Sleep **27**(2): 194-201.

Veasey, S. C., Zhan, G., Fenik, P. and Pratico, D. (2004b). "Long-term intermittent hypoxia: reduced excitatory hypoglossal nerve output." Am J Respir Crit Care Med **170**(6): 665-672.

Vgontzas, A. N., Papanicolaou, D. A., Bixler, E. O., Hopper, K., Lotsikas, A., Lin, H. M., Kales, A. and Chrousos, G. P. (2000). "Sleep apnea and daytime sleepiness and fatigue: relation to visceral obesity, insulin resistance, and hypercytokinemia." J Clin Endocrinol Metab **85**(3): 1151-1158.

Vgontzas, A. N., Papanicolaou, D. A., Bixler, E. O., Kales, A., Tyson, K. and Chrousos, G. P. (1997). "Elevation of plasma cytokines in disorders of excessive daytime sleepiness: role of sleep disturbance and obesity." J Clin Endocrinol Metab **82**(5): 1313-1316.

Vgontzas, A. N., Pejovic, S., Zoumakis, E., Lin, H. M., Bentley, C. M., Bixler, E. O., Sarrigiannidis, A., Basta, M. and Chrousos, G. P. (2007). "Hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in obese men with and without sleep apnea: effects of continuous positive airway pressure therapy." J Clin Endocrinol Metab **92**(11): 4199-4207.

Vgontzas, A. N., Zoumakis, E., Bixler, E. O., Lin, H. M., Collins, B., Basta, M., Pejovic, S. and Chrousos, G. P. (2008). "Selective effects of CPAP on sleep apnoea-associated manifestations." Eur J Clin Invest **38**(8): 585-595.

von Kanel, R. and Dimsdale, J. E. (2003). "Hemostatic alterations in patients with obstructive sleep apnea and the implications for cardiovascular disease." Chest **124**(5): 1956-1967.

Walmsley, S. R., Print, C., Farahi, N., Peyssonnaud, C., Johnson, R. S., Cramer, T., Sobolewski, A., Condliffe, A. M., Cowburn, A. S., Johnson, N. and Chilvers, E. R. (2005). "Hypoxia-induced neutrophil survival is mediated by HIF-1alpha-dependent NF-kappaB activity." J Exp Med **201**(1): 105-115.

Wang, D. and Teichtahl, H. (2007). "Opioids, sleep architecture and sleep-disordered breathing." Sleep Med Rev **11**(1): 35-46.

Watanabe, T., Isono, S., Tanaka, A., Tanzawa, H. and Nishino, T. (2002). "Contribution of body habitus and craniofacial characteristics to segmental closing pressures of the passive pharynx in patients with sleep-disordered breathing." Am J Respir Crit Care Med **165**(2): 260-265.

West, S. D., Nicoll, D. J., Wallace, T. M., Matthews, D. R. and Stradling, J. R. (2007). "Effect of CPAP on insulin resistance and HbA1c in men with obstructive sleep apnoea and type 2 diabetes." Thorax **62**(11): 969-974.

Willerson, J. T. and Ridker, P. M. (2004). "Inflammation as a cardiovascular risk factor." Circulation **109**(21 Suppl 1): I12-10.

Williams, R. O., Paleolog, E. and Feldmann, M. (2007). "Cytokine inhibitors in rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases." Curr Opin Pharmacol **7**(4): 412-417.

Wright, J. and Sheldon, T. (1998). "Sleep apnoea and its impact on public health." Thorax **53**(5): 410-413.

Yamauchi, M., Nakano, H., Maekawa, J., Okamoto, Y., Ohnishi, Y., Suzuki, T. and Kimura, H. (2005). "Oxidative stress in obstructive sleep apnea." Chest **127**(5): 1674-1679.

Yamauchi, M., Tamaki, S., Tomoda, K., Yoshikawa, M., Fukuoka, A., Makinodan, K., Koyama, N., Suzuki, T. and Kimura, H. (2006). "Evidence for activation of nuclear factor kappaB in obstructive sleep apnea." Sleep Breath **10**(4): 189-193.

Yan, B., Soukhova-O'Hare, G. K., Li, L., Lin, Y., Gozal, D., Wead, W. B., Wurster, R. D. and Cheng, Z. J. (2008). "Attenuation of heart rate control and neural degeneration in nucleus ambiguus following chronic intermittent hypoxia in young adult Fischer 344 rats." Neuroscience **153**(3): 709-720.

