



HAL
open science

Obésité, risque athérogène et effet thérapeutique direct de l'exercice physique : étude sur la contribution des voies signalétiques Akt/eNOS et NADPH oxydase pour expliquer les mécanismes vasculo-protecteurs de l'exercice physique chez le rat rendu obèse par une alimentation enrichie en graisse

Sabeur Touati

► **To cite this version:**

Sabeur Touati. Obésité, risque athérogène et effet thérapeutique direct de l'exercice physique : étude sur la contribution des voies signalétiques Akt/eNOS et NADPH oxydase pour expliquer les mécanismes vasculo-protecteurs de l'exercice physique chez le rat rendu obèse par une alimentation enrichie en graisse. Médecine humaine et pathologie. Université d'Avignon, 2010. Français. NNT : 2010AVIG0704 . tel-00583936

HAL Id: tel-00583936

<https://theses.hal.science/tel-00583936v1>

Submitted on 7 Apr 2011

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.

ACADEMIE D'AIX-MARSEILLE
UNIVERSITE D'AVIGNON ET DES PAYS DE VAUCLUSE

THESE

Présentée à l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR

SPECIALITE :

Sciences du Mouvement Humain

Obésité, Risque Athérogène et Effet Thérapeutique Direct de l'Exercice Physique :
Etude sur la contribution des voies signalétiques Akt/eNOS et NADPH oxydase pour
expliquer les mécanismes vasculo-protecteurs de l'exercice physique chez le rat rendu
obèse par une alimentation enrichie en graisse

Par

Sabeur TOUATI

Soutenue le 24 novembre 2010 devant le jury composé de :

M. LAURANT Pascal, Professeur, Université d'Avignon, France	Directeur de thèse
Mme TOUYZ Rhian, Docteur, Université d'Ottawa, Canada	Co-directrice
M. BERTHELOT Alain, Professeur, Université de Franche-Comté, France	Rapporteur
M. TABKA Zouhair, Professeur, Université de Sousse, Tunisie	Rapporteur
M. JOVER Bernard, Docteur, Université de Montpellier, France	Examineur
M. OBERT Philippe, Professeur, Université d'Avignon, France	Examineur

RÉSUMÉ

La prévalence de l'obésité est en constante augmentation dans les pays occidentaux, en raison d'une sédentarisation accompagnée d'une alimentation malsaine. L'obésité est souvent associée à une dysfonction endothéliale et à un risque athérogène élevé. Plusieurs observations cliniques ont montré que la modification du mode de vie, incluant la pratique régulière d'une activité physique et l'adoption d'un mode alimentaire sain, représente une stratégie efficace pour combattre l'obésité et ses complications cardiovasculaires. Cependant, de nombreux mécanismes précisant les effets thérapeutiques directs de l'exercice physique sur le risque athérogène lié à l'obésité sont encore largement inconnus. Le but principal de ce travail a donc été d'identifier, en utilisant un modèle de rat rendu obèse par un régime enrichi en graisse, les mécanismes athéro-protecteurs de l'exercice physique seul et/ou associé à une modification du régime alimentaire (du régime riche en graisse au régime standard). Nos résultats montrent que l'exercice physique, indépendamment de la diète utilisée, corrige la dysfonction endothéliale installée au cours de l'obésité. Cet effet bénéfique a été associé à une diminution du stress oxydatif au niveau vasculaire. En effet, nos résultats indiquent que l'exercice diminue l'activité de la NADPH oxydase au niveau aortique. De plus, nous montrons pour la première fois que l'exercice physique seul, indépendamment de la diète utilisée, est capable de moduler la translocation de la sous-unité de la NADPH oxydase p47^{phox} (principal acteur dans l'activation de ce complexe enzymatique) vers la membrane. Nos résultats indiquent également que l'exercice physique, avec ou sans modification du régime, améliore la voie Akt/eNOS phosphorylée, suggérant une augmentation de la production du NO. Ainsi, l'exercice physique, même sans l'associer à un changement du mode alimentaire, peut être considéré comme une stratégie non-pharmacologique efficace pour le traitement du risque athérogène généré par l'obésité.

Mots clés : Obésité, Thérapeutique, Exercice, NADPH oxydase, Akt/eNOS phosphorylée

ABSTRACT

The prevalence of obesity is increasing at an alarming rate in the western countries. It has been attributed to sedentariness and abundance of unhealthy food. Obesity is often associated with endothelial dysfunction and a high atherogenic risk. Several clinical investigations have reported that life style modification included physical exercise and the adoption of healthy diet was an efficient strategy to combat cardiovascular complications linked to obesity. However, numerous mechanisms by which exercise exerts the direct therapeutic effect on atherogenic risk linked to obesity are still unknown. Using the experimental model of high fat diet-induced obesity rat, the general aim of this study, was to identify the possible molecular mechanisms through which exercise with or without diet modification (high fat to standard diet) exerts an antiatherogenic action. Our results show that exercise independently of diet used, corrected the endothelial dysfunction induced by obesity. This benefit effect was associated with the decreased vascular oxidative stress. In effect, our results show that exercise alone was able to decrease NADPH oxidase activity in aortic tissue. Furthermore, we show for the first time that exercise, independently diet used, was able to modulate the translocation of p47^{phox} subunit to membrane (which plays a pivotal role in NADPH oxidase activation). Ours results show also, that exercise with or without diet modification improves the Akt/eNOS phosphorylation pathway, suggesting that exercise increases NO production. In summary, exercise training even without diet modification, may be a non-pharmacological strategy treatment for atherogenic risk linked to obesity.

Key words: Obesity, Therapeutic, Exercise, NADPH oxidase, Akt/eNOS phosphorylation

REMERCIEMENTS

Un travail de thèse est le fruit d'un travail collectif. Je tiens à remercier ici toutes les personnes m'ayant aidé de près ou de loin tout au long de mon parcours.

J'aimerais en tout premier lieu adresser ma plus sincère gratitude à mon directeur de thèse, Monsieur le Professeur Pascal LAURANT, un homme de science passionné, dévoué et perspicace qui a à cœur la formation et la réussite de ses disciples. Mille mercis *CHEF* pour votre soutien, vos conseils, votre enseignement et votre confiance inébranlable.

À ma co-directrice de thèse, Madame le Docteur Rhian TOUYZ. Merci de m'avoir offert l'opportunité et le privilège de travailler à vos côtés au sein du *Kidney Research Center*.

J'exprime ma profonde gratitude et mes plus vifs remerciements à Monsieur le Professeur Alain BERTHELOT et à Monsieur le Professeur Zouhair TABKA qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'être rapporteurs de ce travail.

Je tiens également à remercier Monsieur le Docteur Bernard JOVER et Monsieur le Professeur Philippe OBERT qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'être examinateurs de ce travail et de participer à ce jury.

À tous mes anciens collègues de l'équipe EA4267 « Sciences Séparatives Biologiques et Pharmaceutiques », Céline, Isabelle, Maude, Sonia, Sylvie. Un grand Merci

Aux membres de l'équipe EA4278 « Physiologie et physiopathologie des Adaptations cardiovasculaires et à l'Exercice », Agnès, Amina, Charlotte, Cyril, Grégory D, Grégory M, Guillaume, Sandrine, Sandrine Gi, Stéphane N, Stéphane T. Merci pour votre accueil, votre collaboration et votre amitié.

Aux membres de toute l'équipe pédagogique du Département STAPS, Ghnhem, Jean-Pierre, Marie et Pascale. Merci pour votre soutien et votre amitié.

Merci à tous ceux qui ont cru, croient et croiront toujours en moi : ma mère Souad, mon père Mehrez, mes sœurs Dora et Haïfa. Leur soutien indéfectible, leur appui à mes projets m'incitent à continuer et à réaliser tous mes rêves.

À toute ma famille en France et en Tunisie. Je pense particulièrement à mes cousins Aymen et Rafi.

À tous mes amis de Tunisaire-club et de l'équipe nationale Tunisienne de karaté avec une mention spéciale à : Bouchiba, Dali, Ftouh, Kaiss, Karim, Mounir, Mourad. Je n'ai jamais oublié tous les bons moments que l'on a passés ensemble.

À tous mes amis que j'ai connu ces dernières années : Aymen, Amin, Damien, Fayçal, Heni, Maxime, Taïb, et Wassim. Merci pour l'amitié sincère que vous m'avez toujours témoigné.

Et enfin à ma compagne, LISE pour ton soutien, ton courage et surtout ta patience durant ces trois dernières années.

Cette thèse est aussi la vôtre. Et elle est terminée ! Mais, la Recherche, elle, continue...

Tables des matières

INTRODUCTION	12
REVUE DE LA LITTERATURE	16
CHAPITE I : OBÉSITÉ ET RISQUES CARDIOVASCULAIRES.....	17
1. Les facteurs de risque cardiovasculaire de l'obésité avec ou sans syndrome métabolique	17
1.1 <i>Masse grasse/Obésité abdominale</i>	18
1.2 <i>L'hypertension artérielle</i>	20
1.3 <i>Les dyslipidémies</i>	20
1.4 <i>Le Diabète de type 2 et la résistance à l'insuline</i>	21
2. La dysfonction endothéliale	24
2.1 <i>Généralités</i>	24
2.2 <i>Evaluation de la fonction endothéliale</i>	27
2.3 <i>Mécanismes biologiques impliqués dans la dysfonction endothéliale</i>	30
3. Le stress oxydatif	31
3.1 <i>Définition</i>	31
3.2 <i>Les radicaux libres</i>	32
3.3 <i>Mécanismes de production des dérivés de l'oxygène</i>	33
3.4 <i>Mécanismes de défense contre des dérivés de l'oxygène</i>	35
3.5 <i>Stress oxydatif et facteurs de risque cardiovasculaire : observations cliniques et expérimentales</i>	36
4. L'inflammation.....	39

4.1	<i>Contribution du tissu adipeux à l'état inflammatoire.....</i>	39
4.2	<i>Inflammation vasculaire et risque athérogène</i>	41
	CHAPITRE II : STYLE DE VIE MODERNE ET RISQUE CARDIOVASCULAIRE	46
1.	Rôle de la sédentarité	47
2.	Rôle du régime alimentaire occidental hypercalorique.....	49
	CHAPITRE III : L'EXERCICE PHYSIQUE ET LA DIÈTE COMME STRATÉGIES THÉRAPEUTIQUES CONTRE LES MALADIES CARDIOVASCULAIRES ASSOCIÉES À L'OBÉSITÉ	52
1.	Effet de l'exercice physique sur la mortalité et les facteurs de risque cardiovasculaire : Observations cliniques et expérimentales.....	53
1.1	<i>Effet bénéfique sur la mortalité cardiovasculaire</i>	53
1.2	<i>Effets bénéfiques sur les facteurs de risque cardiovasculaire</i>	54
1.3	<i>Effets bénéfiques sur la fonction/dysfonction endothéliale</i>	55
2.	Effet des régimes alimentaires sur les facteurs de risque cardiovasculaire : Observations cliniques et expérimentales	58
2.1	<i>Régimes alimentaires et facteurs de risque cardiovasculaire</i>	59
2.2	<i>Prise en charge nutritionnelle et dysfonction endothéliale</i>	61
	OBJECTIFS EXPERIMENTAUX.....	64
1.	Les objectifs généraux.....	65
2.	Description de notre modèle expérimental.....	66
	TRAVAUX EXPERIMENTAUX.....	68
	PREMIÈRE PARTIE : IMPACT DE L'EXERCICE PHYSIQUE SUR LES FACTEURS DE RISQUE CARDIOVASCULAIRE LIÉS AU SYNDROME MÉTABOLIQUE CHEZ LE RAT RENDU OBÈSE PAR UN RÉGIME ENRICHI EN GRAISSES	69

1. But de l'étude	69
2. Méthode.....	70
2.1 Animaux	70
2.2 Le protocole d'exercice	70
2.3 Le régime alimentaire.....	70
2.4 Les étapes de l'investigation.....	70
3. Résultats principaux	71
3.1 L'exercice physique seul.....	71
3.2 Modification du régime alimentaire seul.....	72
3.3 Association Exercice + changement de la diète.....	72
4. Discussion et conclusion	101

DEUXIÈME PARTIE : L'EXERCICE CORRIGE LA DYSFONCTION

ENDOTHELIALE ET INHIBE L'ACTIVATION DE LA NADPH OXYDASE CHEZ LE RAT RENDU OBÈSE PAR UN RÉGIME HYPERLIPIDIQUE.....	104
--	-----

1. But de l'étude	104
2. Méthode.....	105
2.1 Animaux	105
2.2 Le protocole d'exercice	105
2.3 Le régime alimentaire.....	105
2.4 Les étapes de l'investigation.....	105
3. Résultats principaux	106
3.1 L'exercice physique seul.....	106

3.2	<i>Modification du régime alimentaire seul.....</i>	106
3.3	<i>Association Exercice + changement de la diète</i>	107
4.	Discussion et conclusion	140
	DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION	142
	BIBLIOGRAPHIE	151
	ANNEXES	170

GLOSSAIRE

Ag II: angiotensine II

ARNm: acide ribonucléique messenger

AVC : accidents vasculaires cérébraux

BH4: tétrahydrobioptérine

BK: bradykinine

Ca²⁺: calcium

CRP : protéine C-Réactive (*C-reactive protein*)

EDHF : facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (*Endothelial derived hyperpolarizing factor*)

ET-1: endothéline-1

FAD : flavine adénine dinucléotide

FMN : flavine mononucléotide

GLUT4 : transporteur membranaire du glucose-4

GMPc : guanosine monophosphate cyclique

HDL : lipoprotéine de haute densité (*High Density Lipoprotein*)

HOMA-IR: *Homeostasis model assessment of insulin resistance*

ICAM-1: molécule d'adhésion intracellulaire-1 (*Intercellular adhesion molecule-1*)

IL-6: interleukine-6

IMC : Indice de masse corporelle

IP-3: Inositol triphosphate

IR : Récepteur de l'insuline (*Insulin receptor*)

IRS-1: substrat du récepteur de l'insuline-1 (*Insulin receptor substrate-1*)

JNK: *c-Jun-N-terminal kinase*

L-NAME: *N-nitro-L-arginine methyl ester*

LDL : lipoprotéine de basse densité (*Low Density Lipoprotein*)

MAP kinases: protéine-kinase activée par les mitogènes (*Mitogen-activated protein kinase*)

NADPH: nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NO: monoxyde d'azote (*nitric oxide*)

NOS: NO synthase (*nitric oxide synthase*)

Nox: NADPH oxydase

oxLDL : LDL oxydés

PAI-1: Inhibiteur de l'activateur du plasminogène-1 (*Plasminogen activator inhibitor-1*)

PDK: phosphatidylinositol-dependent kinase (*phosphoinositide-dependent protein kinase*)

PGI₂: prostacycline

PI-3 kinase: phosphatidyl-inositol -3- Kinase (*phosphatidylinositol 3-kinase*)

PKB/ Akt: Protéine kinase B

PKC: protéine Kinase C

PKG: protéine Kinase G

ROS: Espèce réactive de l'oxygène (*Reactive oxygen species*)

sGC: Guanylate cyclase soluble

Shear stress: forces de cisaillement

SNP : nitroprussiate de sodium

SOD: superoxyde dismutase

TBARS: *thiobarbituric acid reactive substances*

TNF- α : facteur de nécrose tumorale (*Tumor necrosis factor- α*)

tPA: activateur tissulaire du plasminogène (*Tissue plasminogen activator*)

TXA₂: thromboxane A₂

VCAM-1: molécule d'adhésion vasculaire-1 (*Vascular cell adhesion molecule*)

VEGF : facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (*Vascular endothelial growth factor*)



INTRODUCTION

L'obésité est devenue la première maladie « inflammatoire » non infectieuse de l'histoire de l'humanité. C'est une véritable épidémie, qui frappe aussi bien les pays industrialisés que les pays en voie de développement. Selon les dernières estimations de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 1,6 milliards d'adultes de plus de 15 ans seraient en surpoids, et 400 millions seraient obèses (OMS, 2005). Il est prévu que, d'ici 2015, ces nombres passeront respectivement à 2,3 milliards et 700 millions. La France n'échappe pas à ce fléau : selon la dernière enquête épidémiologique ObEpi Roche (2009), on estime que 31,9% des français de plus de 18 ans sont en surpoids, et 14,5% sont obèses. Sur une période de 12 ans (entre 1997 et 2009), le poids moyen des français adultes a augmenté d'environ 3,1 kg (ObEpi Roche 2009). La prise en charge de l'obésité par les systèmes d'assurances maladies représente un coût financier très important. En plus des conséquences sociales et psychologiques qu'engendre cette pathologie, elle représente aussi un risque majeur de développement des maladies cardiovasculaires.

Les 20 dernières années ont été marquées par l'apparition d'un concept nouveau appelé syndrome métabolique. Cette condition est caractérisée par un ensemble de facteurs de risque de développer une maladie cardiovasculaire et/ou un diabète de type 2, incluant l'obésité abdominale, les dyslipidémies athérogènes, l'hypertension artérielle et l'insulinorésistance. D'autres anomalies peuvent également être présentes, notamment un état pro-inflammatoire ou encore un état pro-thrombotique, une dysfonction endothéliale, une microalbuminurie, une stéatose hépatique ou un stress oxydatif élevé (Alberti et coll., 2005 ; Grundy et coll., 2005). Associé à un risque accru de diabète et de maladies cardiovasculaires, le syndrome métabolique est désormais considéré comme l'un des plus importants problèmes de santé publique de notre époque. Bien que multifactorielle, les causes les plus souvent évoquées pour expliquer l'émergence de l'obésité/syndrome métabolique sont une prédisposition

génétique associée à un mode de vie « inadapté », où les erreurs alimentaires occupent une place majeure, et où l'inactivité physique s'inscrit dans nos habitudes journalières.

Ainsi, les pouvoirs publics placent aujourd'hui l'amélioration des habitudes de vie au cœur des stratégies préventives, qu'il s'agisse de la prise en charge de l'obésité et/ou du syndrome métabolique. Toutefois, les habitudes alimentaires dépendent de plusieurs facteurs comme la culture, les traditions ou encore le niveau socio-économique et intellectuel des individus. L'enquête épidémiologique ObEpi Roche (2009) a constaté qu'il y a une différence au niveau de la prévalence de l'obésité selon la profession. Par exemple, de 1997 à 2009, la prévalence de l'obésité a augmentée de 82% dans le milieu ouvrier, contre 37,9% chez les cadres (ObEpi Roche 2009). Ceci reflète un constat nouveau: l'alimentation saine devient de plus en plus chère, et le changement des habitudes alimentaires, surtout dans les milieux défavorisés, demeure difficile à atteindre à long terme. Cependant, la stratégie visant à combattre l'obésité et ses complications par l'exercice physique demeure moins onéreuse, et plus appropriée. En effet, il a été démontré que l'exercice physique régulier est une stratégie efficace dans la prévention des facteurs de risque cardiovasculaire liés à l'obésité et au syndrome métabolique, en plus d'améliorer la qualité de vie des patients (Gill et Malkova, 2006).

D'autre part, dans la majorité des études cliniques portées à notre connaissance, les programmes de réentraînement et de réhabilitation chez les sujets obèses avec des risques cardiovasculaires sont souvent associés à des mesures hygiéno-diététiques (restriction calorique, modification de la diète, arrêt du tabac,...), et/ou à des traitements pharmacologiques (hypoglycémiant, hypocholestérolémiant, anti-hypertenseurs) (Roberts et coll., 2006 ; Tjønnha et coll., 2008). Ainsi, il est désormais difficile de distinguer la contribution thérapeutique directe de l'exercice seul. De plus, les mécanismes cellulaires et moléculaires, par lesquels l'activité physique exerce un effet bénéfique, commencent à peine à être identifiés.

C'est pourquoi dans la présente thèse, l'objectif général est, dans un premier temps, de distinguer la contribution thérapeutique exacte de l'exercice seul, de la diète seule ou de l'association des deux sur les risques cardiovasculaires générés par l'obésité, elle-même induite par un mode de vie « inadapté » (Sédentarité et régime hyperlipidique). Dans un deuxième temps, nous identifions les mécanismes moléculaires par lesquels l'exercice physique et/ou le changement de la diète exercent un rôle thérapeutique contre le risque cardiovasculaire. Nous supposons que la diminution du stress oxydatif pourrait expliquer en grande partie l'effet thérapeutique de l'exercice et/ou la modification de la diète.



REVUE DE LA LITTÉRATURE

CHAPITE I : OBÉSITÉ ET RISQUES CARDIOVASCULAIRES

1. Les facteurs de risque cardiovasculaire de l'obésité avec ou sans syndrome métabolique

L'obésité, notamment intra-abdominale ou viscérale, a un effet délétère sur plusieurs voies métaboliques, menant ainsi au développement de plusieurs pathologies comme certains types de cancers, certaines anomalies respiratoires, neurologiques et orthopédiques, mais plus particulièrement sur l'incidence des maladies cardiovasculaires et du diabète de type 2. En effet, l'obésité, surtout quant elle est intra-abdominale, représente un facteur de risque majeur dans l'apparition du syndrome métabolique. Selon le *National Cholesterol Education Program* américain (NCEP-ATPIII, 2001), le syndrome métabolique se définit par la présence de 3 ou plus des facteurs de risque suivant : Tour de taille >102 cm chez l'homme, >88 cm chez la femme ; Pression artérielle $\geq 130/85$ mmHg ; Triglycérides $\geq 1,50$ g/L; HDL cholestérol <0,40 g/L chez l'homme, <0,50 g/L chez la femme ; Glycémie à jeun $\geq 1,10$ g/L (Alberti et Coll., 2006). Plusieurs études ont montré que le syndrome métabolique est associé à un risque 1.5 à 3 fois plus élevé de développer une maladie cardiovasculaire (Alexander et coll., 2003 ; Dekker et coll., 2005 ; Isomaa et coll., 2001). Quant au risque de développer le diabète de type 2, certaines études ont montré un risque jusqu'à 5 fois plus élevé en présence d'un syndrome métabolique (Hanson et coll., 2002 ; Schmidt et coll., 2005). L'objectif de cette section vise à réviser les connaissances actuelles concernant les facteurs de risque cardiovasculaire associés à l'obésité. Les principaux travaux présentés dans cette section reposent sur l'hypothèse que la distribution du tissu adipeux joue un rôle majeur dans le développement des maladies cardiovasculaires et métaboliques.

