

Aspects généraux : L'apnée du sommeil (AS) induit des variations constantes d'oxygénation artérielle (hypoxie intermittente – IH) qui affectent environ 5 à 7 % de la population¹. Ceci produit un stress oxydatif (production d'espèces réactives de l'oxygène - ROS) et augmente les risques cardiovasculaires (hypertension, infarctus)²⁻⁷ et neurologiques (perte de mémoire, anxiété et somnolence diurne)⁸⁻¹². Les études épidémiologiques démontrent que la prévalence d'AS est inférieure chez les femmes que chez les hommes, mais après la ménopause la prévalence augmente pour atteindre le même niveau que chez les hommes¹³⁻¹⁵. L'œstradiol (E₂) est un puissant agent antioxydant, mais son rôle éventuel dans le traitement ou la prévention de l'AS n'est pas exploité. Toutefois, l'œstradiol (associé ou non à la progestérone) permet de réduire l'AS chez les femmes ménopausées^{16,17}. Les ROS peuvent être produits par les mitochondries, la NADPH oxydase et/ou la Xanthine oxydase^{3,18}. La mitochondrie est le plus gros producteur de ROS (90% de l'oxygène consommé) et son dysfonctionnement est très préjudiciable^{19,20}. Une seule étude en 2010, a évalué la dysfonction mitochondriale en IH, montrant un ralentissement de la chaîne respiratoire mitochondriale (CRM) et une surproduction de ROS dans le cerveau de souris²¹. L'œstradiol est une cible de la mitochondrie et son récepteur bêta (βER) est localisé dans la mitochondrie²². L'E₂ à travers βER est capable de se fixer au génome mitochondrial et de moduler le fonctionnement de la mitochondrie, en accélérant la CRM, la production d'ATP et par conséquent la diminution de ROS ce qui conduirait à des effets cardio- et neuro-protecteurs²³.

Nous avons donc émis l'hypothèse que l'œstradiol et βER pourraient réduire les effets néfastes de l'IH, en agissant sur la production de radicaux libres, la fonction mitochondriale et la balance mitophagie/biogenèse mitochondriale. Les premières expériences ont été réalisées à Québec chez des rates ayant subi une ablation des ovaires (OVX) et supplémentées avec E₂ (0.5 mg/kg/jour) ou véhicule (pompe osmotique)²⁴, puis exposés en IH (21%-10% O₂ 80 cycles/jours – 7 jours) ou en air ambiant (AIR). L'IH induit une hypertension artérielle (évaluée de manière non invasive), une augmentation de la fréquence des apnées enregistrées au cours du sommeil, et une importante irrégularité du rythme respiratoire (évaluée par plethysmographie à corps entier – cf ref¹⁶ pour technique). Le traitement à l'E₂ prévient l'ensemble de ces dysfonctions (**figure 1**). Nous avons récupéré du plasma afin d'évaluer le taux de catécholamines circulants, témoin de l'activité sympathique pouvant expliquer l'hypertension artérielle²⁵⁻²⁸. Afin de montrer que βER modifie les effets de l'IH, nous avons exposé des souris βERKO en hypoxie intermittente. Nos données préliminaires montrent une hypertension chez les souris βERKO et la littérature indique que ces animaux produisent plus de ROS que leurs contrôles, suggérant qu'il pourrait s'agir d'un excellent modèle de dysfonction mitochondriale²⁹.

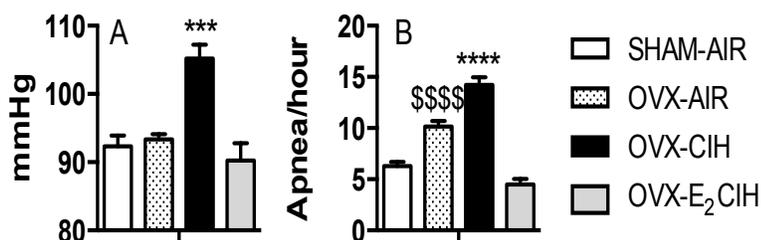


Figure 1. Effet de l'IH sur (A) la pression artérielle moyenne (PAM) et (B) la fréquence des apnées. La PAM et la fréquence des apnées augmentent chez les animaux exposés en IH (OVX-CIH) comparés aux animaux laissés en normoxie (OVX-AIR et SHAM-AIR). Le traitement à l'E₂ permet de prévenir ces dysfonctions (OVX-E₂ CIH). n=8 pour chaque groupe. *** <0,001 vs OVX-AIR et \$\$\$\$ <0,0001 vs SHAM-AIR. Les SHAM-AIR servent de contrôle pour OVX-AIR.