Yokoe, T., Alonso, L. C., Romano, L. C., Rosa, T. C., O'Doherty, R. M., Garcia-Ocana, A., Minoguchi, K. and O'Donnell, C. P. (2008). "Intermittent hypoxia reverses the diurnal glucose rhythm and causes pancreatic beta-cell replication in mice." J Physiol **586**(3): 899-911.

Yokoe, T., Minoguchi, K., Matsuo, H., Oda, N., Minoguchi, H., Yoshino, G., Hirano, T. and Adachi, M. (2003). "Elevated levels of C-reactive protein and interleukin-6 in patients with obstructive sleep apnea syndrome are decreased by nasal continuous positive airway pressure." Circulation **107**(8): 1129-1134.

Young, T., Blustein, J., Finn, L. and Palta, M. (1997). "Sleep-disordered breathing and motor vehicle accidents in a population-based sample of employed adults." Sleep **20**(8): 608-613.

Young, T., Palta, M., Dempsey, J., Skatrud, J., Weber, S. and Badr, S. (1993). "The occurrence of sleep-disordered breathing among middle-aged adults." N Engl J Med **328**(17): 1230-1235.

Young, T., Shahar, E., Nieto, F. J., Redline, S., Newman, A. B., Gottlieb, D. J., Walsleben, J. A., Finn, L., Enright, P. and Samet, J. M. (2002). "Predictors of sleep-disordered breathing in community-dwelling adults: the Sleep Heart Health Study." Arch Intern Med **162**(8): 893-900.

Yuan, G., Nanduri, J., Bhasker, C. R., Semenza, G. L. and Prabhakar, N. R. (2005). "Ca<sup>2+</sup>/calmodulin kinase-dependent activation of hypoxia inducible factor 1 transcriptional activity in cells subjected to intermittent hypoxia." J Biol Chem **280**(6): 4321-4328.

Zamarron-Sanz, C., Ricoy-Galbaldon, J., Gude-Sampedro, F. and Riveiro-Riveiro, A. (2006). "Plasma levels of vascular endothelial markers in obstructive sleep apnea." Arch Med Res **37**(4): 552-555.

Zerah-Lancner, F., Lofaso, F., Coste, A., Ricolfi, F., Goldenberg, F. and Harf, A. (1997). "Pulmonary function in obese snorers with or without sleep apnea syndrome." Am J Respir Crit Care Med **156**(2 Pt 1): 522-527.

Zerah\_Lancner, F., Lofaso, F., d\_Ortho, M. P., Delclaux, C., Goldenberg, F., Coste, A., Housset, B. and Harf, A. (2000). "Predictive value of pulmonary function parameters for sleep apnea syndrome." American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine **162**(6): 2208-2212.

Zhan, G., Serrano, F., Fenik, P., Hsu, R., Kong, L., Pratico, D., Klann, E. and Veasey, S. C. (2005). "NADPH oxidase mediates hypersomnolence and brain oxidative injury in a murine model of sleep apnea." Am J Respir Crit Care Med **172**(7): 921-929.

Zhang, H., Park, Y., Wu, J., Chen, X., Lee, S., Yang, J., Dellsperger, K. C. and Zhang, C. (2009). "Role of TNF-alpha in vascular dysfunction." Clin Sci (Lond) **116**(3): 219-230.

Zhu, Y., Fenik, P., Zhan, G., Mazza, E., Kelz, M., Aston-Jones, G. and Veasey, S. C. (2007). "Selective loss of catecholaminergic wake active neurons in a murine sleep apnea model." J Neurosci **27**(37): 10060-10071.

Zoccal, D. B., Bonagamba, L. G., Oliveira, F. R., Antunes-Rodrigues, J. and Machado, B. H. (2007). "Increased sympathetic activity in rats submitted to chronic intermittent hypoxia." Exp Physiol **92**(1): 79-85.

Zoccal, D. B., Simms, A. E., Bonagamba, L. G., Braga, V. A., Pickering, A. E., Paton, J. F. and Machado, B. H. (2008). "Increased sympathetic outflow in juvenile rats submitted to chronic intermittent hypoxia correlates with enhanced expiratory activity." J Physiol **586**(13): 3253-3265.

## Listes des Communications et Publications

### Publications :

#### 2011 :

POUPARD L, C PHILIPPE, MD GOLDMAN, R SARTHENE, M MATHIEU . Novel mathematical processing method of nocturnal oximetry for screening patients with suspected sleep apnea syndrome. Sleep Breath. 2011 Apr 15

#### 2010 :

DAUVILLIERS Y, I ARNULF, MP d'ORTHO, A COSTE, P DUCLUZEAU, Y GRILLET, G JONDEAU, R KESSLER, L MONCELY, P PHILIP, C PHILIPPE, E WEITZENBLUM, JL PEPIN. Which pretherapeutic evaluation of a newly diagnosed patient with obstructive apnea syndrome ? Rev Mal Respir 2010;27 Suppl 3:S124-36.