1.1 Masse grasse/Obésité abdominale

D'un point de vue médical, l'obésité se définit comme un excès de masse grasse entraînant des inconvénients pour la santé somatique, psychologique et sociale. En pratique clinique courante, l'estimation de la masse grasse est basée sur des mesures anthropométriques telles que le poids, la taille, les plis cutanés et les circonférences (ANAES, 2003). Chez l'adulte, l'OMS définit l'obésité en fonction de l'Indice de Masse Corporelle (IMC). Celui-ci est calculé par la formule suivante : $IMC (kg/m^2) = Poids (kg) / Taille^2 (m^2)$. Depuis 1998, le critère international d'embonpoint correspond à un IMC supérieur ou égal à $25 kg/m^2$, et celui de l'obésité est supérieur ou égal à $30 kg/m^2$. Quant à l'obésité morbide, elle est caractérisée par un IMC supérieur ou égal à $40 kg/m^2$ (NHLBI, 1998). L'obésité représente un facteur de risque important pour les maladies cardiovasculaires. Par exemple, les sujets obèses ont un risque 2 à 3 fois plus élevé qu'un sujet sain de développer une maladie coronarienne (Aldhahi et coll., 2003). Il est d'autant plus élevé lorsque l'individu obèse cumule un ou plusieurs autres facteurs de risque comme le diabète de type 2. Dans ces conditions, l'éventualité de développer une maladie coronarienne est 3 à 4 fois supérieure par rapport à une personne obèse non diabétique (Aldhahi et coll., 2003). De plus, il existe une relation positive entre l'IMC et le risque de mortalité (figure 1).

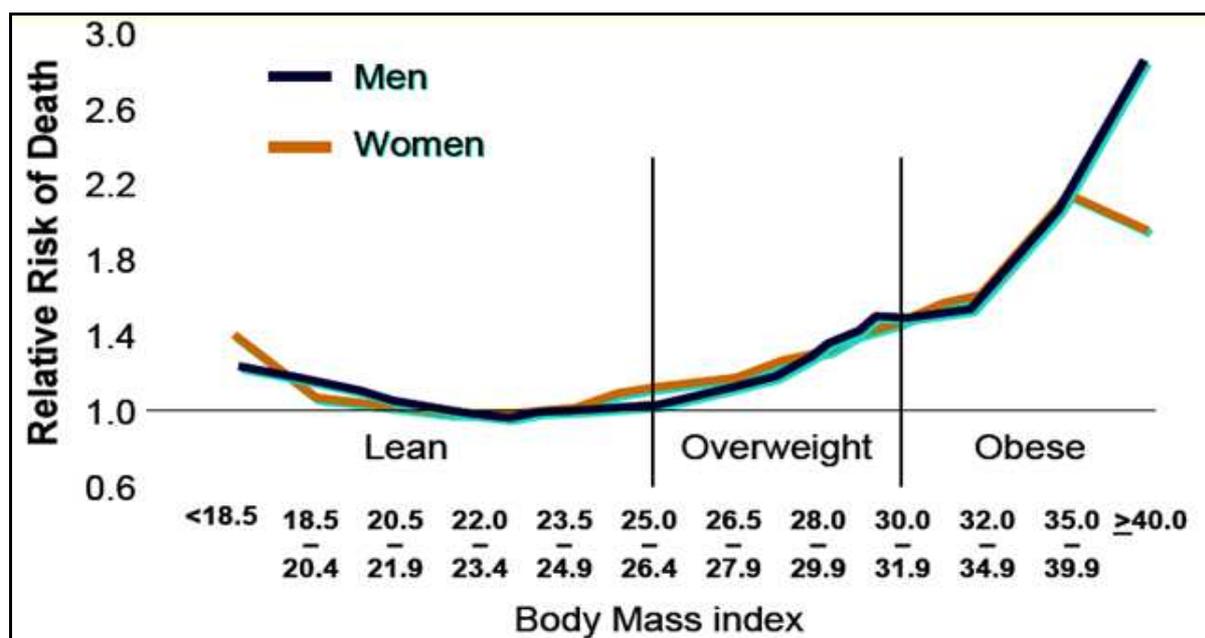


Figure 1 : Relation entre l'indice de masse corporelle (IMC en kg/m^2) et le risque relatif de mortalité (d'après Calle et Coll., 1999).

Bien que l'IMC soit un bon outil pour le dépistage de l'obésité, cet indice ne donne cependant aucune information sur la composition corporelle (les proportions de masse grasse et de masse maigre), ni sur la distribution du tissu adipeux, qui peuvent toutes les deux être très variables selon les individus. Il est maintenant admis qu'indépendamment de l'IMC, l'excès de tissu adipeux au niveau de la cavité abdominale (obésité de type androïde) est beaucoup plus néfaste pour la santé qu'au niveau des cuisses et des hanches (obésité de type gynoïde). L'obésité androïde serait la forme la plus néfaste pour la prévalence du syndrome métabolique (Despres, 2006). Dans cette optique, Yusuf et coll., (2003) ont démontré qu'à l'intérieur de chaque catégorie d'IMC, une augmentation du rapport taille/hanches (indice pour estimer l'accumulation du tissu adipeux au niveau abdominal) est associée à une augmentation subséquente du risque d'infarctus du myocarde. De plus, il a été observé que les sujets obèses ayant une faible quantité de tissu adipeux viscéral ont une tolérance au glucose similaire à ceux de poids normal (Pouliot et coll., 1992). Récemment, l'étude transversale

International Day for the Evaluation of Abdominal Obesity (IDEA) a démontré aussi l'importance de la circonférence de la taille en tant que variable associée au risque de maladies cardiovasculaires et de diabète de type 2 (Balkau et coll., 2007). Ces résultats montrent qu'en plus d'une augmentation de la masse grasse, la distribution du tissu adipeux est un élément important dans la physiopathologie cardiovasculaire liée à l'obésité.

1.2 L'hypertension artérielle

L'hypertension artérielle constitue un facteur de risque majeur pour de nombreuses maladies cardiovasculaires. Il existe une relation étroite entre les niveaux élevés de tissu adipeux viscéral et l'hypertension artérielle, comparativement aux niveaux de tissu adipeux sous-cutané. À ce sujet, Kanai et coll., (1990) ont démontré chez des femmes obèses qu'un rapport tissu adipeux viscéral/tissu adipeux sous-cutané élevé était associé à une pression artérielle élevée, et ce, indépendamment de l'âge et de l'indice de masse corporelle. Plus récemment, les travaux de Hayashi et coll., (2003) ont également montré qu'une accumulation importante de tissu adipeux viscéral était associée à une augmentation de la prévalence de l'hypertension. D'autres études ont également rapporté une élévation de la pression artérielle dans le modèle animal d'obésité (obésité induite par un régime riche en lipide) (Dobrian et coll., 2001; Yoshioka et coll., 2000).

1.3 Les dyslipidémies

La dyslipidémie athérogène constitue, avec l'hypertension et la résistance à l'insuline, un des principaux maillons reliant l'obésité et le syndrome métabolique à l'augmentation du risque de maladies cardiovasculaires (Alberti et coll., 2005). L'obésité augmente le risque de

maladies cardiovasculaires en modifiant négativement le profil lipidique (Ginsberg et coll., 2009). Plusieurs anomalies du profil des lipides et des lipoprotéines ont été retrouvées chez les individus obèses. En effet, l'obésité viscérale est associée à une augmentation significative des taux de triglycérides, à des niveaux abaissés d'HDL ainsi qu'à une augmentation de l'apolipoprotéine B, ce qui se caractérise par un nombre plus élevé de particules LDL petites et denses (Grundy, 2006 ; Reaven, 2005; Ruotolo et Howard, 2002), elles-mêmes associées au développement de la plaque athéromateuse (puisque ces particules possèdent des propriétés hautement athérogènes) et ultimement aux complications cardiovasculaires (Zambon et coll., 1999). En effet, les particules LDL petites et denses demeurent plus longtemps dans la circulation, s'infiltrant plus facilement dans la membrane de la paroi endothéliale, adhèrent aux molécules d'adhésion, sont plus susceptibles à l'oxydation et se lient davantage aux récepteurs « *scavengers* » des macrophages. Ces propriétés ont donc pour conséquence de contribuer à la formation et à l'instabilité de la plaque athéromateuse (Zambon et coll., 1999). D'autre part, il a été rapporté que l'hyperlipidémie postprandiale retrouvée chez les sujets obèses pourrait aussi contribuer au développement prématuré de l'athérosclérose (Nordestgaard et coll., 2007). Il est à noter que la perte de poids est associée à une amélioration du profil lipidique, conduisant à une réduction du risque de maladies cardiovasculaires (Selwyn et coll., 2007).

1.4 Le Diabète de type 2 et la résistance à l'insuline

Un excès pondéral est présent chez plus de 80 % des individus atteints de diabète de type 2 (Mokdad et coll., 2000). Le risque de développer ce type de diabète augmente considérablement en fonction des différentes catégories d'obésité. À ce sujet, Field et coll., (2001) ont rapporté que les sujets obèses (IMC > 35 kg/m²) avaient un risque de développer

un diabète de type 2 vingt fois supérieur à celui des individus normo-pondérés (IMC entre 18,5 et 25 kg/m²). De plus, la durée de l'obésité, indépendamment des autres facteurs de risque, est également un important prédicateur de la maladie (Sakurai, 2000). D'autre part, il a été rapporté que les maladies cardiovasculaires seraient les principales causes de mortalité et de morbidité chez les sujets diabétiques de type 2. À ce sujet, Haffner et coll., (1998) ont observé que l'incidence d'un premier infarctus du myocarde ou de mort subite était de 20% chez les sujets diabétiques de type 2, comparativement à 3,5 % chez les sujets non diabétiques. La résistance à l'insuline est reconnue actuellement comme étant le lien entre l'obésité et le diabète de type 2 (Fève et coll., 2006). L'expression "résistance à l'insuline" est surtout utilisée pour désigner une réduction de l'efficacité gluco-régulatrice de l'hormone (Wheatcroft et coll., 2003). Elle se manifeste par une diminution de l'assimilation du glucose par les muscles et le tissu adipeux, et par une incapacité de l'insuline à inhiber la néoglucogénèse au niveau du foie, entraînant ainsi une hyperglycémie.

La stimulation du récepteur de l'insuline est à l'origine de l'activation de deux grandes voies de signalisation : la voie des MAP kinases et la voie de la PI-3 kinase, qui conduisent de manière respective aux effets mitogéniques et métaboliques de l'hormone (Capeau, 2005). Dans la présente thèse, nous nous sommes intéressés principalement à la description de la voie de la PI-3 kinase. Au niveau des cellules cibles (principalement musculaires et adipeuses), la liaison de l'insuline à son récepteur membranaire entraîne l'activation de ce dernier via un processus d'autophosphorylation des résidus tyrosine de la sous-unité β du récepteur. Il s'ensuit alors plusieurs étapes de phosphorylation, lesquelles ont pour effet d'activer de manière successive différents substrats et enzymes impliqués dans la voie de signalisation. Ainsi, en tout premier lieu, la phosphorylation du substrat intracellulaire IRS-1 induit à son tour l'activation de la PI3-kinase, qui elle, entraîne l'activation de la sérine kinase PDK-1/2, puis l'activation de l'Akt/PKB et des PKC- ζ/λ . Ces dernières kinases conduiront à

la translocation vers la membrane cellulaire des transporteurs de glucose GLUT4, qui réaliseront l'étape ultime: la captation du glucose (Montagnani et Coll., 2001).

Il semble que des altérations signalétiques, en aval du récepteur de l'insuline, soient à l'origine de la résistance à l'insuline dans l'étiologie de l'obésité (Zeyda et coll., 2009). La phosphorylation d'un ou plusieurs des sites Ser/Thr de IRS-1 auraient plusieurs conséquences. Plusieurs agents/facteurs causant la résistance à l'insuline ont été identifiés comme le TNF- α , les acides gras libres et l'insuline elle-même (Zick Y, 2001). D'une façon générale, ces phosphorylations sont associées à une inhibition des fonctions de IRS-1, en entraînant : 1) une diminution de la phosphorylation de IRS-1 sur les résidus tyrosine, 2) une diminution de la liaison de la PI 3-kinase à IRS-1, 3) une inhibition de l'activité tyrosine kinase du récepteur de l'insuline et/ou 5) une dégradation de IRS-1 par les protéasomes (Zick Y, 2001). Nous reviendrons ultérieurement sur la description plus détaillée du rôle de la cytokine TNF- α dans le développement de la résistance à l'insuline au cours de l'obésité (*voir la section Contribution du tissu adipeux à l'état inflammatoire*).

D'autre part, des études centrées sur la perte de la masse adipeuse ont confirmées l'étroite relation entre l'obésité abdominale et la résistance à l'insuline. À ce sujet, Coker et coll., (2009) ont observé, chez des sujets obèses soumis à une restriction calorique ou à l'exercice physique, une amélioration considérable de la sensibilité systémique à l'insuline chez ceux ayant réduit leur quantité de tissu adipeux viscéral. L'ensemble de ces observations témoigne de l'implication du tissu adipeux viscéral dans la sensibilité à l'insuline.

Ainsi, l'accumulation du tissu adipeux, et plus particulièrement au niveau viscéral, participe au développement des complications cliniques du syndrome métabolique incluant l'hypertension artérielle, les dyslipidémies et la résistance à l'insuline, ces derniers représentant des facteurs de risque majeurs dans le développement des maladies

cardiovasculaires. D'autres facteurs de risque additionnels ont également été observés chez des patients présentant une obésité intra-abdominale. Parmi ceux-ci, on retrouve la dysfonction endothéliale.

2. La dysfonction endothéliale

La dysfonction endothéliale est principalement caractérisée par une réduction de la biodisponibilité du NO, et survient souvent de façon précoce dans le développement de plusieurs pathologies cardiovasculaires (Raij et coll., 2006; Taddei et coll., 2003).

2.1 Généralités

L'ensemble des vaisseaux sanguins de l'organisme sont tapissés d'une seule couche de cellules endothéliales, qui forment l'endothélium vasculaire. Ce dernier constitue une couche semi-perméable entre les éléments circulant du sang et la paroi des vaisseaux sanguins. Il sécrète aussi des substances vasoactives (vasoconstrictrices et vasodilatatrices) qui permettent de maintenir un tonus vasculaire approprié. En condition physiologique normale, il existe un équilibre entre ces facteurs vasoactifs pour maintenir le tonus vasculaire. Parmi les substances vasoconstrictrices relâchées par l'endothélium, nous retrouvons l'endothéline-1 (ET-1), l'angiotensine II (l'Ang II), le thromboxane A₂ (TXA₂) et les radicaux libres oxygénés (ROS). Les substances vasodilatatrices sont représentées par le monoxyde d'azote (NO), la prostacycline (PGI₂), le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF) et la bradykinine (BK). Parmi les substances citées ci-dessus, le NO représente la principale substance protectrice synthétisée par l'endothélium (Wheatcroft et coll., 2003). En effet, au niveau de la cellule endothéliale, le NO inhibe la production d'ET-1, l'oxydation des LDL,

l'expression de molécules d'adhésion et par conséquent, l'adhésion des leucocytes (Vanhoutte, 2003). À l'extérieur de la cellule, il favorise la relaxation des fibres musculaires lisses des vaisseaux, inhibe l'agrégation plaquettaire, empêche la prolifération des cellules musculaires lisses et exerce une action anti-inflammatoire et anti-oxydante (Boulanger, 1999 ; Kurowska, 2002; Shaul, 2002; Vanhoutte, 2003).

Le NO est un gaz liposoluble synthétisé par les NOS. En présence de NADPH, d'oxygène, de BH₄, de FAD et de FMN, les NOS catalysent dans une première étape l'oxydation de la L-arginine en N^o-hydroxy-L-arginine. Dans une deuxième étape, la N^o-hydroxy-L-arginine est transformée en L-citrulline et NO. Dans la paroi vasculaire, le NO diffuse de l'endothélium vers la cellule musculaire lisse en traversant librement les membranes cellulaires. Dans celles-ci, le NO se lie à la sGC qui produit alors de grandes quantités de GMPc. La GMPc active la PKG qui, à son tour, entraîne une diminution de la concentration intracellulaire en calcium, induisant la vasorelaxation.

Comme nous l'avons mentionné précédemment, le NO est produit par la famille des NOS. Cette dernière comprend trois membres : la NOS neuronale (nNOS), la NOS inductible (iNOS) et la NOS endothéliale (eNOS). Parmi eux, c'est la eNOS qui représente le principal isoforme impliqué dans le maintien des fonctions vasculaires. L'activité de l'enzyme eNOS peut être régulée par différents facteurs, notamment par des changements de la concentration intracellulaire de Ca²⁺, ce qui affecte sa liaison avec la calmoduline (Domenico, 2004 ; Walford et Loscalzo, 2003). En effet, il a été démontré que certains agonistes, comme l'acétylcholine et la bradykinine, pouvaient stimuler la eNOS en augmentant les concentrations de calcium cytosolique (figure 2). La liaison de ces substances vasodilatatrices à leur récepteur a pour effet d'induire une augmentation de la production d'IP-3. En retour, cela entraîne une augmentation de la libération du Ca²⁺, ainsi qu'une augmentation de sa liaison à la calmoduline. Le complexe ainsi formé peut se fixer à la protéine eNOS et ainsi

augmenter son activité. D'autre part, la protéine eNOS peut aussi être activée par une autre voie indépendante au Ca^{2+} (figure 2). À cet égard, il a été rapporté que l'insuline pouvait agir au niveau de l'endothélium vasculaire, et induire la production de NO par un mécanisme indépendant du calcium (Vincent et coll., 2003 ; Montagnani et coll., 2001).

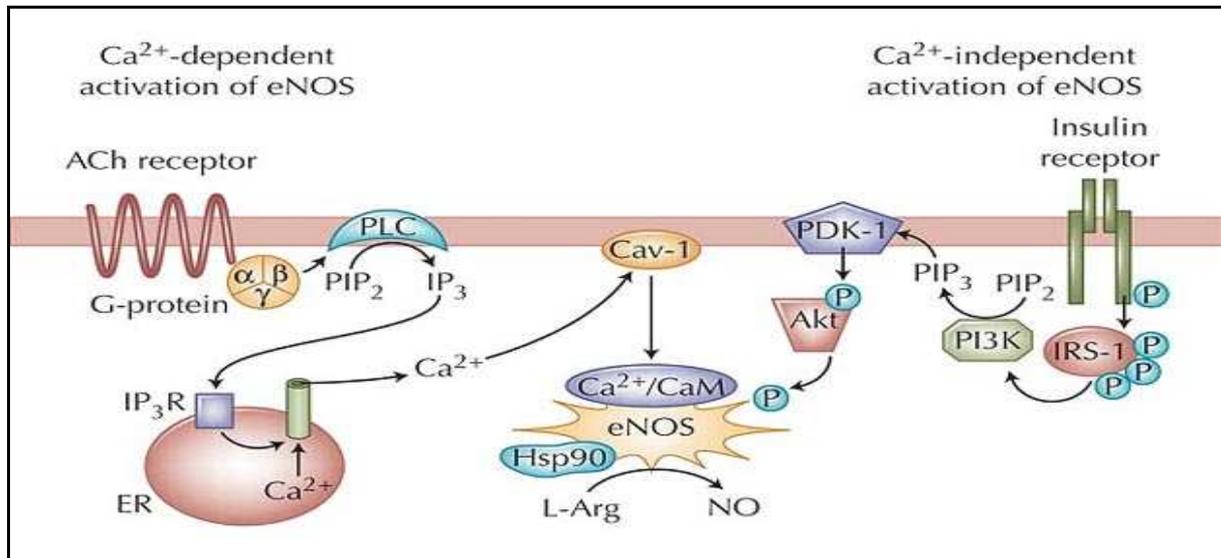


Figure 2. Voie d'activation d'eNOS dépendante ou indépendante du calcium (d'après Vincent et coll., 2003)

L'activation de la eNOS peut également se faire par des stimuli mécaniques, comme les forces de cisaillement (Shear stress) qu'exerce le déplacement du sang sur la surface des cellules endothéliales. Ces forces orientées longitudinalement varient avec le débit sanguin local et les conditions d'écoulement. Les contraintes de cisaillement stimulent des récepteurs membranaires sensibles à l'étirement de la cellule. Ces mécanosenseurs ainsi activés déclenchent des cascades complexes d'événements biochimiques, qui conduisent à des changements fonctionnels dans la cellule comme par exemple une activation de la transcription du gène codant pour la eNOS. L'induction de l'ARNm de la eNOS est d'autant plus importante que les forces de cisaillement sont importantes. Les forces de cisaillement activent la eNOS par un mécanisme calcium-indépendant qui nécessite la phosphorylation de

la eNOS (Corson et coll., 1996) (figure 3). Cette modification post-traductionnelle survient sur le résidu sérine 1177 de la eNOS et est médiée par la phosphorylation de l'Akt sur le résidu sérine 473 (Lehoux et coll., 2004). Il est à noter que ce mécanisme occupe une place cruciale dans la régulation de la eNOS par l'exercice physique.