Nous répondrons à 5 questions spécifiques pour comprendre les mécanismes expliquant ces effets:

1. Est-ce que βER réduit les dommages oxydatifs (lipide, protéine, ADN) induits par l'IH?
2. Est-ce que βER augmente l'activité des enzymes antioxydantes?
3. Est-ce que βER module l'activité du complexe IV de la CRM, de la citrate synthase et de l'aconitase en IH?
4. Est-ce que βER module le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale?
5. Est-ce que βER module la balance mitophagie/ biogenèse mitochondriale en IH?

Ce travail sera réalisé avec la collaboration d'un laboratoire français (Damien Roussel - UMR 5023 CNRS/U. Claude Bernard Lyon 1), avec lequel cette thèse est effectuée en cotutelle. De plus, une partie de ce projet (mitophagie/biogenèse mitochondriale) sera réalisé dans le laboratoire de D. Gozal (U. Chicago). Nous utiliserons les modèles animaux des rates OVX et des souris βERKO en IH dans ces expériences.

Pour les questions 1 et 2 (automne 2015-hiver 2016): le tronc cérébral, cortex cérébral, hippocampe et glandes surrénales ont été récupérés chez les rates utilisées pour les données d'hypertension. Nous estimerons les dommages oxydatifs des lipides par la méthode des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS

Sofien Laouafa : Projet de recherche

assay³⁰). Les dommages protéiques seront évalués en mesurant la quantité de protéines carbonylées (fluorimètre), les dommages nucléiques en mesurant le niveau de guanine oxydée (essai enzymatique)³⁰ et l'activité des enzymes antioxydantes par des essais colorimétriques (disponibles dans l'équipe du Dr Roussel). Ceci nous permettra de vérifier les effets antioxydants de l'E₂ et de βER dans notre modèle d'IH.

Pour la question 3 (hiver 2016) nous utiliserons des mitochondries fraîchement isolées du tronc cérébral et du cortex³¹ pour la mesure d'activité du complexe IV de la CRM - étape limitante de la production d'ATP et de la consommation d'O₂. L'activité des enzymes du cycle de Krebs sensible aux ROS (aconitase – citrate synthase) seront mesurée³².

Pour la question 4 (Hiver et automne 2016) nous utiliserons un respiromètre de très haute résolution (Oxygraphie avec Oroboros[®]). Cet appareil appartenant à l'équipe du Dr Roussel va être délocalisé de Lyon pour pouvoir être utilisé lors des expériences en IH à Québec. Nous serons en mesure d'étudier sur mitochondries isolées du cerveau la consommation d'oxygène (dans différents états respiratoires), la production d'ATP, le potentiel de membrane (Ψ_m) et la production de ROS (H₂O₂) cf ref³³.

Pour la question 5 (2017-2018), les expériences seront réalisées à Chicago dans le laboratoire du Dr D.Gozal, qui a montré une augmentation de la mitophagie en IH aboutissant à la progression tumorale³⁴. Ce processus est fortement dépendant du dysfonctionnement mitochondrial (que nous aurons évalué – cf points 3-4). Le déséquilibre mitophagie/biogenèse mitochondriale est impliqué dans de nombreuses pathologies (cancer, diabète), et semblerait contribuer aux troubles cardio-respiratoires. Il a été montré récemment que l'E₂ stimule la biogenèse mitochondriale^{35,36} ce qui pourrait contrebalancer la mitophagie en IH. Nous utiliserons des marqueurs tissulaires de mitophagie et de biogenèse mitochondriale (coupes histologiques, extraits tissulaires, ratio de l'ADN mitochondrial à l'ADN nucléaire, expression des protéines TFAM, NRF-1 et PGC-1α - marqueurs de la biogenèse mitochondriale).

Contribution à l'avancement des connaissances : Les données obtenues permettront de mieux comprendre les effets protecteurs de l'E₂ et de son récepteur β dans le développement de l'hypertension chez des animaux exposés en IH, l'un des principaux modèles d'apnée du sommeil. À terme, ceci pourrait permettre de proposer de nouvelles approches thérapeutiques pour les femmes souffrant d'apnées du sommeil. Ces études permettront en outre de démontrer l'importance de cibler des populations particulières (ici de sexe féminin) dans les études expérimentales, un prérequis important pour réaliser les promesses de la « médecine personnalisée ». Au vu de la très faible représentation de femmes dans les études cliniques d'apnée du sommeil³⁷, ceci est un enjeu très important.