#### 2008 :

UGON A, C PHILIPPE, S PIETRASZ, JG GANASCIA, PP LEVY. OPTISAHOS a new method to analyse patients with Sleep Apnea Syndrome.Stud Health Technol Inform. 2008;136:547-52.

NGUYEN XL, D RAKOTONANAHARY, J CHASKALOVIC, C PHILIPPE, C HAUSSER-HAUW, B LEBEAU, B FLEURY. Sleep Med. 2008;9(5):511-6. Residual subjective daytime sleepiness under CPAP treatment in initially somnolent apnea patients: a pilot study using data mining methods. Sleep Med 2008;9:511-6.

#### 2006 :

PHILIPPE C, M STOICA-HERMAN, X DROUOT, B RAFFESTIN, P ESCOURROU, L HTTINGER, PL MICHEL, S ROUAULT, MP d'ORTHO. Compliance with and effectiveness of adaptative servo-ventilation versus continuous positive airway pressure in the treatment of Cheyne-Stokes respiration in heart failure over a six month period. Heart (2006) 92 : 337-342.

**2004 :**

WISLEZ M, C. PHILIPPE, M. ANTOINE, N. RABBE, J. MOREAU, A. BELLOCQ, C. MAYAUD, B. MILLERON, P. SOLER, J. CADRANEL. Upregulation of bronchioloalveolar carcinoma-derived C-X-C chemokines by tumor infiltrating inflammatory cells. *Inflamm. Res.* (2004) 53 (1) : 4-12.

**2002 :**

GAGNADOUX F, N. PELLETIER-FLEURY, C. PHILIPPE, D. RAKOTONANAHARY , B. FLEURY. Home Unattended vs Hospital Telemonitored Polysomnography in Suspected Obstructive Sleep Apnea Syndrome : A Randomized Crossover Trial. *Chest.* 2002 Mar;121(3):753-8.

**2001 :**

PELLETIER-FLEURY N., F. GAGNADOUX, C. PHILIPPE , D. RAKOTONANAHARY, JL. LANOE, B. FLEURY. A cost-minimization study of telemedicine. The case of telemonitored polysomnography to diagnose obstructive sleep apnea syndrome. *Int J Technol Assess Health Care.* 2001 Fall;17(4):604-11.

**1999 :**

BELLOCQ, A., E. AZOULAY, S. MARULLO, A. FLAHAULT, B. FOUQUERAY, C. PHILIPPE, J. CADRANEL, L. BAUD (1999) Reactive oxygen and nitrogen intermediates increase transforming growth factor- $\beta$ 1 release from human epithelial alveolar cells through two different mechanisms. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 21 : 128-136.

PELLETIER-FLEURY, N., JL. LANOE, C. PHILIPPE, F. GAGNADOUX, D. RAKOTONANAHARY, B. FLEURY (1999). Economic studies and technical evaluation of telemedecine : the case of telemonitored polysomnography. *Health Policy*, 1999, 49 : 179-194.

**1998**

BELLOCQ, A., M. ANTOINE, A. FLAHAUT, C. PHILIPPE, B. CRESTANI, J.-F. BERNAUDIN, C. MAYAUD, B. MILLERON, L. BAUD, J. CADRANEL (1998) Neutrophil alveolitis in

bronchioalveolar carcinoma. Induction by tumor-derived interleukin-8 and relation to clinical outcome. Am. J. Pathol. 152 : 83-92.

BELLOCQ, A, S. SUBERVILLE, C. PHILIPPE, F. BERTRAND, J. PEREZ, B. FOUQUERAY, G. CHERQUI, L. BAUD (1998) Low environmental pH is responsible for the induction of nitric-oxide synthase in macrophages. J Biol. Chem. 273 : 5086-5092.

**1997 :**

LE BOUC Y., A. BELLOCQ, C. PHILIPPE, L. PERIN, M. GARABEDIAN, B. FOUQUERAY, C. ZACHARIAS, J. CADRANEL, L. BAUD (1997) Insulin-like growth factors and their binding proteins in pleural fluid. Eur. J. Endocrinol. 137 : 467-473.

GENDREAU V, F MONTRAVERS, C. PHILIPPE, JN TALBOT (1997) Reevaluation of the usefulness of systematic bone scanning in initial staging and follow-up of small cell lung carcinoma, taking into account the serum levels of neuron-specific enolase. Int J Biol Markers. 12(4) : 148-53.