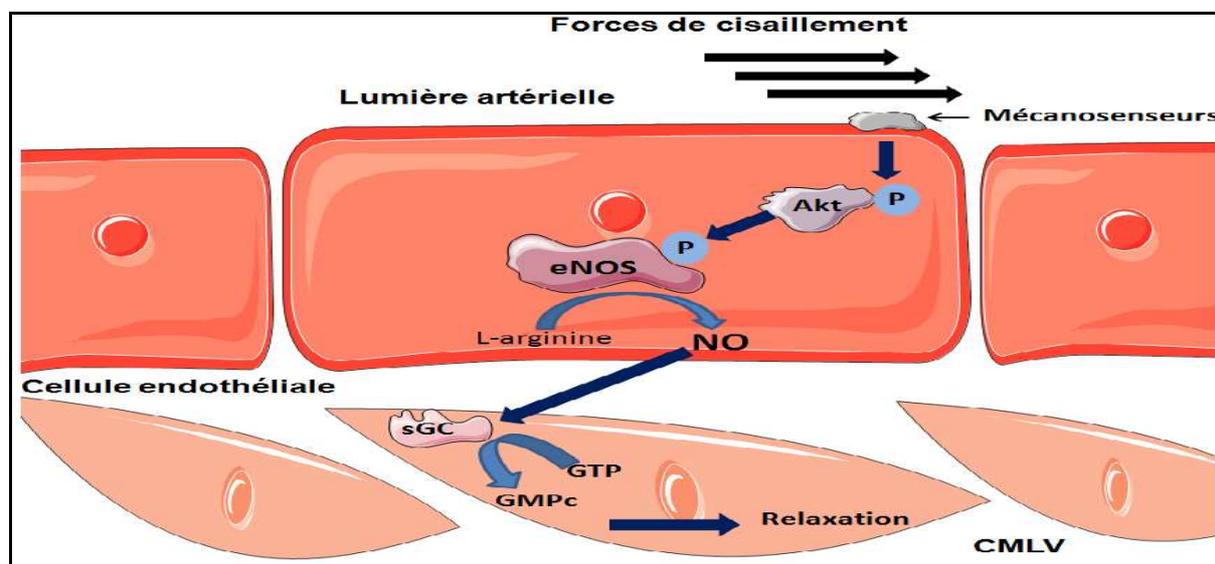


Figure 3. Activation de la eNOS par les forces de cisaillements.

2.2 Evaluation de la fonction endothéliale

La fonction endothéliale peut être explorée chez l'homme et l'animal par des méthodes fonctionnelles, en réponse à des stimuli pharmacologiques ou physiologiques.

2.2.1 Méthode d'évaluation chez l'homme

Les premières études de la fonction endothéliale chez l'homme ont consisté en des mesures par angiographie quantitative de variations du diamètre des artères coronaires, en réponse à des perfusions locales d'acétylcholine à faibles doses (Cox et coll., 1989 ; Ludmer et coll., 1986). Ces études de flux coronariens ont été les premières à mettre en évidence des altérations de la fonction endothéliale chez des sujets atteints de maladies coronariennes.

Actuellement, de nouvelles techniques d'échographie-doppler et d'ultrasonographie vasculaires ont remplacé l'angiographie quantitative pour l'évaluation des variations de flux sanguins coronariens (Deanfield et coll., 2005; Le Brocq et coll., 2008). D'autre part, il existe une relation positive entre la mesure de la dysfonction endothéliale au niveau coronarien et celle au niveau de l'artère brachiale (Anderson et coll., 1995). Ainsi, il est possible de mesurer des variations de débit sanguin au niveau de l'avant-bras « *Forearm blood flow* » (FBF,) après administration d'acétylcholine au niveau de l'artère brachiale. La résistance vasculaire est généralement évaluée par la mesure du débit sanguin et de la pression artérielle à l'aide d'un système de pléthysmographie par occlusion veineuse. Cette méthode est considérée comme étant beaucoup moins invasive pour l'homme, mais la cathétérisation de l'artère brachiale limite son utilisation à grande échelle (Takase et coll., 2005).

De plus, la dysfonction endothéliale peut être évaluée par des dosages biologiques. Ces derniers présentent l'avantage de leur simplicité sur le plan clinique puisqu'il s'agit généralement de dosages de facteurs circulants d'origine endothéliale, réalisés à partir de prélèvements sanguins ou urinaires (tableau 1). Cependant, ces dosages donnent une information générale sur la fonction endothéliale, mais ils ne sont pas spécifiques à un territoire artériel donné. Ils indiquent plutôt un état d'activation qu'un état de dysfonction endothéliale. En plus, ces dosages nécessitent des conditions délicates de prélèvement ou d'analyse non disponibles en routine.

Table 1. Marqueurs plasmatiques de la dysfonction endothéliale (d'après Joannides et coll., 1997)

Vasodilatateurs	Nitrates et nitrites (métabolites du monoxyde d'azote), 6-kéto PGF1a (métabolite de la prostacycline)
Vasoconstricteurs	ET-1, Ag II, thromboxane A2, ROS, prostaglandine
Marqueurs de l'inflammation	CRP, molécules d'adhésion cellulaire (sélectine P et E, ICAM, VCAM), MCP-I, interleukines (IL-6, IL-8), TNF- α
Marqueurs de l'hémostase	tPA, PAI-I, facteur Von Willebrand (vWF), thrombomoduline
Autres	Dérivés asymétriques de la L-arginine (ADMA), microparticules apoptoïques, VEGF

2.2.2 Méthode d'évaluation chez l'animal

L'utilisation d'anneaux aortiques isolés de lapin a permis de démontrer le rôle clé de l'endothélium dans la relaxation vasculaire (Furchgott et Zawadzki, 1980). Cette méthode de bains d'organes isolés est devenue la technique standard d'exploration de la fonction endothéliale *ex-vivo*. L'évaluation de la réponse vasodilatatrice endothélium-dépendante ou endothélium-indépendante est réalisée sur des segments d'artères de conduction (aorte, artère brachiale, artère fémoral...) et/ou d'artères de résistance (coronaire, mésentérique...) en réponse à différentes substances vaso-actives à l'aide d'un myographe. Parallèlement aux méthodes d'exploration *in-vivo* de la fonction endothéliale chez l'homme, des techniques hémodynamiques ont été développées chez l'animal (Heiss et coll., 2008). Ainsi, des cathéters peuvent être placés au niveau de l'aorte, du sinus coronarien ou des artères fémorales afin de mesurer les variations des flux sanguins en réponse à des injections de substances vaso-

actives, administrées à l'aide de cathéters placés au niveau de la veine fémorale et/ou de la veine jugulaire externe (Le Brocq et coll., 2008). Généralement, ces mesures sont réalisées sur des animaux anesthésiés, ce qui peut altérer les réponses hémodynamiques aux substances pharmacologiques. Actuellement, des systèmes de pléthysmographie à occlusion veineuse et de télémétrie permettent de travailler sur des animaux vigiles.

2.3 Mécanismes biologiques impliqués dans la dysfonction endothéliale

Il est clair à l'heure actuelle que la dysfonction endothéliale est associée aux facteurs de risque qui prédisposent aux maladies cardiovasculaires tels l'obésité et le syndrome métabolique. Plusieurs études ont indiqué que la dysfonction endothéliale est principalement caractérisée par une réduction de la biodisponibilité du NO (Raij et coll., 2006; Taddei et coll., 2003). Théoriquement, cette diminution peut résulter de deux mécanismes, soit 1) une réduction de sa production ou soit 2) une augmentation de sa dégradation. Une réduction de la production de NO peut être consécutive à une réduction de l'expression et/ou de l'activité de l'enzyme eNOS, une réduction de la disponibilité de son substrat et/ou d'un ou de plusieurs cofacteurs essentiels à sa production (Kawashima et Yokoyama, 2004 ; Takaya et coll., 2007). Dans la pathologie de l'obésité, Ketonen et coll., (2010) ont montré que la consommation d'un régime alimentaire riche en matière grasse pendant 5 mois induit une diminution de la vasorelaxation NO-dépendante au niveau de l'aorte, en réponse à l'acétylcholine chez les souris obèses par rapport à des souris saines. Cette même étude a montré également une diminution du rapport p-eNOS^{sérine 1177}/eNOS aortique, suggérant une diminution de l'activité de la eNOS chez les souris obèses. Des résultats similaires ont également été rapportés dans différents modèles d'obésité, qu'elle soit induite par l'alimentation (Roberts et coll., 2005 ; Bourgoin et coll., 2008) ou qu'elle soit génétique (Agoun et coll., 2009).

Par ailleurs, une dégradation accrue du NO peut être causée par un stress oxydatif consécutif à une production excessive de radicaux libres. Nous reviendrons ultérieurement sur la description plus détaillée du rôle des radicaux libres dans le développement de la dysfonction endothéliale (*voir la section Stress oxydatif et facteurs de risque cardiovasculaires : observations cliniques et expérimentales*).

En somme, l'endothélium joue un rôle primordial dans la régulation de l'homéostasie et du tonus vasculaire. Cependant, il est aussi le premier organe à subir une altération due aux facteurs de risque cardiovasculaire comme l'obésité et le syndrome métabolique, car l'équilibre entre la synthèse des substances vasoconstrictrices et vasodilatatrices est alors rompu, aboutissant ainsi à une altération de la fonction vasodilatatrice de l'endothélium. Cette dysfonction endothéliale représente une étape clé dans les pathologies installées comme l'athérosclérose. Ainsi, les mécanismes par lesquels l'obésité induit une dysfonction endothéliale sont complexes, et l'étiologie exacte de ce processus est toujours au cœur de la recherche actuelle. Cette situation à risque cardiovasculaire est également associée étroitement à la surproduction des ROS (comme nous allons le décrire dans le chapitre suivant), qui entraîne une accélération de la dégradation du NO. Ainsi, le stress oxydatif est considéré comme le phénomène clé impliqué dans la diminution de la biodisponibilité du NO.

3. Le stress oxydatif

3.1 Définition

Dans les systèmes biologiques, le stress oxydatif se définit comme un déséquilibre de la balance oxydants/antioxydants en faveur des oxydants, entraînant des dommages cellulaires (Atamer et coll., 2008). Il se développe lorsque les radicaux libres (molécules oxydantes) sont

produits plus rapidement qu'ils ne peuvent être neutralisés par les systèmes de défense antioxydant. Ce déséquilibre peut avoir diverses origines, telles que la surproduction endogène d'agents pro-oxydants d'origine inflammatoire (Picchi et coll., 2006), un déficit nutritionnel en antioxydants ou même une exposition environnementale à des facteurs pro-oxydants (tabac, alcool, médicaments, rayons gamma, rayons ultraviolets, pollution atmosphérique, métaux toxiques) (Moller et coll., 1996 ; Valko et coll., 2006; Valko et coll., 2005).

3.2 Les radicaux libres

Les radicaux libres sont des espèces chimiques (atomes ou molécules) possédant au moins un électron célibataire (ou non apparié) sur leur couche externe, et sont en général très réactifs et instables (Gilbert, 2000). Les radicaux libres impliquant un ou plusieurs atomes d'oxygène se nomment espèces réactives de l'oxygène (ROS). L'anion superoxyde est la forme primaire des ROS, et est formé par l'addition d'un électron à l'oxygène moléculaire (O_2). L'anion superoxyde peut ensuite être converti en ROS secondaires tels que le radical hydroxyle ($\cdot OH$), le radical peroxy ($ROO\cdot$) ou le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), ce dernier n'étant pas un radical libre puisqu'il ne contient pas d'électrons non apparié, mais se révèle tout de même réactif. Les radicaux libres impliquant plutôt un atome d'azote se nomment espèces réactives de l'azote (RNS). Parmi ces molécules, il y a le monoxyde d'azote ($NO\cdot$) et le peroxyde d'azote ($ONOO\cdot$) (Tremellen, 2008).

Les radicaux libres jouent un rôle essentiel dans certaines fonctions biologiques telles que la phagocytose, la régulation de la croissance cellulaire et des signaux intercellulaires et la synthèse d'importants composés organiques (Fridovich et coll., 1999; Ignarro et coll., 1999; Lander, 1997). Cependant, en concentrations élevées, ils deviennent hautement cytotoxiques

en engendrant diverses altérations biochimiques intracellulaires telles que l'oxydation de l'ADN (Dalle-Donne et coll., 2006 ; Loft et coll., 2008), des protéines (Davies, 2003 ; Refsgaard et coll., 2000), ou encore la peroxydation des lipides (Dalle-Donne et coll., 2006; Spiteller et coll., 2007).

3.3 Mécanismes de production des dérivés de l'oxygène

Dans la cellule, l'anion superoxyde peut être formé par différentes enzymes telles que la NADPH oxydase, la xanthine oxydase, les cyclooxygénases, les lipoxygénases, l'enzyme eNOS, le cytochrome P450 et les enzymes de la chaîne respiratoire mitochondriale (Cai et Harrison, 2000; Wassamann et coll., 2004). La contribution relative de chacune de ces sources au cours d'un stress oxydatif n'est pas encore tout à fait élucidée. Cependant, dans un contexte de maladies vasculaires, plusieurs études expérimentales et cliniques ont révélé que l'enzyme NADPH oxydase représente la principale source de production de l'anion superoxyde au niveau vasculaire, intervenant dans plusieurs pathologies associées à la dysfonction endothéliale comme l'athérosclérose, l'hypertension, le diabète, l'obésité ou encore l'hypercholestérolémie (Hwang et coll., 2003 ; Laight et coll., 2000 ; Pierce et coll., 2009 ; Thomas et coll., 2003).

Le NADPH oxydase est un complexe enzymatique multiprotéique constituant une famille d'enzymes comptant 7 membres (Nox1, Nox2, Nox3, Nox4, Nox5, Duox 1 et 2) (Bedard et Krause, 2007). Elles transfèrent successivement des électrons du NADPH jusqu'à l'accepteur final O₂, pour générer des anions superoxydes. Parmi les membres de cette famille, la gp91^{phox} (*phagocyte oxydase*) ou Nox2 est la mieux caractérisée. Cette protéine a été clonée en 1986 (gène *CYBB* sur le chromosome X, locus Xp21.1), et elle est fonctionnelle sous forme de complexe assemblé suite à un stimulus. Ce complexe comprend un cœur catalytique

membranaire (gp91^{phox} et p22^{phox}, formant le cytochrome b₅₅₈) et des protéines cytosoliques (p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox} et Rac) (figure 3).

Désassemblée quand elle est inactive au repos, la NADPH oxydase devient active à la suite de la translocation des facteurs cytosoliques à la membrane, formant ainsi un complexe enzymatique fonctionnel. En fait, l'activation de la NADPH oxydase implique deux types de phénomènes: la phosphorylation et la translocation à la membrane des sous-unités cytosoliques (Touyz et coll., 2003). En effet, suite à l'activation de la cellule, les composantes cytosoliques p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox} deviennent phosphorylées et vont migrer à la membrane pour s'associer aux facteurs membranaires gp91^{phox} et de p22^{phox}. Parallèlement, la molécule Rac va échanger son GDP avec un GTP, se dissocier de son inhibiteur Rho-GDI, et migrer de façon indépendante à la membrane. Le cytochrome b₅₅₈ est ensuite activé par la p67^{phox}, par l'intermédiaire de son domaine d'activation (figure 3). La NADPH oxydase ainsi activée va utiliser le NADPH cytosolique pour réduire l'oxygène et produire de l'anion superoxyde (Paquet et coll., 2000).

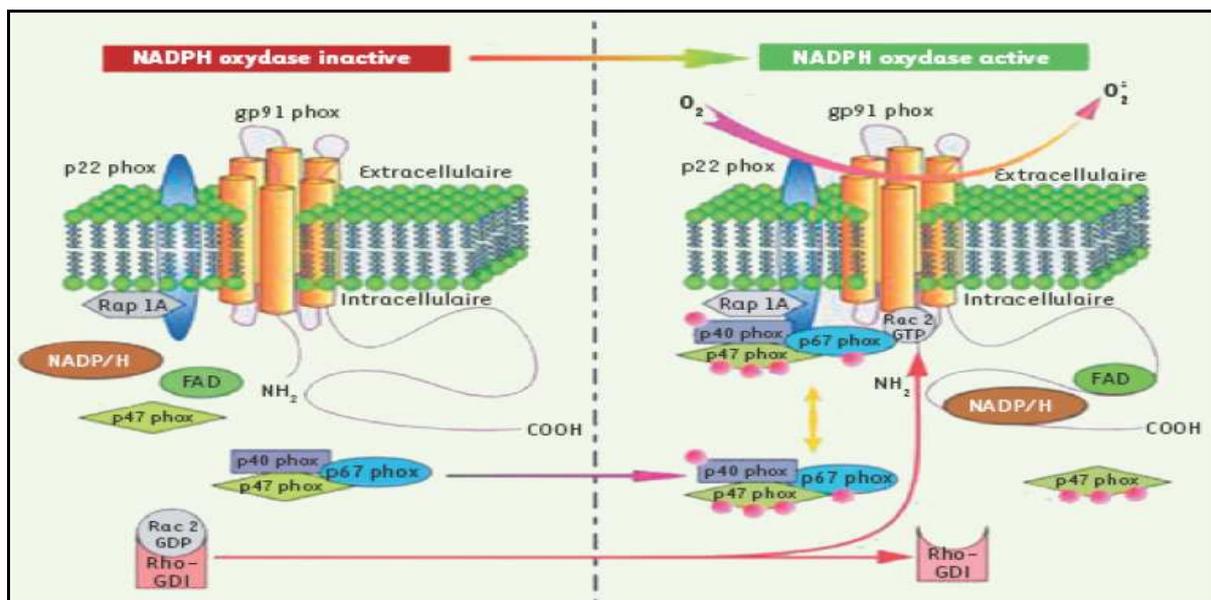


Figure 4 : Représentation schématique de l'activation de la NADPH oxydase (Deleo et Quinn, 1996)

3.4 Mécanismes de défense contre des dérivés de l'oxygène

Les radicaux libres sont produits spontanément et de manière continue au sein de notre organisme. Le maintien d'un niveau non cytotoxique de ROS est assuré par des systèmes antioxydants, dont le rôle principal est de neutraliser et de dégrader les radicaux libres. Un déficit ou un dysfonctionnement de ces systèmes engendre une augmentation des dommages tissulaires. Les antioxydants peuvent être divisés en deux groupes selon leur mode d'action : les antioxydants enzymatiques et les antioxydants non-enzymatiques.

3.4.1 Le système antioxydant enzymatique

Ce système est principalement composé des superoxydes dismutases (SOD), des catalases (CAT), des glutathions peroxydases (GPx) et des thiorédoxines (Higashi et coll., 2009 ; Wood et coll., 2003). Parmi ces enzymes, les SOD représentent la première ligne de défense pour contrer les ROS, et ce sont les enzymes antioxydantes les plus importantes au niveau vasculaire (Higashi et coll., 2009; Wassmann et coll., 2004).

Les superoxydes dismutases (SOD) sont des métalloenzymes qui catalysent la dismutation des ions superoxydes en peroxyde d'hydrogène et d'oxygène. Chez les mammifères, la SOD existe sous trois isoformes qui se différencient par leur localisation cellulaire et par leur cofacteur métallique : une forme cytosolique associée aux ions cuivre et zinc (Cu/Zn-SOD), une forme mitochondriale associée au manganèse (Mn-SOD) et une forme extracellulaire (EC-SOD). La Mn-SOD semble indispensable à la vie puisque sa mutation est non viable : l'espérance de vie maximale pour des souris Mn-SOD^{-/-} n'est que de 22 jours pour certains types de mutations (Huang et coll., 2001). Ceci n'est pas le cas pour la forme cytosolique, bien que l'espérance de vie chez des souris transgéniques Cu/Zn-SOD^{-/-} soit plus

faible que celle de souris Cu/Zn-SOD^{+/+} (130 semaines vs 180 semaines) (Sentman et coll., 2006). D'autre part, il a été rapporté que la Cu/Zn-SOD joue un rôle important dans la régulation de la biodisponibilité du NO et de la fonction endothéliale. À ce sujet, Lynch et coll., (1997) ont montré que l'inhibition de la Cu/Zn-SOD induit une dysfonction endothéliale chez des rats normaux.

3.4.2 Le système antioxydant non-enzymatique

Contrairement aux enzymes antioxydants, la plupart des antioxydants non-enzymatiques ne sont pas synthétisés par l'organisme et doivent être apportés par l'alimentation. Dans cette catégorie, nous retrouvons les oligoéléments (le cuivre, le fer, le manganèse, le sélénium et le zinc), la glutathion réduit (GSH), l'ubiquinone (CoQ10), l'acide ascorbique (vitamine C), l'alpha tocophérol (vitamine E) et les caroténoïdes (Vertuani, S et coll., 2004).

3.5 Stress oxydatif et facteurs de risque cardiovasculaire : observations cliniques et expérimentales

Le stress oxydatif est actuellement reconnu comme étant à l'origine ou comme représentant un facteur aggravant de plusieurs pathologies. Son implication dans l'hypertension artérielle, l'athérogénèse, la dysfonction endothéliale, le diabète ou encore l'obésité a été démontrée par différentes études (Dobrian et coll., 2001 ; Furukawa et coll., 2004 ; Gilligan et coll., 1994 ; Hornig, 2002 ; Levine et coll., 1996).

Le stress oxydant systémique augmente avec le degré d'obésité. En effet, il existe une relation positive entre les augmentations de concentrations plasmatiques des TBARS et de la 8-épi-PGF₂ α (marqueurs du stress oxydant systémique), et l'IMC (Keaney et coll., 2003 ; Pou et coll., 2007). De plus, l'induction de l'obésité chez la souris, par un régime hyperlipidique, augmente significativement les concentrations plasmatiques des marqueurs de la peroxydation lipidique et induit l'oxydation de l'albumine plasmatique (Yamato et coll., 2007). Aussi, la concentration des protéines carbonylées (conséquence directe d'un stress oxydatif) dans les tissus adipeux est 2 à 3 fois plus élevée chez les souris obèses par rapport aux témoins (Grimsrud et coll., 2007). De même, il a été démontré chez la souris obèse une augmentation de la production de H₂O₂ au niveau du tissu adipeux. L'inhibition de la NADPH oxydase par l'apocynine diminue significativement cette production et améliore entre autre l'hyperinsulinémie, l'hyperglycémie et l'hypertriglycéridémie (Furukawa et coll., 2004).