**1996 :**

SUBERVILLE, S., A. BELLOCQ, B. FOUQUERAY, C. PHILIPPE, O. LANTZ, J. PEREZ, L. BAUD (1996) Regulation of interleukin-10 production by  $\beta$ -adrenergic agonists. Eur. J. Immunol. 1996 ; 26 : 2601-2605.

BRUGIERE O., B. MILLERON, M. ANTOINE, MF. CARETTE, C. PHILIPPE, C. MAYAUD. Diffuse panbronchiolitis in an Asian immigrant. Thorax 1996, 51 ; 1065-67.

**1995 :**

FOUQUERAY B, BOUTARD V, PHILIPPE C, KORNREICH A, MARCHAT A, PEREZ J, GOLDMAN M, BAUD L : Mesangial cell-derived interleukin-10 modulates mesangial cell response to lipopolysaccharide. Am. J Pathol. 1995, 147 : 176-182.



BOUTARD V, HAVOUIS R, FOUQUERAY B, PHILIPPE C, MOULINOX J-P, BAUD L : Transforming growth factor-b stimulates arginase activity in macrophages. J. Immunol. 1995, 155 : 2077-2084.

BERTRAND F, PHILIPPE C, ANTOINE PJ, BAUD L, GROYER A, CAPEAU J, CHERQUI G : Insulin activates nuclear factor kB in mammalian cells through a Raf-1-mediated pathway. J. Biol. Chem. 1995, 270 : 24435-24441.

**1994 :**

BOUTARD V, FOUQUERAY B, PHILIPPE C, PEREZ J, BAUD L : Fish oil supplementation and essential fatty acid deficiency reduce nitric oxide synthesis by rat macrophages. Kidney Int. 1994, 46 : 1280-1286.

**1993 :**

FOUQUERAY B, PHILIPPE C, HERBELIN A, PEREZ J, ARDAILLOU R, BAUD L : Cytokine formation within rat glomeruli during experimental endotoxemia. J. Am. Soc. Nephrol. 1993, 3 : 1783-1791.

PHILIPPE C, ROUX-LOMBARD P, FOUQUERAY B, PEREZ J, DAYER JM, BAUD L : Membrane expression and shedding of tumour necrosis factor receptors during activation of human blood monocytes : regulation by desferrioxamine. Immunology. 1993, 80 : 300-305.

CADRANEL J, PHILIPPE C, PHILIPPE B, MILLERON B, FOUQUERAY B, MAYAUD C, BAUD L : Increased expression and occupancy of receptors for tumour necrosis factor on blood monocytes from tuberculosis patients. Clin. Exp. Immunol. 1993, 94 : 51-56.

PHILIPPE C, PHILIPPE B, FOUQUERAY B, PEREZ J, LEBRET M, BAUD L : Protection from tumor necrosis factor-mediated cytolysis by platelets. Am. J. Pathol, 1993, 143 : 1713-1723.

**1992 :**

PHILIPPE C, FOUQUERAY B, PEREZ J, BAUD L : Upregulation of tumour necrosis factor-alpha receptors on monocytes by desferrioxamine. Clin. Exp. Immunol. 1992, 87 : 499-503.

FOUQUERAY B, PHILIPPE C, AMRANI A, PEREZ J, BAUD L : Heat shock prevents lipopolysaccharide-induced tumour necrosis factor a synthesis by rat mononuclear phagocytes. Eur. J. Immunol. 1992, 22 : 2983-2987.

**1990 :**

CADRANEL J, PHILIPPE C, PEREZ J, MILLERON B, AKOUN G, ARDAILLOU R, BAUD L : In vitro production of tumour necrosis factor and prostaglandin E2 by peripheral blood mononuclear cells from tuberculosis patients. Clin. Exp. Immunol. 1990, 81 : 319-324.

**Communications concernant les travaux récents :**

- *Response of Respiratory Epithelial Cells to Chronic Intermittent Hypoxia*

**Septembre 2010 :** XXème European Respiratory Society Congress, Barcelona, poster.

- *Réponse des cellules épithéliales respiratoires à l'Hypoxie Intermittente*

**Novembre 2010 :** XXVème Congrès de la Société Française de Recherche et Médecine du Sommeil : communication orale.

**Mars 2011 :** - Journée des Sciences de la Vie , IMRB, Ecole doctorale : Sciences de la vie et de la santé : poster.

- VIème congrès de Physiologie et de Pharmacologie et de Thérapeutique : poster.