D'autre part, les ROS sont capables de modifier la balance relaxation/contraction vers la contraction, jouant un rôle primordial dans la physiopathologie cardiovasculaire. En ce sens, il a été démontré que la production vasculaire d'anions superoxydes est augmentée dans divers modèles d'hypertension artérielle comme les modèles SHR (Wu et coll., 2001), par inhibition chronique de NOS (Kitamoto et coll., 2000), par infusion chronique d'Ang II (Landmesser et coll., 2002) ou encore induite par un régime hyperlipidique (Dobrian et coll., 2001). Cette production accrue d'anions superoxydes a une importance fonctionnelle sur la pression sanguine, puisque l'administration d'antioxydants de diverses natures permet de normaliser la pression artérielle des animaux (Cuzzocrea et coll., 2004 ; Negishi et coll., 2004 ; Park et coll., 2002).

Il semble que certains dérivés de l'oxygène, dont l'anion superoxyde, ont la propriété de réagir très rapidement avec le NO, et ainsi d'empêcher son action (Taddei et coll., 2003).

De nombreuses études expérimentales ont observé une augmentation de la production de ROS au niveau des artères prélevées sur des animaux obèses en comparaison à des animaux normaux (Galili et coll., 2007; Ketonen et coll., 2010; Kobayasi et coll., 2010). De plus, Roberts et coll., (2005) ont montré chez des rats obèses que la dysfonction endothéliale est liée à une activation du complexe NADPH oxydase au niveau vasculaire. D'autres études ont montré que le traitement antioxydant permet de corriger la dysfonction endothéliale. En ce sens, Hayashi et coll., (2005) ont démontré que l'inhibition de la NADPH oxydase par l'apocynine améliore la dysfonction endothéliale chez le rat diabétique. Il a été rapporté également que l'administration de molécules antioxydantes réduit l'altération de la vasodilatation NO-dépendante observée chez des animaux atteints d'obésité (Javeshghani et coll., 2009; Knight SF et coll., 2010). Ces observations nous montrent bien l'implication du stress oxydatif dans le développement de l'hypertension et de l'altération de la fonction vasculaire.

En somme, l'obésité est associée à un état de stress oxydatif, puisqu'il existe une relation positive entre les divers marqueurs du stress oxydatif systémique et le degré de l'obésité. De plus, il semble que le complexe NADPH oxydase joue un rôle important dans le développement des complications cardiométaboliques au cours de l'obésité. D'autre part, la surproduction des ROS dans l'obésité est souvent associée à un état inflammatoire. C'est pourquoi nous consacrerons la prochaine section à l'étude de la relation entre l'obésité et l'inflammation, ainsi qu'à la contribution de celle-ci dans le développement des complications cardiovasculaires liées à l'obésité.

4. L'inflammation

Actuellement, il est reconnu que l'obésité est associée à un état inflammatoire chronique, caractérisé par une production anormale de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α et IL-6) et une augmentation des niveaux circulants de marqueurs de l'inflammation systémique tels que la CRP. Certains auteurs suggèrent que cet état inflammatoire chronique pourrait être à la base des altérations cardiométaboliques comme la dysfonction endothéliale ou encore la résistance à l'insuline observées chez les individus obèses (Poitou et coll., 2005 ; Xu et coll., 2003 ; Ziccardi et coll., 2002).

4.1 Contribution du tissu adipeux à l'état inflammatoire

L'association entre l'obésité et l'inflammation a été démontrée pour la première fois par Hotamisligil et coll., (1993), qui ont constaté une surexpression de la cytokine pro-inflammatoire TNF- α dans le tissu adipeux de la souris obèse. Depuis, plusieurs études ont rapporté que l'obésité est associée à des niveaux plasmatiques élevés de TNF- α , d'IL-6, de CRP et d'autres marqueurs de l'inflammation (Fantuzzi, 2005 ; Wellen et Hotamisligil, 2005 ; Tilg et coll., 2006). Chez l'homme, certaines cytokines inflammatoires sont surexprimées dans le tissu adipeux d'individus obèses (Xu et coll., 2003). Le tissu adipeux produit 10-35% de l'IL-6 en circulation, laquelle augmente en fonction de l'adiposité (Mohamed-Ali et coll., 1997 ; Pradhan et coll., 2001). De même, la production de TNF- α par les adipocytes est positivement corrélée avec le degré de l'adiposité (Coppack, 2001). Par ailleurs, la distribution du tissu adipeux semble jouer un rôle clé dans le processus inflammatoire lié à l'obésité. En ce sens, l'étude *The ATTICA Study* a montré que les individus affichant une obésité viscérale avaient des niveaux de CRP (53%), de TNF- α (30%) et d'IL-6 (42%) plus élevés comparativement aux sujets qui avaient une distribution normale de tissu adipeux

(Panagiotakos et coll., 2005). De plus, il a été rapporté que certaines cellules immunitaires comme les macrophages pouvaient s'infiltrer dans le tissu adipeux (principalement viscéral) (Figure. 4), et que leur nombre augmente avec l'obésité (Tilg et Moschen, 2006 ; Weisberg et coll., 2003). Ces macrophages infiltrés seraient responsables de la majeure partie de la production de cytokines inflammatoires dans le tissu adipeux obèse (Weisberg et coll., 2003 ; Xu et coll., 2003). En fait, ils seraient responsables de presque toute l'expression du TNF- α et d'environ 50% de l'IL-6 (Weisberg et coll., 2003)

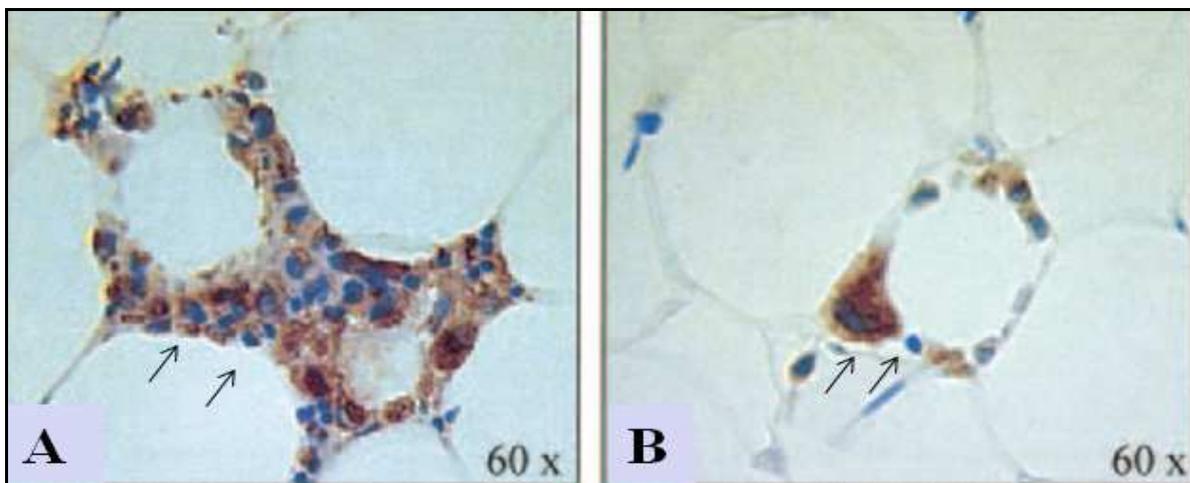


Figure 5 : Aspect typique de l'infiltration macrophagique chez l'obèse: Infiltration plus importante dans le tissu adipeux viscéral (A) que sous-cutané (B). Macrophages marqués par l'anticorps HAM56 (D'après Canello et coll., 2006).

D'autre part, il semble que la surexpression de TNF- α lors de l'obésité joue un rôle crucial dans le développement de la résistance à l'insuline. À ce sujet, Hotamisligil et coll., (1993) ont démontré que, chez des rats obèses, l'injection d'anticorps qui neutralisent le TNF- α circulant entraîne une diminution de la glycémie et de l'insulinémie, suggérant que la neutralisation de TNF- α augmente la sensibilité à l'insuline des animaux obèses. De plus, les souris TNF- $\alpha^{-/-}$ sont en partie protégées contre le développement de la résistance à l'insuline associée à l'obésité (induite par un régime hyperlipidique) (Uysal et coll., 1997). Il semble

que le TNF- α soit capable d'inhiber la voie de signalisation de l'insuline au niveau du muscle et du tissu adipeux. À ce sujet, il a été montré que le TNF- α est en mesure de causer la phosphorylation d'IRS-1 sur la sérine 307 (Rui et coll., 2001). Cette modification d'IRS-1 est associée à une réduction de la phosphorylation sur les résidus tyrosine d'IRS-1, ce qui diminue à son tour son association avec l'IR. En plus d'être associé à la phosphorylation de la sérine 307 d'IRS-1, le TNF- α peut causer également la phosphorylation sur la sérine 632 d'IRS-1, altérant ainsi sa liaison à la PI 3-kinase (Ozes et coll., 2001). Le TNF- α peut aussi diminuer l'expression d'IRS-1 et l'expression des GLUT4 (Hotamisligi et coll., 1996 ; Stephen et coll., 1997). D'autre part, cette cytokine peut activer une pléiade de kinases, dont la JNK, qui jouerait probablement un rôle dans le développement de la résistance à l'insuline (Hirosumi et coll., 2002).

Des études *in-vitro* ont montré que la protéine JNK peut phosphoryler l'IRS-1 sur Ser307, empêchant ainsi son interaction avec le récepteur de l'insuline (Aguirre et coll., 2002 ; 2000). De plus, il a été rapporté qu'une suractivation de JNK dans certains modèles d'animaux obèses est associée à une augmentation de la phosphorylation d'IRS-1 sur Ser307, au niveau du muscle et du tissu adipeux (Hirosumi et coll., 2002). L'invalidation génétique de JNK1, *JNK1*^{-/-}, prévient le développement de la résistance à l'insuline en empêchant la phosphorylation de l'IRS-1 sur Ser307, amenant ainsi un rétablissement de la signalisation insulinique (Hirosumi et coll., 2002). Notons cependant que les souris *JNK1*^{-/-} sont également moins obèses, ce qui peut expliquer en partie l'augmentation de leur signalisation insulinique.

4.2 Inflammation vasculaire et risque athérogène

L'obésité est souvent associée à la présence d'une athérosclérose, et ce dès le plus jeune âge. Des examens post-mortem sur des jeunes et des adultes obèses (15-34 ans) ont

montré que l'étendue des stries lipidiques dans la coronaire droite et dans l'aorte abdominale était associée à l'obésité et à l'épaisseur du tissu adipeux (McGill et coll., 2000 ; 1995).

Dans des conditions physiologiques normales, les cellules endothéliales ne favorisent pas l'adhésion des leucocytes à leur surface. Cependant, la présence de certains facteurs de risque cardiovasculaire tels l'obésité, l'hypertension artérielle, la résistance à l'insuline ou encore la consommation d'une diète athérogénique entraîne l'activation de l'endothélium. Par conséquent, la perméabilité de ce dernier aux lipoprotéines (principalement les LDL-c) ainsi que l'adhésion des leucocytes et des plaquettes à la paroi interne des vaisseaux sanguins, médiées par des molécules d'adhésion (principalement ICAM-1, VCAM-1 et E-sélectine), sont augmentées (figure 4A). De plus, l'endothélium acquiert des propriétés pro-coagulantes et il y a également sécrétion de molécules vaso-actives, de cytokines et de facteurs de croissance. Lorsque la réponse inflammatoire ne parvient plus à neutraliser ou à éliminer ces molécules indésirables, le processus de dysfonction endothéliale se perpétue (Libby, 2006; Ross, 1999).

Lorsque l'inflammation est installée, elle stimule la migration ainsi que la prolifération des cellules musculaires lisses (figure 4B). On parle alors d'une lésion athérosclérotique de niveau intermédiaire. Lorsque cet état perdure, on note un épaississement interne de la paroi intima-média des vaisseaux sanguins. L'état inflammatoire entraîne également une augmentation du nombre de macrophages et de lymphocytes T en provenance de la circulation sanguine. Ainsi, les macrophages présents dans l'espace sous-endothélial jouent un rôle clef dans de nombreuses étapes de l'athérosclérose. Dans un premier temps, un certain nombre d'entre eux se transforment en cellules spumeuses en captant les LDL oxydées ; cette captation se fait par l'intermédiaire de récepteurs «*scavengers* ». Ces cellules chargées de lipides se multiplient et sécrètent des cytokines, des chimiokines et des facteurs de croissance qui maintiennent et même amplifient les signaux pro-inflammatoires. À long terme, ce

phénomène peut éventuellement mener à la nécrose du tissu vasculaire (Libby, 2006; Ross, 1999). Les cycles d'accumulation de cellules mononucléaires, la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses et la formation de tissu fibreux engendrent un élargissement ainsi qu'une restructuration de la lésion. Celle-ci devient alors recouverte d'une chape fibreuse, laquelle recouvre un noyau formé de lipides et de tissus nécrotiques (figure 4C). À ce stade, la lésion est alors qualifiée d'avancée et/ou de compliquée (Ross, 1999).

Au fil du temps, la matrice de collagène interstitiel composant la chape fibreuse de la lésion athérosclérotique se dégrade et s'amincit sous l'action de métalloprotéinases ainsi que de diverses enzymes protéolytiques sécrétées par les macrophages. Finalement, il peut y avoir rupture de la chape fibreuse et formation d'un thrombus, résultant en l'occlusion d'artères de petit calibre (figure 4D). Par conséquent, un infarctus du myocarde ou un accident vasculaire cérébral serait susceptible de survenir (Ross, 1999).

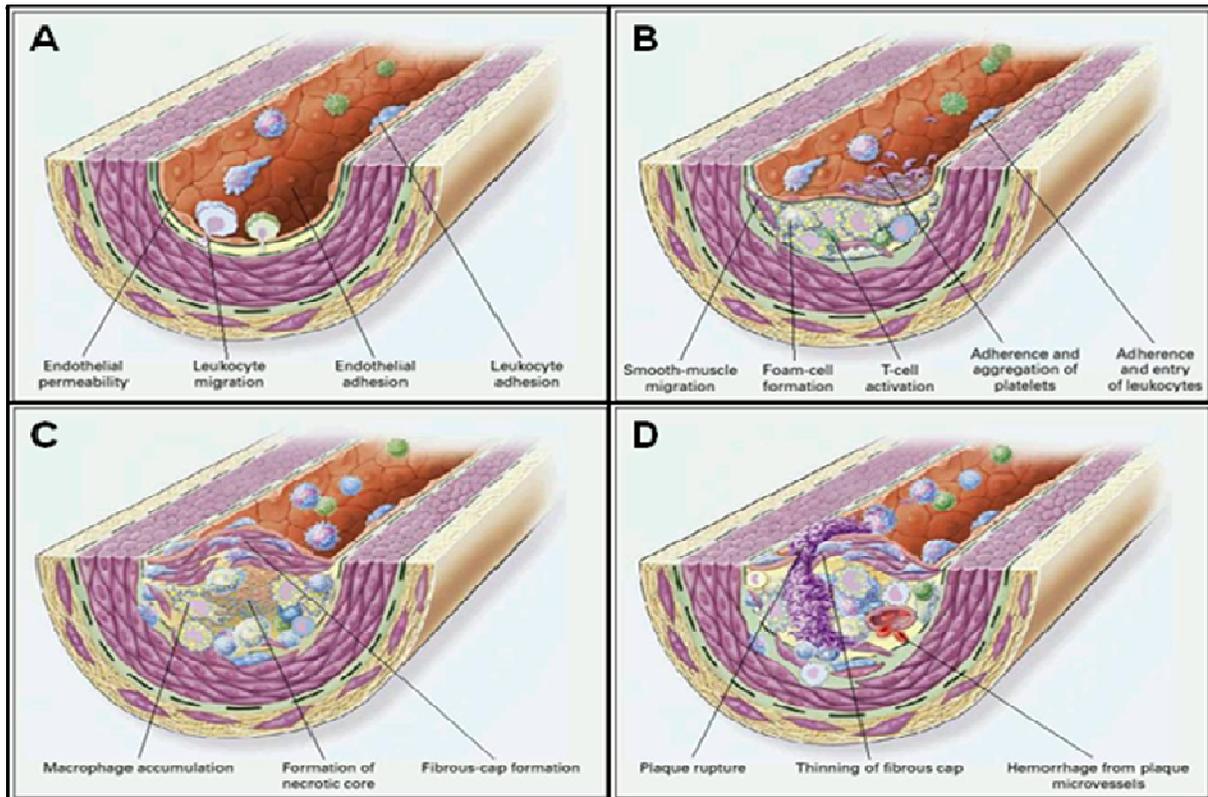


Figure 6. Développement et progression de l'athérosclérose. A : Dysfonction endothéliale dans l'athérosclérose. B : Formation de la strie lipidique dans l'athérosclérose. C : Formation d'une lésion avancée et compliquée dans l'athérosclérose. D : Plaque fibreuse instable dans l'athérosclérose (ROSS, 1999).

En somme, l'accumulation du tissu adipeux au niveau viscéral semble jouer un rôle important dans le développement des complications cardiométaboliques liées à l'obésité. La présence d'un état inflammatoire et d'un stress oxydatif élevé seraient des éléments clé dans la cascade d'événements menant au développement de l'athérosclérose dans l'obésité. Ainsi, le risque d'avoir un accident vasculaire cérébral et un infarctus de myocarde augmentent avec le degré de l'obésité. Par exemple, l'étude Framingham, qui a suivi des hommes et des femmes pendant 44 ans, a montré que chaque augmentation de l'IMC d'un point augmente le risque de développer un accident ischémique cérébral de 4% et hémorragique de 6% (Wilson et coll., 2002). D'autre part, l'augmentation rapide de l'obésité dans notre société actuelle semble être influencée en grande partie par un mode de vie de plus en plus sédentaire et une

alimentation malsaine. C'est pourquoi nous consacrerons le prochain chapitre à l'étude de l'impact des facteurs environnementaux, tels que l'inactivité physique et les régimes alimentaires de type occidentaux, sur le développement de l'obésité et de ses complications cardiométaboliques.

CHAPITRE II : STYLE DE VIE MODERNE ET RISQUE CARDIOVASCULAIRE

Dans nos sociétés occidentales, l'industrialisation et la modernité n'ont pas seulement favorisé une diminution de la pratique d'activité physique, elles ont aussi introduit des nouvelles habitudes alimentaires. Ainsi, l'abondance de nourriture hypercalorique, la prise des repas à l'extérieur de la maison, les repas «sautés» au profit des grignotages, l'omniprésence de la télévision et des ordinateurs, la facilité accrue dans l'exécution des tâches quotidiennes et le style de mode de vie sédentaire, ont favorisé l'émergence de l'obésité et des maladies cardiovasculaires. Le meilleur exemple qu'on peut citer pour expliquer le rôle de notre environnement « malsain » est celui du groupe religieux des Amish. Ce groupe est présent en Amérique du Nord et vit de façon simple, à l'écart de la société moderne. La première règle des Amish est : « *Tu ne te conformeras point à ce monde qui t'entoure* ». Il a été rapporté que, malgré une alimentation riche en matière grasse et en hydrate de carbone, seulement 4% des adultes Amish étaient obèses, contre 30% chez les américains. Pour expliquer cette différence, les auteurs ont constaté que les Amish avaient une activité physique et une dépense énergétique journalière très importantes, probablement équivalentes à celles du XIX^{ème} puisque cette communauté refuse toute modernité technologique (Bassett et coll., 2004).

1. Rôle de la sédentarité

Dans l'histoire de l'humanité, l'activité physique était essentielle à la survie de l'espèce, car elle était nécessaire pour la quête de nourriture. Or, on constate que ce n'est plus le cas aujourd'hui, et le mode de vie sédentaire représente un facteur de risque de mortalité non négligeable. En effet, une étude américaine, réalisée par Mokdad et coll., (2004) a estimé que le nombre de morts lié à la sédentarité et à une mauvaise alimentation a augmenté de 25% en 2000 par rapport aux estimations de 1990. Les résultats de la *Nurses' Health Study* ont également démontré que l'obésité et la sédentarité augmentaient le risque de mortalité (Hu et coll., 2004). Dans cette étude, 116 564 femmes âgées entre 30 et 55 ans ont été suivies pendant 24 ans. Lors de ce suivi, 10 282 décès de toutes causes ont été rapportés. En comparaison avec les femmes les plus actives qui avaient un IMC inférieur à 25,0 kg/m², les femmes les plus sédentaires qui avaient un IMC supérieur à 30,0 kg/m² présentaient un risque relatif de mortalité de 2,42. Le risque relatif de mortalité cardiovasculaire se chiffrait quant à lui à 4,73. Certains auteurs parlent même d'un « *Sedentary Death Syndrom* » (Lees et Booth, 2004).

D'un point de vue quantitatif, le gain de poids est un processus se déroulant souvent sur plusieurs années, et le déséquilibre énergétique n'a pas besoin d'être important pour conduire à une obésité. En ce sens, des apports quotidiens dépassant de 5% les dépenses énergétiques (soit environ 100 kcal/jour) sont susceptibles d'induire une augmentation annuelle pouvant aller jusqu'à 5 kg de masse grasse, suggérant qu'un faible déséquilibre entre l'apport et la dépense énergétique peut mener à une obésité (Jéquier, 2002). L'inactivité physique évaluée par le temps passé devant la télévision, auquel il faudrait ajouter celui passé devant les autres écrans (ordinateurs et jeux vidéo) a été largement étudiée. Par exemple, une étude américaine portant sur 50 277 femmes âgées de 30 à 59 ans, ayant un BMI <30 et sans antécédent cardio-vasculaire a montré que, durant les 6 années du suivi, 7.5% des femmes

développent une obésité (Hu et coll., 2003). D'après cette étude, chaque tranche de 2 heures quotidienne passée devant la télévision augmente de 23% le risque de l'obésité et de 14% le risque de diabète. De plus, il a été rapporté chez de jeunes obèses que la surcharge pondérale n'est pas corrélée avec les apports énergétiques, mais avec le temps passé devant l'écran (Deheeger et coll., 1997; Maffei et coll., 1997). Le risque d'obésité diminue de 10% par heure d'activité physique par jour, et augmente de 12% par heure passée devant la télévision (Ebbeling et coll., 2002).

D'autres études ont démontré que la sédentarité, ainsi qu'une capacité cardiorespiratoire faible, sont toutes deux associées à une détérioration de certains marqueurs de risques cardiovasculaires tels que les paramètres lipidiques (cholestérol totale et triglycérides) et les marqueurs de l'inflammation (CRP, TNF- α et IL-6), et ce, indépendamment de l'adiposité totale (Church et coll., 2002 ; Colbert et coll., 2004). Comparativement à des individus sédentaires, les individus obèses pratiquant une activité physique régulière présenteraient une pression artérielle moins élevée, de meilleurs profils lipidiques, de plus faibles niveaux de graisse viscérale, des niveaux de marqueurs d'inflammation systémiques plus faibles et une meilleure fonction cardiaque et endothéliale, réduisant ainsi le risque de mortalité cardiovasculaire (Katzmarzyk et coll., 2004; Ford et Li, 2006).

D'autre part, plusieurs travaux ont utilisé la méthode de l'alitement « *Bed Rest* » pour étudier les effets délétères directs de l'inactivité physique sur la santé cardiovasculaire et métabolique. À ce sujet, Hamburg et coll., (2007) ont démontré sur des sujets sains, que l'alitement pendant 5 jours entraîne une augmentation significative de la pression artérielle systolique, des taux plasmatiques de cholestérol total et des triglycérides, ainsi qu'une diminution de la sensibilité à l'insuline. Ces résultats nous montrent bien le rôle de la sédentarité dans l'apparition des facteurs de risque cardiovasculaire.

2. Rôle du régime alimentaire occidental hypercalorique

L'alimentation hypercalorique est l'une des premières hypothèses qui a été avancée pour expliquer l'émergence de l'obésité. Ces dernières années, un intérêt particulier a été porté au rôle du contenu des lipides et des sucres raffinés en quantité élevée dans l'alimentation occidentale, comme étant un facteur clé de la prise de poids et du développement de l'obésité. Par exemple, il existe une relation étroite entre l'obésité et la consommation excessive d'aliments de type « *fast food* », d'aliments sucrés et de boissons gazeuses (Ludwig et coll., 2001). Dans la présente thèse, nous nous sommes intéressés principalement aux matières grasses, et particulièrement à l'apport en matières grasses totales et saturées, car ces dernières jouent un rôle important dans le développement de l'obésité et l'apparition des facteurs de risque cardiovasculaire (Mann, 2002).

D'une façon générale, la quantité de lipides dans le régime alimentaire est associée à la prévalence de l'obésité. Dans ce contexte, Bray et Popkin, (1998) ont trouvé une relation positive entre le pourcentage de lipides dans l'alimentation, et le pourcentage d'individus en surpoids dans des populations de 20 pays différents. Certaines études ont également démontré que l'apport en graisse, indépendamment de l'apport énergétique, stimulait la prise de poids. En effet, l'étude *Ni-Hon-San* a comparé le poids de Japonais vivant aux Etats-Unis et ceux vivant au Japon. Ils ont observé que l'apport en matière grasse était deux fois plus élevé chez les Japonais vivant aux États-Unis, tandis que l'apport énergétique total était identique entre les deux populations. L'IMC et les plis sous-cutanés (estimation de la masse grasse) des Japonais vivant aux Etats-Unis étaient également supérieurs à ceux vivant dans leur pays d'origine (Curb et Marcus, 1991). De plus, la consommation d'une diète riche en lipides diminue la sensibilité à l'insuline *in-vivo* suite à une réduction de la captation du glucose par les tissus périphériques, et une augmentation de la production hépatique de glucose (Kraegen et coll., 2001). Une autre étude a montré que la simple consommation d'un repas riche en

lipides provoque une dysfonction endothéliale passagère chez l'homme sain (Cuevas et coll., 2000).

D'autres études ont montré que le type de gras consommé a un impact plus important sur le risque cardiovasculaire que la quantité totale de matières grasses. En effet, les résultats de la *Nurses Health Study* ont révélé que l'apport total en matières grasses n'était pas associé à un risque accru de maladies cardiovasculaires (Hu et coll., 1997). Cependant, en étudiant seulement les acides gras saturés, ils ont démontré que ce type de matières grasses corrélait positivement au risque de développer ce type de maladies. Chaque augmentation de 5% de l'apport énergétique provenant des acides gras saturés est associée à une augmentation de 17% du risque de maladie coronarienne (Hu et coll., 1997). D'autres études ont démontré que l'ingestion chronique d'acides gras saturés est associée à une altération des voies intracellulaires régulant l'action de l'insuline dans différents tissus comme le muscle squelettique et le foie (Shulman, 2000 ; Yki-Jarvinen et coll., 2005). De plus, il a été rapporté que la consommation d'acides gras saturés est associée à une diminution de sécrétion de l'insuline par les cellules β pancréatiques, induisant ainsi une hyperglycémie (Yki-Jarvinen et coll., 2005). D'autre part, il a été démontré qu'une alimentation riche en acide gras saturés entraîne également une augmentation des taux plasmatiques du cholestérol total et du LDL-c (Kris-Etherton et coll., 1997). Par ailleurs, d'autres études ont également mis en évidence une augmentation importante des taux plasmatiques des cytokines pro-inflammatoires TNF- α (+56%) et IL-6 (+75%), après ingestion d'un repas hyperlipidique riche en acide gras saturés (Nappo et coll., 2002). L'ensemble de ces observations nous montrent que la consommation d'acides gras saturés représente un élément clé dans le développement des facteurs de risques cardiovasculaires en augmentant la cholestérolémie et l'inflammation, ce qui peut participer au développement prématuré de l'athérosclérose.

En somme, les facteurs environnementaux incluant la sédentarité et le régime alimentaire hypercalorique/hyperlipidique semblent jouer un rôle important dans l'augmentation rapide de la prévalence de l'obésité et de l'apparition de pathologies cardiovasculaires. Ainsi, la modification du style de vie semble indispensable dans la prise en charge de l'obésité et de ses complications. C'est pourquoi nous consacrerons le prochain chapitre à l'étude des effets bénéfiques de l'exercice physique et de régime alimentaire sain sur les maladies cardiovasculaires et métaboliques.

CHAPITRE III : L'EXERCICE PHYSIQUE ET LA DIÈTE COMME STRATÉGIES THÉRAPEUTIQUES CONTRE LES MALADIES CARDIOVASCULAIRES ASSOCIÉES À L'OBÉSITÉ

La modification de style de vie, comme l'adoption d'habitudes alimentaires saines et la pratique régulière d'une activité physique, constitue un élément incontournable en matière de prévention, de prise en charge et de traitement des facteurs de risques cardiovasculaires. A ce propos, une grande étude américaine a retenue tout particulièrement notre attention. Réalisée par le « *Diabetes Prevention Program Research Group* », elle a démontré que le changement de mode de vie était plus bénéfique que le traitement pharmacologique sur la prévalence du diabète de type 2. Cette recherche, au cours de laquelle 3234 participants qui n'étaient pas atteints du diabète de type 2, mais qui présentaient un état d'intolérance au glucose (état pré-diabétique) associé à un IMC>24, ont été randomisés en 3 groupes: 1) groupe placebo, 2) groupe metformine (traitement pharmacologique hypoglycémiant) et 3) groupe changement des habitudes de vie. Ce dernier groupe avait comme objectif une diminution de 7% du poids initial, grâce à un régime hypocalorique et hypolipémiant associé à une activité physique de niveau modéré telle que la marche rapide, durant au moins 150 min par semaine. Après un suivi de 2,8 ans en moyenne, en comparaison au groupe placebo, l'incidence du diabète de type 2 a diminué de 58% dans le groupe « changement des habitudes de vie », et de 31 % dans le groupe metformine (Knowler et coll., 2002). D'autres études confirment ces résultats (Hamdy et coll., 2003 ; Tuomilehto et coll., 2001). Cela nous confirme donc, à quel point l'activité physique, associée à une alimentation adaptée, se révèle être la stratégie la plus efficace dans la prise en charge des maladies cardiométaboliques.

1. Effet de l'exercice physique sur la mortalité et les facteurs de risque cardiovasculaire : Observations cliniques et expérimentales

1.1 Effet bénéfique sur la mortalité cardiovasculaire

Actuellement, il est unanimement admis que l'activité physique modérée réduit le risque de survenue d'évènement cardiovasculaire, tant en prévention primaire qu'en prévention secondaire. Chez des femmes obèses, la pratique hebdomadaire d'au moins 3h30 d'exercice d'endurance est associée à une diminution importante du risque d'évènements coronariens, par rapport à celles qui pratiquaient moins d'une heure d'activité physique (Li et coll., 2006). De même, l'exercice diminue le risque d'évènement coronariens, et ce indépendamment d'une réduction de la corpulence et du niveau de l'obésité abdominale (Wessel et coll., 2004). Une autre étude portant sur 14101 femmes de plus de 50 ans, suivies pendant 10 ans, a montré une relation inverse entre le taux de mortalité par un AVC et le niveau d'activité physique (Ellekjaer et coll., 2000). D'autre part, Hu et coll., (2004) ont mis en évidence que la pratique hebdomadaire de 3 à 4 h d'exercice physique réduit le risque de mortalité de 31 à 50% chez les patients diabétiques de type 2. L'effet protecteur de l'exercice sur la mortalité cardiovasculaire a également été observé dans différents modèles animaux à risque cardiovasculaire. Chicco et coll., (2008) ont rapporté que l'exercice aérobie modéré retarde considérablement la mortalité cardiaque chez la rate sévèrement hypertendue. D'autre part, l'exercice physique est utilisé comme un moyen de réhabilitation et de réadaptation en tant que prévention secondaire chez les patients ayant eu un évènement cardiovasculaire. Dans ce contexte, il a été estimé que l'exercice physique réduirait le taux de mortalité de 33 à 44% dans les 5 ans suivant l'arrêt du protocole chez les patients coronariens par rapport aux sédentaires (Adams et coll., 2008).

D'autres travaux ont montré que l'exercice améliore la capacité physique et la qualité de vie des patients insuffisants cardiaques. Par exemple, la comparaison réalisée par Silva et coll., (2002), entre un groupe soumis à un programme d'entraînement pendant 3 mois et un groupe témoin, met en évidence une amélioration significative de la distance parcourue sur 6 min (+355m) dans le groupe «intervention».

1.2 Effets bénéfiques sur les facteurs de risque cardiovasculaire

Plusieurs études cliniques et expérimentales ont démontré que la pratique d'activité physique est associée à une réduction des facteurs de risques cardiovasculaires. Il a été rapporté que l'exercice réduit l'accumulation du tissu adipeux viscéral chez l'animal et l'homme obèse (Dantas et coll., 2010 ; Irving et coll., 2008), abaisse la pression artérielle chez l'animal et l'homme hypertendu (Horta et coll., 2005; Fagard, 2006), améliore le profil lipidique chez l'animal et l'homme avec une hyper-cholestérolémie (Napoli et coll., 2004 ; Varady et coll., 2005) ou encore améliore la sensibilité à l'insuline chez l'animal et l'homme diabétique (de Lemos et coll., 2007 ; de Filippis et coll., 2006). Les effets systémiques de l'exercice sur les facteurs de risques cardiovasculaires associés à l'obésité sont documentés. À cet égard, l'étude *STRIDDE*, portant sur des hommes et des femmes âgés de 40 à 65 ans suivis pendant 8 mois, a démontré que l'exercice à intensité modérée ou élevée, diminue significativement la prévalence du syndrome métabolique. En effet, l'exercice augmente la sensibilité de l'insuline, diminue les concentrations plasmatiques des triglycérides et augmente celles des HDL-c. Ces résultats ont été obtenus parallèlement à une perte de poids, à une réduction du pourcentage de masse grasse corporelle ainsi qu'à une réduction de la circonférence de la taille (Slentz et coll., 2004). Des résultats similaires ont été observés sur des jeunes obèses (Meyer et coll., 2006). D'autres études sur le modèle animal d'obésité ont

rapporté également que la pratique de l'exercice physique permet de diminuer la masse grasse viscérale, la pression artérielle, la résistance à l'insuline, et améliore le profil lipidique (Pinheiro et coll., 2007).

1.3 Effets bénéfiques sur la fonction/dysfonction endothéliale

Plusieurs études expérimentales et cliniques ont mis en évidence que la pratique de l'exercice physique est associée à une amélioration de la fonction endothéliale. De Filippis et coll., (2006) ont démontré que 8 semaines d'exercice aérobie (4fois/semaine, 45min à 70% de la VO₂ max/séance) améliore la relaxation endothélium-dépendante au niveau de l'artère brachiale chez des sujets obèses et insulino-résistants. De même, il a été rapporté que l'exercice physique, pratiqué pendant 3 mois, améliore la dysfonction endothéliale chez des sujets diabétiques type 2, et que cet effet bénéfique persiste jusqu'à 24 mois après l'arrêt du protocole d'entraînement (Okada et coll., 2010). D'autres études expérimentales ont démontré également que l'exercice préserve la fonction endothéliale NO-dépendante dans le modèle du porc hypercholéstolémiant au niveau des artères brachiales (Woodman et coll., 2003), fémorales (Woodman et coll., 2006) ou encore coronaires (Thompson et coll., 2003). De plus, Moein-Afshari et coll., (2008) ont observé que, chez la souris obèse et diabétique de type 2, l'exercice corrige les effets délétères du diabète sur la fonction endothéliale (mesurée au niveau aortique), et ce indépendamment de la réduction du poids.

1.3.1 Mécanisme moléculaire impliqué

- Surexpression de la eNOS

Nous avons déjà évoqué le fait que la dysfonction endothéliale était principalement induite par la réduction de la biodisponibilité du NO. En ce sens, plusieurs études suggèrent que les effets protecteurs de l'exercice sur la dysfonction endothéliale passent soit par une augmentation de production du NO, soit par une diminution de sa dégradation. En effet, il semble que l'exercice physique, à travers l'augmentation des forces de cisaillement, est capable d'activer la voie de l'eNOS. L'effet des forces de cisaillement sur l'activité transcriptionnelle du gène de la eNOS a été démontré pour la première fois par Uematus et ses collaborateurs en 1995. Les auteurs de cette étude ont observé que l'application *in-vitro* de forces de cisaillement à des cellules endothéliales bovines ou humaines en culture augmente le taux d'ARNm de la eNOS. Depuis ces observations, d'autres études sur l'animal et l'humain ont été menées. Parmi celles-ci, on peut citer Laufs et coll., (2005) qui ont démontré que chez la souris, l'exercice physique volontaire augmente l'expression de l'ARNm-eNOS au niveau aortique par rapport aux souris inactives. De même, Hambrecht et coll., (2003) ont confirmé ces résultats chez l'homme, puisqu'ils ont observé que les taux des ARNm-eNOS au niveau de l'artère mammaire interne étaient significativement supérieurs chez des patients coronariens entraînés par rapport aux patients sédentaires. De plus, il a été rapporté que l'élévation de l'expression du gène codant la eNOS était associée à une augmentation de l'expression de la protéine (Hambrecht et coll., 2003 ; Moein-Afshari et coll., 2008). Les forces de cisaillement semblent activer la eNOS via l'activation de l'Akt. Hambrecht et coll., (2003), après avoir mené un programme d'entraînement de 4 semaines chez des patients coronariens, ont observé une augmentation de la forme phosphorylée de l'Akt sur la sérine 473, et de la eNOS sur la sérine 1777 au niveau de l'artère mammaire interne, en comparaison

avec les patients sédentaires. Des résultats similaires ont été rapportés également chez la souris obèse et diabétiques (Moein-Afshari et coll., 2008).

- Diminution de la dégradation du NO

D'autre part, il semble que l'exercice physique stimule les défenses antioxydantes enzymatiques de l'organisme. Par exemple, il a été observé que l'exercice augmente l'expression de la Cu/Zn SOD au niveau aortique et mésentérique dans différents modèles d'animaux avec des facteurs de risques cardiovasculaires. Ainsi, cette augmentation de taux protéiques de la Cu/Zn SOD est accompagnée d'une amélioration de la fonction endothéliale (de Moraes C et coll., 2008 ; Moein-Afshari et coll., 2008 ; Rush et coll., 2003). Toutefois, le rôle antioxydant de l'exercice régulier ne se limite pas à la stimulation des enzymes antioxydantes, mais entraîne également une diminution des enzymes pro-oxydatifs. Duran et coll., (2009) ont ainsi mis en évidence que l'exercice volontaire chez le rat âgé diminue l'expression de la sous-unité cytosolique p67^{phox} de la NADPH oxydase au niveau aortique. De plus, Adams et coll., (2005) ont démontré, chez des patients coronariens, qu'un programme d'exercice pendant 4 semaines induit une diminution significative de l'expression des sous-unités membranaires gp91phox et p22phox de la NADPH oxydase, par rapport aux patients sédentaires.

1.3.2 Autre mécanismes : Système Rénine-Angiotensine (RAS)

L'angiotensine II représente le principal effecteur du RAS, jouant un rôle primordial dans la régulation de la pression artérielle et le tonus des cellules musculaires lisses (Billet Set coll., 2008). En effet, la fixation de l'AgII sur son récepteur AT₁ entraîne une vasoconstriction (Billet Set coll., 2008). Ainsi, l'activation chronique du RAS est impliqué dans de

nombreuses pathologies cardiovasculaires telle que l'hypertension artérielle, l'infarctus de myocarde, les maladies rénales chroniques, l'athérosclérose ou encore le diabète (Billet Set coll., 2008). Il a été rapporté que l'exercice physique peut diminuer de 49% la vasoconstriction de l'artère mammaire en réponse à l'AII (Adams et coll., 2005). Cet effet protecteur de l'exercice a été associé à une diminution de l'expression des récepteurs AT₁ de l'AII. Ainsi, ces observations suggèrent une implication possible de l'AII et de son récepteur AT₁ dans les mécanismes vasculo-protecteurs de l'exercice.

2. Effet des régimes alimentaires sur les facteurs de risque cardiovasculaire :

Observations cliniques et expérimentales

Il est évident que l'objectif principal de la prise en charge nutritionnelle des sujets obèses est la réduction pondérale. Les méthodes vont de la restriction calorique plus ou moins importante à des modifications de la composition de l'apport alimentaire. Ainsi, la restriction calorique représente le moyen le plus utilisé, surtout au début de la prise en charge, dans la lutte contre l'excès de poids et de la masse grasse chez les sujets obèses (Strychar, 2006). De manière générale, la ration calorique dans ce type de régime est calculée en fonction des apports habituels et de l'estimation des dépenses énergétiques, avec une réduction de l'ordre de 25 à 30 % par rapport aux apports antérieurs. Si les régimes restrictifs permettent effectivement d'obtenir une perte de poids sur un temps relativement court, l'approche diététique doit surtout se focaliser sur la modification du comportement alimentaire pour atteindre une alimentation conforme aux recommandations nutritionnelles (PNNS, 2001). Dans cette section, nous citerons les données de la littérature les plus récentes pour souligner les effets bénéfiques des différents régimes alimentaires incluant la restriction calorique et l'adoption de modes alimentaires sains (améliorés au niveau des qualités nutritionnelles) sur

les facteurs de risques cardiovasculaires incluant l'obésité, l'hypertension artérielle, la dyslipidémie, la résistance à l'insuline ainsi que la dysfonction endothéliale.

2.1 Régimes alimentaires et facteurs de risque cardiovasculaire

Il existe plusieurs arguments qui indiquent que la restriction calorique à court et à long terme a des effets bénéfiques sur les facteurs de risque cardiovasculaire associés à l'obésité. A cet égard, Miyaki et coll., (2009) ont démontré qu'une restriction calorique légère (1680 kcal/jour) pendant 12 semaines chez des sujets obèses abaisse la pression artérielle systolique et diastolique, diminue les taux plasmatiques du glucose, des triglycérides et du cholestérol total. Ces résultats ont été obtenus parallèlement à une réduction du poids et de la masse grasse viscérale. De plus, Sasaki et coll., (2002) ont montré qu'une restriction calorique plus sévère (800 kcal/jours), même pendant 2 semaines chez des sujets obèses et hypertendus, améliore la pression artérielle, le profil lipidique et la résistance à l'insuline (mesurée par HOMA-IR). D'autres études sur le modèle animal d'obésité ont démontré que la restriction calorique améliore les composantes clinique du syndrome métabolique cités précédemment (Chou et coll., 2010 ; Ketonen et coll. 2010 ; Rippe et coll., 2010).

D'autre part, il a été démontré qu'un changement global d'habitudes alimentaires permet aussi de ralentir la prévalence de l'obésité et du syndrome métabolique. Actuellement, un nombre croissant de scientifiques s'accordent pour recommander l'adoption d'un régime de type méditerranéen, afin de traiter de façon optimale l'apparition de maladies coronariennes (Kris-Etherton et coll., 2001), mais aussi du syndrome métabolique (Panagiotakos et Polychronopoulos, 2005 ; Aude et coll., 2004). Ce modèle alimentaire inclue une consommation élevée de fruits, de légumes, de légumineuses, de céréales à grains entiers et d'acides gras monoinsaturés ; une consommation modérée de poissons riches en acides gras

oméga-3, de produits laitiers et d'alcool (principalement sous forme de vin); et une faible consommation de viandes rouges et de sucreries (Ferro-Luzzi et coll., 1995 ; Trichopoulou et coll., 1997). Une étude récente a documenté l'impact de ce type de mode alimentaire sur les facteurs de risque de maladies cardiovasculaire chez des patients présentant un syndrome métabolique. Cette intervention a été réalisée sur une période de 24 semaines, durant laquelle les participants devaient augmenter leur consommation quotidienne de fruits, de légumes, de grains entiers et d'huile d'olive (Esposito et coll., 2004). L'adoption d'une alimentation méditerranéenne a permis d'induire une diminution significative des niveaux plasmatiques de glucose (-7.1%), du cholestérol total (-5.5%) et des TG (-10.7%). Une diminution de la pression sanguine (-3.0%) a également été notée, ainsi qu'une augmentation des concentrations plasmatiques de HDL-c (+9.8%) (Esposito et coll., 2004). Cette étude a mis en évidence également une réduction significative du poids corporel (2, 8 kg en moyenne). Ainsi, parmi les sujets soumis à ce type de régime, une régression de 48% de la prévalence du syndrome métabolique a été observée. D'autres études sur le modèle animal d'obésité ont démontré également qu'une modification de l'alimentation suffit à corriger les complications et les facteurs de risque cardiovasculaires installés pendant l'obésité. A cet égard, Roberts et coll., (2005) ont démontré, chez des rats obèses avec un syndrome métabolique, que le changement du mode alimentaire (du régime riche en lipides au régime standard) normalise les valeurs de la pression artérielle, diminue les taux plasmatiques du glucose, du cholestérol total et celui du LDL-c.

2.2 Prise en charge nutritionnelle et dysfonction endothéliale

La restriction calorique améliore la fonction endothéliale des sujets obèses. À ce sujet, Pierce, et coll., (2008) ont rapporté une amélioration de la fonction endothéliale NO-dépendante, mesurée au niveau de l'artère brachiale en réponse à l'acétylcholine, chez des patients obèses ayant suivis un régime alimentaire restrictif (<1200kcal/jour) pendant 12 semaines, et ce indépendamment de leur âge. Des résultats similaires ont été aussi obtenus chez des patients obèses hypertendus (Sasaki et coll., 2002). D'autres études expérimentales ont également démontré que la restriction calorique permet de corriger la dysfonction endothéliale chez des animaux obèses. A cet égard, Ketonen et coll., (2010) ont mis en évidence que la restriction calorique sévère (70% par rapport aux apports antérieurs pendant 50 jours) chez des souris obèses permet de normaliser la fonction endothéliale NO-dépendante, mesurée au niveau de l'aorte en réponse à l'acétylcholine. D'autre part, l'adoption d'un mode alimentaire sain peut aussi améliorer la fonction endothéliale des sujets obèses. Il a été rapporté que l'adoption d'un régime alimentaire méditerranéen améliore davantage la fonction endothéliale chez des sujets en surpoids avec un syndrome métabolique que l'adoption d'un régime alimentaire faible en matières grasses. De même, il a été rapporté également chez le rat obèse que la modification du régime alimentaire restaure et corrige la dysfonction endothéliale NO-dépendante, mesurée sur des segments d'artères mésentériques en réponse à la Carbamylcholine (Naderali et coll., 2004).

2.2.1 Mécanismes biologiques impliqués

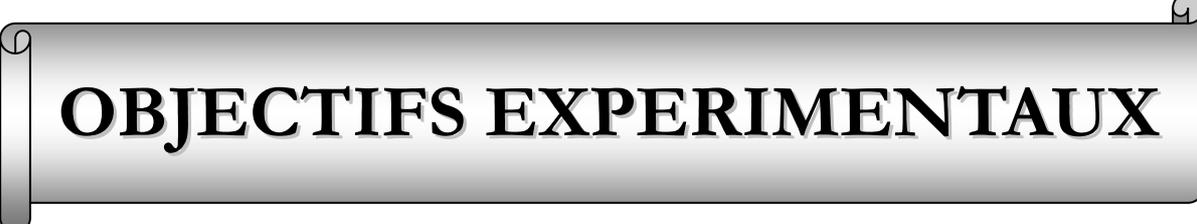
- Production du NO

Plusieurs études ont suggéré que la restriction calorique permet de restaurer la dysfonction endothéliale via une normalisation de la voie de production du NO. En effet, il a été rapporté, chez la souris obèse, que la restriction calorique augmente l'expression du rapport p-eNOS/eNOS total, suggérant une augmentation de l'activité de la eNOS au niveau de l'aorte, en comparaison aux souris obèses sans restriction calorique. De même, Rippe et coll., (2010) ont montré, chez des souris âgées, que la restriction calorique corrige la dysfonction endothéliale, et cet effet bénéfique est associé à une augmentation de l'expression de la eNOS au niveau vasculaire.

- Stress oxydatif

Plusieurs arguments semblent indiquer que la restriction calorique est associée à une diminution du stress oxydatif. À cet égard, Ketonen et coll., (2010) ont observé une diminution de la production d'anions superoxyde au niveau aortique, suite à une restriction calorique de 50 jours chez des souris obèses, comparées à celles n'ayant subi aucune restriction. De plus, il a été rapporté une diminution de l'activité de la NADPH oxydase, accompagnée d'une diminution de l'expression de la sous-unité cytosolique p67phox de la NADPH oxydase, suite à une période de restriction calorique chez les souris âgées. Cette étude a montré également une augmentation de l'activité de la SOD au niveau vasculaire chez les souris ayant subi la restriction calorique par rapport aux témoins. De même, Chou et coll., (2010) ont mis en évidence que la restriction calorique, pendant 2 semaines chez des rats âgés, diminue l'expression des ARNm des sous-unités membranaires p22phox, Nox1, Nox2 et Nox4 au niveau de l'aorte.

Ainsi, l'exercice physique et les régimes alimentaires, notamment restrictifs, permettent de restaurer et de corriger les complications cardiométaboliques souvent associées à l'obésité. Au niveau vasculaire, il semble que l'exercice et/ou la restriction calorique ont un effet anti-athérogène, via un mécanisme stress oxydatif-dépendant. En effet, cette revue de littérature nous a éclairé sur les résultats de ce type d'intervention : elle entraîne une diminution de la production des ROS via une baisse de l'activité de la NADPH oxydase et de l'expression de ses sous-unités cytosoliques et membranaires. Cependant, à notre connaissance, aucune étude n'a déterminé l'impact de ce type d'intervention sur l'activation de la NADPH oxydase, notamment la mesure de la translocation de la p47^{phox}, qui représente le principal acteur dans l'activation de ce complexe enzymatique.



OBJECTIFS EXPERIMENTAUX

1. Les objectifs généraux

La revue de littérature a montré que le mode de vie des pays industrialisés joue un rôle crucial dans l'augmentation de la prévalence de l'obésité et du syndrome métabolique, ainsi que des maladies cardiovasculaires. Ainsi, la modification du style de vie par la promotion de l'activité physique et de l'alimentation saine représente une stratégie efficace pour lutter contre l'émergence de l'obésité et de ses complications cardiovasculaires. Cependant, à notre connaissance, aucune étude ne s'est penchée sur les effets thérapeutiques que l'exercice physique peut avoir sur les maladies cardiométaboliques liées à l'obésité, sans l'associer à une modification de la consommation continue d'un régime alimentaire athérogène. L'originalité de ce projet réside donc dans le fait que, pour la première fois, une étude démontre les effets directs de l'exercice physique dans un contexte de « vie à l'occidentale », aucune restriction calorique n'ayant été imposée.

La présente thèse est divisée en deux parties. Dans un premier temps, notre objectif était d'étudier les effets chez le rat, d'un programme d'exercice physique, combiné ou non à une modification du régime alimentaire (riche en matière grasse puis régime standard), sur les risques cardiométaboliques liés à l'obésité induite préalablement par un régime riche en matière grasse. Nous avons examiné l'impact de ce protocole sur les composantes cliniques du syndrome métabolique incluant l'hypertension artérielle, les dyslipidémies et la résistance à l'insuline. Nous avons émis l'hypothèse que l'exercice seul sans modification de la diète est capable de corriger les facteurs de risque cités ci-dessus.

D'autre part, nous savons que la dysfonction endothéliale représente le premier pas vers les maladies athérosclérotiques, et qu'elle est souvent associée à l'obésité. C'est pourquoi il nous a paru intéressant de nous fixer, comme second objectif, l'étude des mécanismes sous-jacents par lesquels l'exercice et/ou le changement de régime alimentaire corrige la

dysfonction endothéliale, quand elle est associée à l'obésité et au syndrome métabolique. Nous avons émis l'hypothèse que l'exercice et/ou le changement de la diète corrigent la dysfonction endothéliale via un mécanisme stress oxydatif-dépendant. En effet, nous avons supposé que cette intervention est capable de supprimer l'activation de la NADPH oxydase via une inhibition de la translocation de la sous-unité p47^{phox} vers la membrane cellulaire, ainsi que de stimuler les défenses antioxydantes via une augmentation de la SOD1 au niveau cardiovasculaire.

2. Description de notre modèle expérimental

Nous avons opté pour un modèle de rat d'obésité environnementale. L'obésité a été induite par un régime alimentaire riche en lipides (70% de l'énergie totale dont 62% de gras saturé). Ce modèle animal est très utilisé dans la recherche scientifique (Dobrian et coll., 2001), car il présente plusieurs ressemblances avec les caractéristiques physiopathologiques incluant l'obésité abdominale, l'hypertension artérielle, l'insulinorésistance et les dyslipidémies, observées chez l'individu obèse avec un syndrome métabolique.

Plusieurs études ont démontré que les rongeurs nourris à base d'un régime alimentaire contenant plus de 30% des apports énergétiques, sous forme de lipides, développent une obésité accompagnée d'une distribution préférentielle du tissu adipeux au niveau viscéral (Roberts et coll., 2001 ; Kim et coll., 2000 ; Dobrian et coll., 2001). Toutefois, l'obésité n'est pas uniquement un problème de poids, elle est également à l'origine de nombreuses pathologies cardiométaboliques. Il a aussi été rapporté que ce type de régime induit chez le rat une réduction de la sensibilité corporelle totale à l'insuline, accompagnée d'une hyperinsulinémie et d'une hyperglycémie (Kim et coll., 2000). D'autres études ont également mis en évidence une élévation de la pression sanguine et une hyperlipidémie (Dobrian et coll.,

2001 ; Roberts et coll., 2001 ; Kim et coll., 1999). De plus, l'utilisation d'un régime semblable induit une inflammation chronique chez les rongeurs. Finalement, chez des rats normaux, l'utilisation à long terme d'un régime de type High Fat a pour effet de réduire la biodisponibilité du NO (consécutif à un stress oxydatif), et d'induire une dysfonction endothéliale (Roberts et coll., 2000; 2002).



TRAVAUX EXPERIMENTAUX

PREMIÈRE PARTIE : IMPACT DE L'EXERCICE PHYSIQUE SUR LES FACTEURS DE RISQUE CARDIOVASCULAIRE LIÉS AU SYNDROME MÉTABOLIQUE CHEZ LE RAT RENDU OBÈSE PAR UN RÉGIME ENRICHI EN GRAISSES

Exercise reverses metabolic syndrome in high fat diet-induced obese rats

Sabeur Touati, Fayçal Meziri, Sylvie Devaux, Alain Berthelot, Rhian M. Touyz, and Pascal Laurant

Publication acceptée dans *Medecin Science Sport Exercice* (Impact factor 2010 :3.707)

1. But de l'étude

Notre but était d'étudier les effets de l'exercice physique, combiné ou non à une modification du régime alimentaire, sur les risques cardiovasculaires liés au syndrome métabolique incluant l'adiposité viscérale, l'augmentation de la pression artérielle, les dyslipidémies, l'insulinorésistance et la dysfonction endothéliale.

Nous supposons que l'exercice seul, indépendamment de la diète, est capable de corriger et de restaurer les altérations cardiovasculaires et métaboliques induites par notre régime alimentaire riche en matière grasse.

2. Méthode

2.1 Animaux

Rats mâles Sprague-Dawley (âgés de 6 semaines). Les animaux étaient divisés de façon aléatoire en 2 groupes : un groupe nourri avec un régime standard (CD, n=10), et l'autre nourri avec un régime enrichi en graisse (HF, n=40). Après 12 semaines, ce dernier groupe a été ensuite divisé en 4 groupes : HFD-S (sédentaire, n=10), HFD-Ex (exercice, n=10), HF/CD-S (changement du régime HF au régime CD, n=10) et HF/CD-Ex (changement du régime HF au régime CD + exercice, n=10) pendant 12 semaines.

2.2 Le protocole d'exercice

Les animaux dans les groupes exercices ont suivi un programme de course sur tapis roulant 5 fois/semaine ; 60 minutes/jour.

2.3 Le régime alimentaire

-Régime riche en matière grasse : 70% de l'énergie totale provient des lipides

-Régime standard : 10% de l'énergie totale provient des lipides

2.4 Les étapes de l'investigation

-Mesure des paramètres du syndrome métabolique :

- Mesure de l'évolution de la pression artérielle systolique chez l'animal vigile
- Evaluation de la quantité du tissu adipeux viscéral après le sacrifice
- Evaluation de la dyslipidémie par la mesure des concentrations plasmatiques du cholestérol total, LDL-c, HDL-c et des triglycérides

- Evaluation de l'insulinorésistance par la mesure de la glycémie et de l'insulinémie
- Evaluer la fonction endothéliale. Etude *ex-vivo* de la vasorelaxation dépendante et indépendante de l'endothélium, de l'aorte thoracique, en réponse à l'acétylcholine (endothélium- et No-dépendant), à l'insuline (endothélium- et No-dépendant) et au sodium nitroprussiate (endothélium-indépendant).
- Exploration de la voie Akt-eNOS phosphorylée au niveau de l'aorte. Quantification de l'expression des protéines eNOS, p-eNOS sur sérine 1177, Akt et p-Akt sur sérine 473 par western blot.

3. Résultats principaux

3.1 L'exercice physique seul

- Abaisse la pression artérielle systolique
- Améliore le profil lipidique : diminue les concentrations plasmatiques du cholestérol total et des LDL-c, et augmente celles des HDL-c
- Diminue l'insulinémie et la glycémie
- Corrige la dysfonction endothéliale NO-dépendante
- Corrige la résistance à l'insuline au niveau vasculaire
- Améliore la voie Akt/eNOS phosphorylée

3.2 Modification du régime alimentaire seul

- Abaisse partiellement la pression artérielle systolique
- Améliore le profil lipidique : diminue les concentrations plasmatiques du cholestérol total et des LDL-c, et ne modifie pas celles des HDL-c
- Diminue l'insulinémie et la glycémie
- Corrige partiellement la dysfonction endothéliale
- Corrige partiellement la résistance à l'insuline au niveau vasculaire
- Corrige le rapport p-eNOS/eNOS totale

3.3 Association Exercice + changement de la diète

- N'a pas d'effet bénéfique supplémentaire sur les facteurs de risque cardiovasculaires cités ci-dessus, par rapport à l'exercice seul.

Exercise reverses metabolic syndrome in high fat diet-induced obese rats

Sabeur Touati^{1,2}, Fayçal Meziri^{1,2}, Sylvie Devaux³, Alain Berthelot³, Rhian M. Touyz², and Pascal Laurant¹

¹EA4278 “Physiology and Physiopathology of Cardiovascular Adaptations to Exercise”, UFR Sciences, Avignon, France. ²Kidney Research Centre, Ottawa Health Research Institute, University of Ottawa, Canada. ³EA-4267/2SBP, University of Franche-Comté, Besançon, France.

Corresponding author:

Sabeur Touati

EA4278 « Physiologie et physiopathologie des Adaptations cardiovasculaires et à l’Exercice », Pôle Sportif et de Recherche Universitaire, 15 Boulevard Limbert, 84000 Avignon, France

Phone number: +33 (0)490162934

Fax number: +33 (0)490162901

E-mail: sabeur.touati@univ-avignon.fr

Number of words: 6068 (with bibliography and figure legends); Abstract: 250 words

Number of tables and figures: 6

Running title: Exercise reverses metabolic syndrome

Disclosure of funding received for this work from: NIH; Wellcome trust; HHMI; others

ABSTRACT

Purpose: Chronic consumption of high-fat diet induces obesity. We investigated whether exercise would reverse the cardiometabolic disorders associated with obesity without it being necessary to change from a high to normal fat diet. **Methods:** Sprague Dawley rats were placed on a high fat (HFD) or control diet (CD) for 12 weeks. HFD rats were then divided into 4 groups: sedentary high fat diet (HFD-S), exercise trained (motor treadmill for 12 weeks) high fat diet (HFD-Ex), modified diet (high fat to control diet) (HF/CD-S) and exercise trained with modified diet (HF/CD-Ex). Cardiovascular risk parameters associated with metabolic syndrome were measured and contents of aortic Akt, phospho-Akt at Ser (473), total eNOS, and phospho-eNOS at Ser (1177), were determined by Western blotting. **Results:** Chronic consumption of a high fat diet induced a metabolic syndrome. Exercise and dietary modifications reduced adiposity, improved glucose and insulin levels, and plasma lipid profile and exerted antihypertensive effect. Exercise was more effective than dietary modification to improve plasma TBARS levels and to correct the endothelium-dependent relaxation to acetylcholine and insulin. Furthermore, independently of the diet used, exercise increased Akt and eNOS-phosphorylation. **Conclusion:** Metabolic syndrome induced by high fat diet is reversed by exercise and diet modification. It is demonstrated that exercise training induces these beneficial effects without the requirement for dietary modification and these beneficial effects may be mediated by shear stress-induced Akt/eNOS pathway activation. Thus, exercise may be an effective strategy to reverse almost all the atherosclerotic risk factors linked to obesity, particularly in the vasculature.

Keywords: Endothelium, vessel, insulin, hypertension, Akt/eNOS pathway

Introduction

The prevalence of obesity is increasing at an alarming rate in developed and developing countries (14). Obesity is a serious public health problem because it plays a central role in the progression of cardiovascular and metabolic abnormalities, including hypertension, dyslipidemia, and insulin resistance, in the so-called metabolic syndrome, an important predictor of all-cause and cardiovascular mortality (11).

Previous reports present physical inactivity and “westernized” diet as the leading causes of death in the industrialized countries (20, 26). In obese individuals, a low level of physical activity is a better predictor of all-cause mortality than cholesterol levels, smoking status, and blood pressure (39). However, the reported mortality seems to be underestimated given the fact that physical inactivity and inappropriate diet consumption impact mortality at any body mass index (3). It is well recognized that inappropriate diet and inactivity are important determinant of cardiovascular diseases and other chronic disorders. Evidence from numerous epidemiological studies indicates that national recommendation for physical activity, diet, and combined diet and exercise interventions prevent progression of cardiovascular diseases and associated risk factors (26). In the industrialized countries, it is obviously recommended to change diet rich in saturated fat in order to prevent cardiovascular morbidity and mortality in obesity and metabolic syndrome. However, eating behavior is generally depending on socio-economic status and educational level of people. Consequently, it would be uncertain to succeed in changing diet habit. Given the ineffectiveness of popular weight-loss diets (19), adoption of a healthy lifestyle seems more appropriate. Increased energy expenditure by physical activity would be an important strategy to reverse existing cardiovascular diseases and associated risks factors linked to obesity. In most clinical investigations, however, training rehabilitation of obese patients with cardiovascular risks factors is often associated with lifestyle changes (modified diet, smoking cessation, etc...)

(27) and/or medications (37), and it is difficult to discern the direct therapeutic contribution of exercise alone.

High fat intake contributes to the development of metabolic syndrome in animal model. Rodents that are fed a high-fat diet develop visceral obesity, insulin resistance, hyperlipidemia, endothelial dysfunction and hypertension (17,28). Several experimental studies have documented the preventive effect of exercise in animal model before the installation of obesity/metabolic syndrome (1,10). However, the contribution of exercise to reverse the existing cardiovascular risks linked to unhealthy diet (high in saturated fat) have not been adequately investigated in obese rats. Using the experimental model of high fat-induced obesity, the present study was designed to examine the effect of exercise and/or normal fat diet on existing cardio-metabolic complications linked to obesity including hyperlipidemia, insulin resistance, endothelial dysfunction and hypertension. We hypothesized that exercise training alone was able to reverse obesity-associated cardiometabolic abnormalities, without it being necessary to switch from high fat to normal fat diet.

MATERIALS AND METHODS

Animals. Male Sprague-Dawley rats (6 weeks old), were purchased from Elevage Janvier (Le Genest-Saint-Isle, France). Animals were kept under a 12h-12h light: dark cycle and allowed free access to food (SAFE, Augy, France) and water. The housing and care of the animals and all experimental procedures were approved by the local Institutional Animal Committee and were conducted in accordance with the policy statement of the American College of Sports Medicine on research with experimental animals.

Experimental design. After one week of acclimatization, rats were pair-fed with either a control diet (CD; 12.15 KJ/g, energy content in %: protein 23, carbohydrate 67, fat 10) or high fat diet (HFD; 24 KJ/g, energy content: protein 12, carbohydrate 18, fat 70 including 8 from soya oil and 62 saturated fat from lard) for 12 weeks. This high fat diet enriched in saturated fat and combined with moderate-to-low carbohydrate content has been previously used as an obesogenic (causing high adiposity) and a diabetogenic (inducing insulin resistance) food in rats (32). HFD rats were then randomly divided into 4 groups: sedentary rats fed with the high fat diet (HFD-S), exercise trained rats fed with the high fat diet (HFD-Ex), sedentary rats switched to the CD (HF/CD-S) and exercise trained rats switched to the CD diet (HF/CD-Ex). After 24 weeks of the experiments, unfasted rats were anesthetized with an intraperitoneal injection of pentobarbital sodium (60mg/kg). To avoid acute effects of exercise, they were sacrificed 48h after the last training. Blood samples were collected from abdominal aorta into heparin or EDTA tubes. The plasma was immediately separated by centrifugation at 3000g for 10 min and kept frozen at -80°C until chemical assays. The heart, epididymal and retroperitoneal fat pads were excised and weighed. Aorta was also excised, cleaned of adherent tissue and kept at -80°C.

Exercise protocol. The exercise training protocol was adapted from a previously published procedure (5). Briefly, rats in the exercise groups were trained on a motor treadmill (Columbus Instruments, Columbus OH, USA) at the speed of 12 m/min for 20 min on the first day. Running time was extended by 10 min/day, to 60 min/day. The running speed was increased 3 m/min every 2 weeks until the speed reached 27 m/min at the end of the training protocol. These rats were trained 5 days/week for 12 weeks. All training sessions took place during the afternoon (2:00–5:00 p.m.).

Blood Pressure. Systolic blood pressure (SBP) was measured every 2 weeks in conscious rats by the indirect plethysmographic tail-cuff method using an automatic BP monitoring system (BP 2000, Visitech System, Apex NC, USA).

Skeletal muscle oxidative enzyme activity. The exercise training effect is commonly confirmed by an increase in muscular citrate synthase activity (33). Enzyme activity was measured on homogenized soleus muscle samples by spectrophotometric method as previously described (35).

Blood chemistry assay. Plasma insulin was measured by radioimmunoassay (RI-13K, Linco-Research, St Charles, MO, USA). Plasma level of total cholesterol (TC), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), triglyceride and glucose were measured by colorimetric enzymatic assays (Cobas Integra automated analyzer, Roche, Meylan, France). Low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and atherogenic index (AI) were respectively calculated as follows: $LDL-C = TC - (HDL-C) - (Triglycerides/2.2)$, $AI = (TC - HDL-C)/HDL-C$. Plasma levels of thiobarbituric acid-reacting substances (TBARS) were measured by a colorimetric method. Briefly, plasma was mixed with 2% butylated hydroxytoluene and quintanilla reagent (26 mmol/l of thiobarbituric acid and 15% trichloroacetic acid). The mixture reaction was boiled for 15 minutes. Thereafter, the reaction mixture was cooled and centrifuged at 3000g for 10 minutes. The soluble phase was measured with a spectrophotometer at a wavelength of 535 nm. In parallel, malondialdehyde standards were diluted in the range of 0 to 4 $\mu\text{mol/l}$. TBARS values were expressed in nanomoles per milliliter of malondialdehyde equivalents.

Western Blot analysis. Proteins from aorta were extracted from frozen tissue as previously described (38). Tissues were homogenized in lysis buffer [50 mmol/l Tris/HCl (pH 7.4), 1% Nonidet P40, 0.5% Sodium deoxycholate, 1% SDS, 2 mmol/l Na_3VO_4 , 1 mmol/l PMSF, 1 $\mu\text{mol/l}$ pepstatin A, 1 $\mu\text{mol/l}$ leupeptin, 1 $\mu\text{mol/l}$ aprotinin] and the protein supernatant was

separated by centrifugation. Proteins were separated by electrophoresis on a 10% polyacrylamide gel and transferred onto a nitrocellulose membrane. Nonspecific binding sites were blocked with 5% skim milk in Tris-buffered saline solution with Tween for 1 hour at room temperature. Membranes were then incubated with primary antibodies overnight at 4°C: rabbit polyclonal antibodies directed against p-eNOS (Ser1177) diluted 1:200 (Santa Cruz Biotechnology), against total eNOS diluted 1:200 (Santa Cruz Biotechnology), mouse monoclonal antibodies directed against p-Akt (Ser473) diluted 1:1000 (Cell signaling), against total Akt diluted 1:1000 (Cell signaling), After three washes in TPBS, membranes were incubated with secondary antibodies for 1 h at room temperature and washed three times in TPBS. Signals were revealed by chemiluminescence, visualized autoradiographically and subsequently membranes were stripped (Pierce Biotechnology) and reprobred with GAPDH antibodies (Chemicon International), which were used as internal controls. Optical density of bands was quantified densitometrically after scanning (Epson Perfection 4990 scanner, Epson America Inc. CA) Image-Quant software (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA).

Evaluation of the vasorelaxant responses of isolated aorta. After sacrifice, the descending thoracic aorta was rapidly dissected, cleaned from loose connective tissue in the adventitia and immersed in Krebs solution composed of (mM): NaCl 118, KCl 4.7, NaHCO₃ 25, CaCl₂ 2.5, MgSO₄ 1.2, KH₂PO₄ 1.2 and glucose 11; bubbled with a mixture of 95% O₂ and 5% CO₂ at pH of 7.4. Three aortic rings (2-3mm long) per rat were studied in parallel (one for each drug studied as described below). The rings were then suspended horizontally between two L-shaped stainless steel hooks in organ chambers which contained 10 ml of Krebs maintained at 37°C. Isometric tension was measured using a force displacement transducer (Emka Technologies, Falls Church, VA, USA) connected to the upper hook. During an equilibration period of 60 min, aortic rings were progressively stretched to their optimal passive tension (2g) as assessed by the response to 100 mmol KCl. The rings were then exposed to

norepinephrine (10^{-7} mol). Endothelial integrity was confirmed before the experiment by testing relaxation induced by acetylcholine (10^{-6} mol) under norepinephrine (10^{-7} mol) pre-contracted conditions. After this procedure, the rings were washed and allowed to re-equilibrate to baseline tension for 60 min. Endothelium-dependent relaxation was assessed by cumulative concentration–response curves to acetylcholine (10^{-10} to 10^{-3} mol) or insulin (10^{-1} to 10^4 mU/ml). Endothelium-independent relaxation was evaluated by cumulative concentration–response curves to sodium nitroprusside (10^{-10} to 10^{-5} mol).

Drugs. Norepinephrine, Acetylcholine hydrochloride and sodium nitroprusside were purchased from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France). Human insulin (Actrapid; 100 U/ml) was obtained from Novo Nordisk (Paris, France). Drugs were dissolved in distilled water. Norepinephrine, Acetylcholine hydrochloride and sodium nitroprusside concentrations were expressed as final molar concentrations and insulin as mU/ml in the organ bath.

Statistical analysis. All values are expressed as mean \pm SEM. Statistical comparisons between groups were made by analysis of variance (ANOVA) and each group was compared with the others using Fisher's protected least significant difference (PLSD) test. Significance was considered present when probability values were <0.05 .

RESULTS

Biometrical data

A high fat diet significantly increased body weight of the HFD-S rats compared to the CD-S rats ($p<0.001$; Table 1). Exercise and diet modification were both beneficial in reducing body weight. No significant difference was observed in final body weight between the CD-S, HF/CD-S, HFD-Ex and HF/CD-Ex groups. The retroperitoneal and epididymal fat pad mass

were also significantly greater in the HFD-S rats compared to the CD-S ($p < 0.001$; Table 1). Exercise and low fat diet were both beneficial in reducing the body fat depot. Furthermore, the combination of exercise and diet modification (HF/CD-Ex) had a significantly greater effect than either strategy had individually (Table 1). The heart mass was significantly higher in the HFD-S compared to CD-S rats ($p < 0.05$; Table 1). There was no difference between the heart mass among the CD-S, HF/CD-S, HFD-Ex and HF/CD-Ex groups. The heart mass to body mass ratio was significantly increased in the trained rats (HFD-Ex and HF/CD-Ex) compared to the HFD-S rats ($p < 0.05$; Table 1). No significant difference was seen between the CD-S, HF/CD-S, HFD-Ex and HF/CD-Ex groups.

Blood pressure

High fat diet significantly increased systolic blood pressure in the HFD-S rats. Twelve weeks of physical exercise significantly and progressively decreased systolic blood pressure in both the HFD-Ex and HF/CD-Ex rats as compared to the HFD-S rats ($p < 0.001$; Fig.1). The fall in blood pressure was similar between the two trained groups. While modifying the high fat diet to normal diet also significantly decreased blood pressure, the lowering effect was less pronounced than that obtained after exercise training ($p < 0.05$; Fig.1).

Citrate synthase activity

Effectiveness of exercise was determined by evaluating citrate synthase activity. As expected, exercise training significantly increased the citrate synthase activity of the soleus muscles in the HFD-Ex and HF/CD-Ex groups, as compared to the sedentary groups ($p < 0.05$; Table 1). The data suggests that the training exercise program used was efficient because an increased citrate synthase activity indicates an improved oxidative metabolism in muscle. A high fat diet or dietary changes did not affect the muscular citrate synthase activity.

Lipid profile

Plasma total cholesterol and LDL-Cholesterol concentrations were greater in the HFD-S than in the CD-S rats ($p < 0.01$; Fig.2). Exercise and modified high-fat-to-normal diet lowered and “normalized” the plasma total cholesterol and LDL-cholesterol levels. However, plasma total cholesterol and LDL-cholesterol concentrations were significantly more diminished in the HF/CD-Ex than in the HFD-Ex and HF/CD-S rats ($p < 0.05$). The plasma HDL-cholesterol level was not changed by the high fat diet. It was significantly greater in the trained groups (HFD-Ex and HF/CD-Ex) than in the sedentary groups (CD-S, HFD-S and HF/CD-S; $p < 0.05$) (Fig.2). However, the modified high-fat-to-normal diet did not alter the HDL-cholesterol concentration indicating that change in HDL-cholesterol was mainly due to exercise effects. The plasma triglyceride concentration was not significantly different among the five groups (Fig.2). As expected, the atherogenic index was significantly higher in the HFD-S group than in the CD-S groups ($p < 0.01$; Fig.2). Exercise and modified high-fat-to-normal diet significantly decreased and “normalized” the atherogenic index ($p < 0.05$). However, it was notably observed that the index was significantly less in the HF/CD-Ex than in the CD-S rats ($p < 0.05$).

Plasma insulin and glucose levels

The plasma insulin and glucose levels were significantly higher in the HFD-S than in the CD-S rats ($p < 0.01$; Fig.3). Exercise and modified high-fat-to-normal diet improved and corrected plasma insulin and glucose levels. No significant difference was observed between the CD-S, HF/CD-S, HFD-Ex and HF/CD-Ex rats.

Plasma TBARS

The plasma TBARS levels were significantly greater in the HFD-S compared to the CD-S rats ($p < 0.05$; Fig.3). Exercise significantly decreased the TBARS in both the HFD-Ex and HF/CD-Ex rats as compared to the HFD-S rats ($p < 0.05$). The modified high-fat-to-normal diet, however, did not significantly improve the plasma TBARS levels.

Concentration response-curves to acetylcholine, insulin and sodium nitroprusside

The endothelium-dependent vasorelaxation induced by acetylcholine was significantly attenuated in the aorta from the HFD-S rats in comparison to the response obtained in the aorta from the CD-S rats. The maximal relaxation to acetylcholine was significantly attenuated in the HFD-S than the CD-S rats (72 ± 2 versus $91 \pm 2\%$, $p < 0.001$) (Fig.4).

Exercise and dietary change to normal diet restored the endothelium-dependent relaxation to acetylcholine. However, the relaxation response was superior in the aorta from the exercise training rats (HFD-Ex and HF/CD-Ex) as compared to the response obtained in those from the HF/CD-S rats (Fig. 4). The endothelium-dependent vasorelaxation induced by insulin was also markedly impaired in the aorta from HFD-S rats in comparison to the relaxant response obtained in the aorta from the CD-S rats. At maximal insulin concentration, the aorta relaxed less in the HFD-S than the CD-S rats (26 ± 1 versus $51.5 \pm 1\%$, $p < 0.001$) (Fig.4). Exercise restored the endothelium-dependent relaxation to insulin in aorta from both groups of exercised rats (HFD-Ex and HF/CD-Ex) (Fig.4). While the modified high-fat-to-normal diet also significantly improved the vasorelaxation to insulin, it was not completely restored to the control level as was seen in the exercise trained treatment groups. Plasma insulin was inversely correlated with the maximal vasorelaxant response to insulin ($r = -0.49$, $p < 0.01$) (Fig.4). The endothelium-independent vasorelaxation to sodium nitroprusside was similar between all treatment groups (Fig.4).

eNOS and Akt phosphorylation and expression

Total eNOS protein expression in aorta was similar among all groups (Fig.5). The phosphorylation of eNOS, the ratio of phospho-eNOS to total eNOS was significantly lower in aorta from the HFD-S rats compared to the control rats ($p<0.05$). Exercise was more effective than dietary modification to increase the phosphorylation of eNOS in the HFD-Ex and HF/CD-Ex groups. Total Akt protein expression in aorta was also similar among all groups (Fig.5). The phosphorylation of Akt, the ratio of phospho-Akt to total Akt was significantly greater in aorta from the exercised groups as compared to the sedentary groups ($p<0.05$). High fat diet or dietary modification did not significantly affect the phosphorylation of Akt.

DISCUSSION

Chronic consumption of a high fat diet in rats induced metabolic syndrome as evidenced by visceral obesity, hyperglycemia, dyslipidemia, endothelial dysfunction and hypertension. The major finding of the present study is that exercise improved all of these features of metabolic disease without necessarily switching to a normal caloric diet.

Metabolic syndrome is strongly linked to the development of coronary heart diseases and stroke mainly through an increased risk of insulin resistance and other abnormalities including atherogenic dyslipidemia and high blood pressure (11). Most experimental studies report that a high fat diet increases body fat accumulation, induces obesity and insulin resistance in rodents (16,17). As expected, we showed that a high fat diet significantly increased body weight and visceral obesity. Exercise and switching to a normal caloric diet were both beneficial in reducing high fat diet-induced obesity and body fat accumulation in rats. Our experimental findings are in agreement with those from clinical studies since daily

exercise, even in the absence of reduced caloric intake, is associated with reduction in total and visceral obesity in overweight subjects (34). Ross et al. (2000) (29) have previously demonstrated that an exercise regimen, designed to increase energy expenditure by the same number kilocalories as the diet intervention decreased energy consumption (ie, 700 kcal/d), induced identical weight loss. However, in that study, the exercise group lost significantly more fat mass than the diet group. In our study, loss of visceral adipose tissue was not significantly different between exercised and control diet-switched rats probably because the amount of kilocalories expended by exercised rats was less than the energy consumed by the control diet-switched rats. The combination of both exercise and diet modification for 12 weeks had greater effects on body weight and visceral adipose tissue reduction in rats than either treatment alone. Exercise favours a reduction in visceral fat, probably by initiating lipolysis through catecholamines (7). Since visceral adipose tissue accumulation is positively correlated with cardiovascular disease-induced metabolic disorders, our experimental findings strongly support the benefit of exercise as a means of reducing visceral adiposity and thus cardiovascular risk.

Visceral obesity has been postulated to be at the core of the metabolic derangements and directly responsible for the atherogenic dyslipidemia associated with the metabolic syndrome. Our findings show that high fat diet was effective at increasing plasma total cholesterol and LDL-cholesterol levels and, ultimately, the atherogenic index in comparison to the control rats. It is well established that an increase in plasma cholesterol, particularly associated with LDL, elevates the risk of developing atherosclerosis and dramatic clinical events such as acute myocardial infarction and stroke. Furthermore, lowering plasma cholesterol can retard/reverse the progression of atherosclerosis and prevent cardiovascular events (24). Previous studies have shown that physical training and caloric restriction are effective at improving lipid profiles in both humans (30) and animals (28). Several possible

mechanisms of exercise-induced atheroprotective effects have been proposed such as increased HDL-cholesterol, decreased total cholesterol, and decreased oxidized LDL-cholesterol levels (12). In the present study, endurance exercise and/or switching from the high fat to the normal diet improved lipid profiles by lowering the atherogenic plasma levels of total and LDL-cholesterol. However, the marked change in lipid profile observed concerned the plasma levels of the anti-atherogenic HDL-cholesterol. They were only significantly increased in both the exercise trained groups of rat (independently of the diet used) and not in the sedentary rats which were switched from the high fat to the control diet. Consequently, the atherogenic index was less in the exercise trained than in the rats with modified diet. Concerning plasma triglycerides, studies have also shown that they are strongly correlated with the prevalence and incidence of metabolic syndrome and cardiovascular diseases (11). In our experiments, the metabolic syndrome induced by high fat diet consumption did not induce change in the plasma triglyceride levels, despite hyperinsulinemia and hyperglycemia. Several experimental studies observed hypersinsulinemia/hypertriglyceridemia when rats were placed with a combined high fat (or low fat)/refined carbohydrate diet, suggesting that high plasma level of triglycerides may be due to the use of refined carbohydrates in the diet, and not fat (2,28).

We have shown elsewhere that rats fed with a high fat diet have hyperinsulinemia and hyperglycemia (17). Insulin resistance is a common occurrence in obesity, type 2 diabetes, dyslipidemia and hypertension (18) and there is some experimental evidence indicating that insulin resistance and hyperinsulinemia precede the development of obesity and other metabolic syndrome factors (2). The insulin resistance of obese rats fed with a high fat diet was shown by a markedly impaired aortic vasorelaxant response to insulin, suggesting a reduced sensitivity to the vascular and metabolic actions of insulin. In the present study, exercise, diet modification, and the combination of both, similarly corrected plasma glucose

and insulin levels. Moreover, in regard to the vasorelaxant response to insulin, we showed that the cellular action of insulin remained markedly altered in the sedentary rats which were switched from the high fat to the control diet in comparison to the other two groups of trained rats fed either with the high fat or control diet. All these findings confirm that aerobic exercise is an important independent approach to prevent insulin resistance.

Hypertension, a major cardiovascular risk factor, is closely associated with obesity (8). As expected, the present study confirms that rats chronically receiving a high fat diet developed a high systolic blood pressure. Furthermore, obese rats fed with a high fat diet exhibited endothelial dysfunction, evidenced by impaired acetylcholine- and endothelial NO-dependent vasorelaxation of aorta, as well as a marked oxidative stress, verified by elevated plasma TBARS levels. These findings are in agreement with others clinical and experimental data (23,25). These observations propose a key role for dietary high-fat content in the development of endothelial dysfunction in obesity. Indeed, several other cardiovascular risk factors such as dyslipidemia, hyperinsulinemia and hypertension are also strongly associated with endothelial dysfunction (36). It is now established that endothelial dysfunction and reactive oxygen species play a pathologic key role in the development of atherosclerosis and predisposes subjects to the development of atherosclerotic lesions (6). All these findings confirm that obesity-associated metabolic disorders contribute to altered cardiovascular and endothelial function, to create an atherosclerotic-prone environment and thereby the development of cardiovascular diseases.

Subjecting obese rats to exercise training and/or switching from a high fat to a control diet lowered systolic blood pressure levels. These findings confirm previous studies demonstrating that diet modification (normal fat diet) (28) and regular exercise training reduce and even prevent hypertension (22). We have noted elsewhere that a decrease in blood pressure is more effective in trained rats (with or without diet modification) than in sedentary

rats with modified diet. Among the different mechanisms implicated in the effects of exercise and/or caloric restriction on blood pressure, is improvement of endothelial function. In our study, exercise with or without diet modification not only restored, but increased the endothelium- and NO-dependent aortic relaxant response to acetylcholine, while switching from a high fat to a control diet in sedentary rats improved, but did not completely normalize it. Similarly plasma TBARS levels were more diminished in training rats independently of diet used than in sedentary rats with modified diet. Taken together, these findings indicate that exercise was more effective at reversing endothelial dysfunction and oxidative stress than conversion to a normal caloric diet. Exact mechanisms underlying the differential effects of exercise and/or diet modification remains unclear but changes in oxidative state may be important. Oxidative stress promotes inactivation and sequestration of NO through the formation of reactive nitrogen species such as peroxynitrite, thereby decreasing endothelium-dependent relaxation via a reduction in NO bioavailability. Exercise and diet modification both ameliorate endothelial dysfunction by increasing expression and activity of eNOS, NO generation, and modulating ROS production, leading to reversal of hypertension and risk factors of the metabolic syndrome (28,31). Beneficial effects of diet modification and endothelial function may relate to improved insulin resistance and/or hyperlipidemia since each of these conditions has been associated with endothelial dysfunction and increased oxidative stress (4). Concerning the beneficial effect of exercise, a possible mechanism may be a powerful stimulus to increase blood flow and shear stress in vascular beds which, in turn, increases Akt/eNOS expression and/or activity leading to increased vascular NO production and NO bioavailability (9,13), as well as decreased blood pressure levels (15). In the present study, training did not modify the vascular Akt and eNOS protein expressions. However, training (independently of diets used) increased Akt phosphorylation at Ser⁴⁷³ and eNOS phosphorylation at Ser¹¹⁷⁷, indicating that exercise exerts a stimulating effect by activation of the Akt/eNOS pathway. Our results are in accordance with a previous clinical study (13),

which demonstrated that exercise improves vascular function through Akt-dependent eNOS phosphorylation at Ser¹¹⁷⁷ in patients with coronary artery disease. All these findings confirm that aerobic exercise, by stimulating vascular shear stress, induced Akt/eNOS pathway activations leading to increase NO production, improve endothelial-dependent relaxation and lower blood pressure. Akt/eNOS pathway is also implicated in the vascular response to insulin. In effect, insulin activates the insulin receptor (IR) tyrosine kinase, leading to tyrosine phosphorylation of IR substrate (IRS)-1, which binds and activates phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K). PI3K leads to the phosphorylation and activation of phosphoinositide-Dependent Kinase-1 (PDK-1), which in turn phosphorylates and activates Akt at serine⁴⁷³. Akt directly activates eNOS via phosphorylation at serine¹¹⁷⁷, leading to increased blood flow (21,40). Since, the eNOS phosphorylation at Ser¹¹⁷⁷ was improved in rats fed with a modified normal diet, it is suggested that diet modification can also correct insulin resistance by a cellular mechanism which imply PI3 kinase/eNOS pathway activation.

Our findings clearly demonstrated that exercise training seems a more effective strategy than diet modification to reverse almost all of the atherosclerotic risks factors associated with metabolic syndrome, particularly in the vasculature. Interestingly, in comparison to exercise alone, exercise combined with diet modification did not induce further beneficial effects on metabolic and cardiovascular parameters, which were mostly corrected in the rats with exercise alone. This could not be due to a difference in food intake, because rats were pair-fed throughout the experimental protocol. It is possible that over the 12 weeks, the correction of metabolic disorders occurred at different times between the trained and trained/modified diet groups, and that the majority of the corrections arose even before the 12th week. The present study however, reveals data only after the 12th week of experimental exercise and/or diet protocol. Further studies are needed to verify the actual recovery time-course of the metabolic and endothelium functions induced by the different treatment

programs. In conclusion, exercise reverses the metabolic syndrome induced by a high fat diet in rats without the requirement for dietary modification. It is suggested that exercise may be a potential non-pharmacological treatment for multiple simultaneous cardiovascular risk factors.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr Isabelle Jallat-Dalloz for excellent technical assistance. Results of the present study do not constitute endorsement by ACSM.

CONFLICT OF INTEREST

The other authors report no conflicts.

REFERENCES

- Arvola P, Wu X, Kähönen M, Mäkynen H, Riutta A, Mucha I, Solakivi T, Kainulainen H, Pörsti I. Exercise enhances vasorelaxation in experimental obesity associated hypertension. *Cardiovasc Res.* 1999; 43:992-1002.
- Barnard RJ, Roberts CK, Varon SM, Berger JJ. Diet-induced insulin resistance precedes other aspects of the metabolic syndrome. *J Appl Physiol.* 1998;84:1311-1315.
- Blair SN, Kohl HW, Barlow CE, Paffenbarger RS, Gibbons LW, Macera CA. Changes in physical fitness and all-cause mortality. A prospective study of healthy and unhealthy men. *JAMA.* 1995;273:1093-1098.
- Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res.* 2000;87:840-844.
- Chen HI, Chiang IP, Jen CJ. Exercise training increases acetylcholine-stimulated endothelium-derived nitric oxide release in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Biomedical Science.* 1996;3:454-460.
- Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation.* 2004;109(23Suppl 1):III27-32.
- De Glisezinski I, Crampes F, Harant I, Berlan M, Hejnova J, Langin D, Rivière D, Stich V. Endurance training changes in lipolytic responsiveness of obese adipose tissue. *Am J Physiol.* 1998;275:E951-956.
- Eckel RH. Obesity and heart disease: a statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee, American Heart Association. *Circulation.* 1997;96:3248-3250.
- Franzoni F, Ghiadoni L, Galetta F, Plantinga Y, Lubrano V, Huang Y, Salvetti G, Regoli F, Taddei S, Santoro G, Salvetti A. Physical activity, plasma antioxidant capacity, and endothelium-dependent vasodilation in young and older men. *Am J Hypertens.* 2005;18:510-516.
- Frisbee JC, Samora JB, Peterson J, Bryner R. Exercise training blunts microvascular rarefaction in the metabolic syndrome. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006;291:H2483-2492.

Gami AS, Witt BJ, Howard DE, Erwin PJ, Gami LA, Somers VK, Montori VM. Metabolic syndrome and risk of incident cardiovascular events and death: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *J Am Coll Cardiol.* 2007;49:403-414.

Halverstadt A, Phares DA, Wilund KR, Goldberg AP, Hagberg JM. Endurance exercise training raises high-density lipoprotein cholesterol and lowers small low-density lipoprotein and very low-density lipoprotein independent of body fat phenotypes in older men and women. *Metabolism.* 2007;56:444-450.

Hambrecht R, Adams V, Erbs S, Linke A, Kränkel N, Shu Y, Baither Y, Gielen S, Thiele H, Gummert JF, Mohr FW, Schuler G. Regular physical activity improves endothelial function in patients with coronary artery disease by increasing phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation.* 2003;107:3152-3158.

Haslam D, James P. Obesity. *Lancet.* 2005;366:1197-1209.

Ishikawa K, Ohta T, Zhang J, Hashimoto S, Tanaka H. Influence of age and gender on exercise training-induced blood pressure reduction in systemic hypertension. *Am J Cardiol.* 1999;84:192-196.

Jun HS, Hwang K, Kim Y, Park T. High-fat diet alters PP2A, TC10, and CIP4 expression in visceral adipose tissue of rats. *Obesity.* 2008;16:1226-1231.

Kim JY, Nolte LA, Hansen PA, Han DH, Ferguson K, Thompson PA, Holloszy JO. High-fat diet-induced muscle insulin resistance: relationship to visceral fat mass. *Am J Physiol.* 2000;279:R2057-2065.

Lind L, Berne C, Lithell H. Prevalence of insulin resistance in essential hypertension. *J Hypertens.* 1995; 13(Pt 1):1457-1462.

Miller WC. How effective are traditional dietary and exercise interventions for weight loss. *Med Sci Sport Exerc.* 1999;31:1129-1134.

Mokdad AH, Marks JS, Stroup DF, Gerberding JL. Actual causes of death in the United States, 2000. *JAMA.* 2004; 291:1238-1245.

Montagnani M, Ravichandran LV, Chen H, Esposito DL, Quon MJ. Insulin receptor substrate-1 and phosphoinositide-dependent kinase-1 are required for insulin-stimulated production of nitric oxide in endothelial cells. *Mol Endocrinol.* 2002;16:1931-1942.

- Pinheiro AR, Cunha AR, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Beneficial effects of physical exercise on hypertension and cardiovascular adverse remodeling of diet-induced obese rats. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2007;17:365-375.
- Plotnick GD, Corretti MC, Vogel RA. Effect of antioxidant vitamins on the transient impairment of endothelium-dependent brachial artery vasoactivity following a single high-fat meal. *JAMA.* 1997;278: 1682-1686.
- Rackley CE. Cardiovascular basis for cholesterol therapy. *Cardiol Rev.* 2000;8:124-131.
- Roberts CK, Barnard RJ, Sindhu RK, Jurczak M, Ehdaie A, Vaziri ND. A high-fat, refined-carbohydrate diet induces endothelial dysfunction and oxidant/antioxidant imbalance and depresses NOS protein expression. *J Appl Physiol.* 2005;98:203-210.
- Roberts CK, Barnard RJ. Effects of exercise and diet on chronic disease. *J Appl Physiol.* 2005;98:3-30.
- Roberts CK, Ng C, Hama S, Eliseo AJ, Barnard RJ. Effect of a short-term diet and exercise intervention on inflammatory/anti-inflammatory properties of HDL in overweight/obese men with cardiovascular risk factors. *J Appl Physiol.* 2006;101:1727-1732.
- Roberts CK, Vaziri ND, Liang KH, Barnard RJ. Reversibility of chronic experimental syndrome X by diet modification. *Hypertension.* 2001;37:1323-1328.
- Ross R, Dagnone D, Jones P, Smith H, Paddaqs A, Hudson R, Janssen I. Reduction in obesity and related comorbid conditions after diet-induced weight loss or exercise-induced weight loss in men. *Ann Intern Med.* 2000;133:92-103.
- Savage PD, Brochu M, Poehlman ET, Ades PA. Reduction in obesity and coronary risk factors after high caloric exercise training in overweight coronary patients. *Am Heart J.* 2003;146:317-323.
- Sciacqua A, Candigliota M, Ceravolo R, Scozzafava A, Sinopoli F, Corsonello A, Sesti G, Perticone F. Weight loss in combination with physical activity improves endothelial dysfunction in human obesity. *Diabetes Care.* 2003;26:1673-1678.
- Sinitskaya N, Gourmelen S, Schuster-Klein C, Guardiola-Lemaitre B, Pévet P, Challet E. Increasing the fat-to-carbohydrate ratio in a high-fat diet prevents the development of obesity but not a prediabetic state in rats. *Clin Sci.* 2007;113:417-425.

- Siu M, Donley DA, Bryner RW, Alway SE. Citrate synthase expression and enzyme activity after endurance training in cardiac and skeletal muscles. *J Appl Physiol*. 2003;94:555-60.
- Slentz CA, Duscha BD, Johnson JL, Ketchum K, Aiken LB, Samsa GP, Houmard JA, Bales CW, Kraus WE. Effects of the amount of exercise on body weight, body composition, and measures of central obesity. STRRIDE – a randomized controlled study. *Arch Intern Med*. 2004;164:31-39.
- Srere, PA. Citrate synthase. *Methods in Enzymology*. 1969;13:3-5.
- Steinberg HO, Chaker H, Leaming R, Johnson A, Brechtel G, Baron AD. Obesity/insulin resistance is associated with endothelial dysfunction. Implications for the syndrome of insulin resistance. *J Clin Invest*. 1996;97:2601-2610.
- Tjønnå AE, Lee SJ, Rognum Ø, Stølen TO, Bye A, Haram PM, Loennechen JP, Al-Share QY, Skogvoll E, Slørdahl SA, Kemi OJ, Najjar SM, Wisløff U. Aerobic interval training versus continuous moderate exercise as a treatment for the metabolic syndrome: a pilot study. *Circulation*. 2008;118:346-354.
- Touyz RM, Yao GJ. Inhibitors of Na⁺/Mg²⁺ exchange activity attenuate the development of hypertension in angiotensin II-induced hypertensive rats. *J Hypertension*. 2003;21:337-344.
- Wei M, Kampert JB, Barlow CE, Nichaman MZ, Gibbons LW, Paffenbarger RS Jr, Blair SN. Relationship between low cardiorespiratory fitness and mortality in normal-weight, overweight, and obese men. *JAMA*. 1999;282:1547-1553.
- Zeng GY, Nystrom FH, Ravichandran LV, Cong LN, Kirby M, Mostowski H, Quon MJ. Roles for insulin receptor, PI3-kinase, and Akt in insulin-signaling pathways related to production of nitric oxide in human vascular endothelial cells. *Circulation*. 2000; 101:1539–1545.

TABLE AND FIGURES

Table 1. Biometrical parameters and citrate synthase activity

	CD-S (10)	HFD-S (10)	HF/CD-S (8)	HFD-EX (7)	HF/CD-Ex (8)
Body weight (g)					
Initial	219 ± 4	221 ± 4	223 ± 5	220 ± 4	220 ± 5
Final	670 ± 9	850 ± 26 ^{***}	710 ± 29 ^{\$\$\$}	677 ± 28 ^{\$\$\$}	655 ± 15 ^{\$\$\$}
Retroperitoneal fat-mass (g)	8.2 ± 0.4	30.6 ± 2.7 ^{***}	11.5 ± 1.3 ^{\$\$\$}	15.4 ± 2 ^{*,\$\$\$}	6.75 ± 0,2 ^{\$\$\$}
Epididymal fat-mass (g)	6.4 ± 0.3	10.7 ± 0.6 ^{***}	6.7 ± 0.5 ^{\$\$\$}	7.5 ± 0.8 ^{\$\$\$}	5,00 ± 0,2 ^{\$\$\$}
Heart weight (g)	1.62 ± 0.06	1.84 ± 0.06 [*]	1.65 ± 0.05 ^{\$}	1.68 ± 0,08 ^{\$}	1,62 ± 0,04 ^{\$}
Heart weight /body weight (%)	0.24 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.24 ± 0.01	0.25 ± 0.01 ^{\$}	0,25 ± 0,01 ^{\$}
Citrate synthase activity (nmol/min/mg protein)	110 ± 12	117 ± 8	99 ± 17	190 ± 17 ^{*,\$,†}	166 ± 14 ^{*,\$,†}

All data are expressed as mean ± SEM for sedentary rats fed on control diet (CD-S), sedentary rats fed on high fat diet (HFD-S), sedentary rats fed on modified diet (high fat to control diet) (HF/CD-S), exercise trained rats fed on high fat diet (HFD-EX) and exercise trained rat fed on modified diet (HF/CD-Ex). (n) = number of rats. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs. CD-S, $^{\$}$ $P < 0.05$, $^{\$ \$ \$}$ $P < 0.001$ vs. HFD-S, $^{\text{¥}}$ $P < 0.05$ vs. HF/CD-Ex, † $P < 0.05$ vs. HF/CD-S.

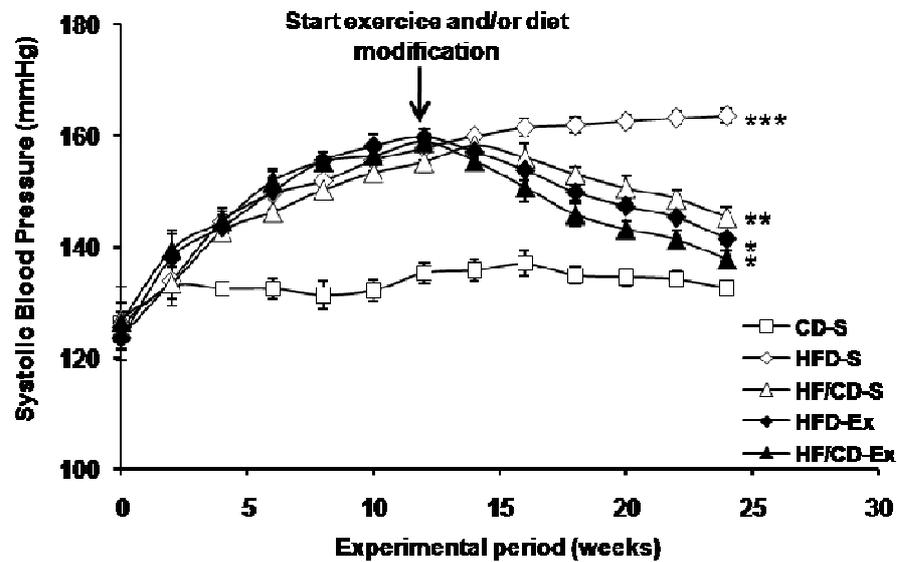


Figure 1. Systolic Blood Pressure during 24 weeks of experiments.

Data are expressed as mean \pm SEM for sedentary rats fed on control diet (CD-S, n=10), sedentary rats fed on high fat diet (HFD-S, n=10), sedentary rats fed on modified diet (high fat to control diet, n=8) (HF/CD-S, n=8), exercise trained rats fed on high fat diet (HFD-EX, n=7) and exercise trained rat fed on modified diet (HF/CD-Ex, n=7). *** P <0.001 vs. others groups, ** P <0.05 vs. CD-S, HFD-Ex and HF/CD-Ex, * P <0.05 vs. CD-S.

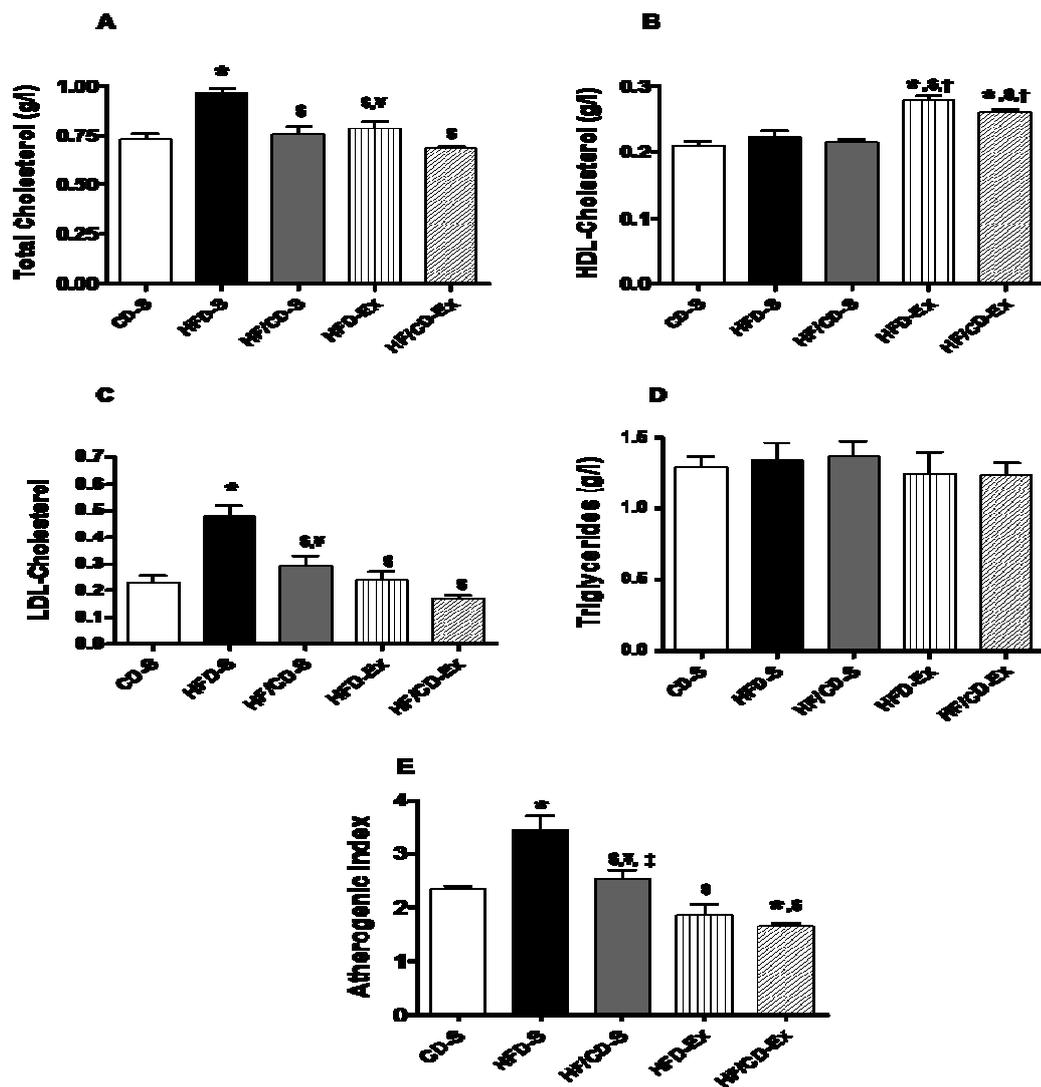


Figure 2. Plasma levels of total cholesterol (A), HDL-Cholesterol (B), LDL-Cholesterol (C), triglyceride (D) and atherogenic index (E). Data are expressed as mean \pm SEM for sedentary rats fed on control diet (CD-S, n=10), sedentary rats fed on high fat diet (HFD-S, n=10), sedentary rats fed on modified diet (high fat to control diet, n=8) (HF/CD-S, n=8), exercise trained rats fed on high fat diet (HFD-EX, n=7) and exercise trained rat fed on modified diet (HF/CD-Ex, n=8). * P <0.05 vs. CD-S, § P <0.05 vs. HFD-S, † P <0.05 vs. HF/CD-S, ¥ P <0.05 vs. HF/CD-Ex, ‡ P <0.05 vs. HFD-Ex.

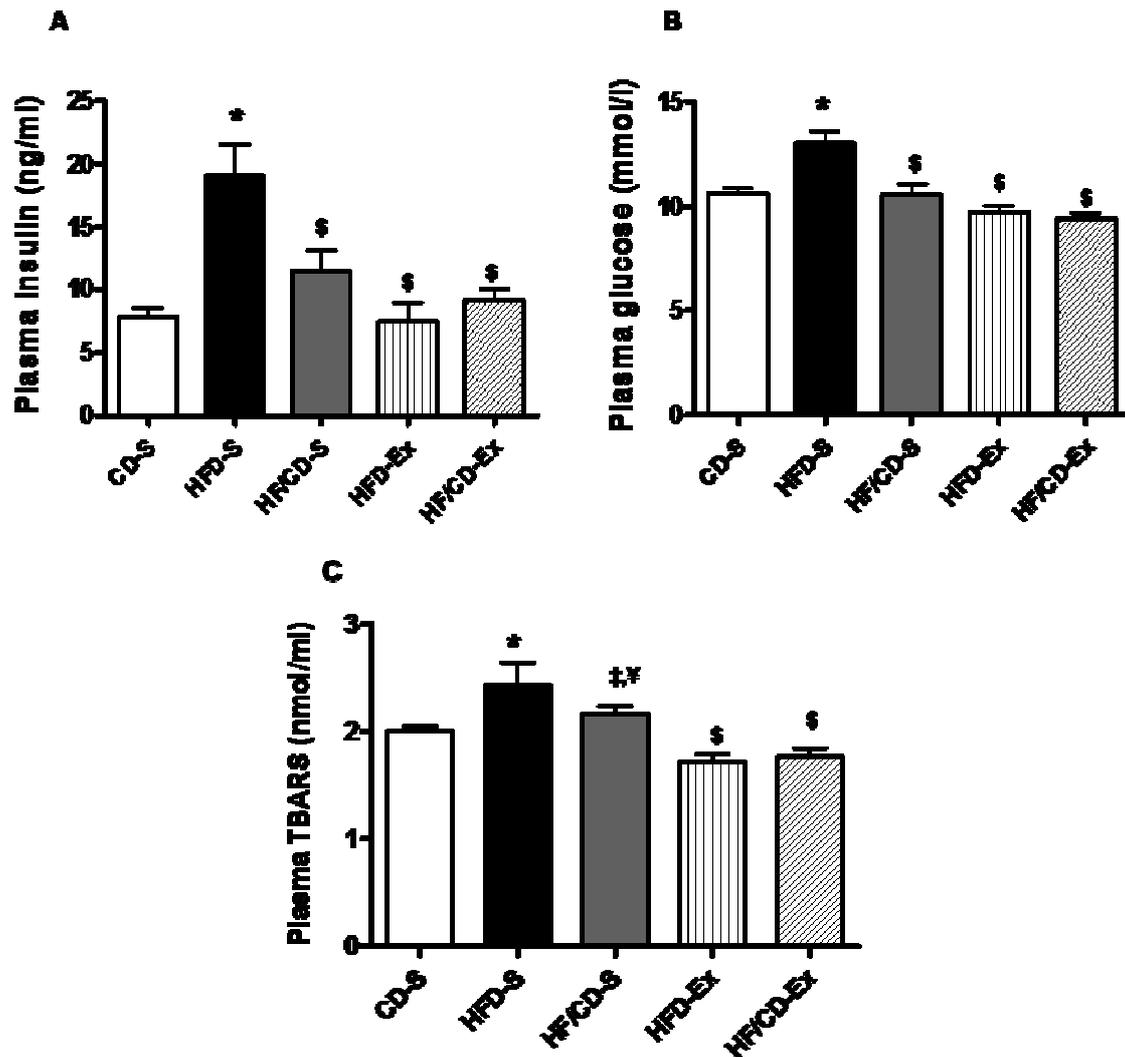


Figure 3. Plasma levels of insulin (A), glucose (B) and TBARS (C).

Data are expressed as mean \pm SEM for sedentary rats fed on control diet (CD-S, n=10), sedentary rats fed on high fat diet (HFD-S, n=10), sedentary rats fed on modified diet (high fat to control diet, n=8) (HF/CD-S, n=8), exercise trained rats fed on high fat diet (HFD-EX, n=7) and exercise trained rat fed on modified diet (HF/CD-Ex, n=8).). * P <0.05 vs. CD-S, § P <0.05 vs. HFD-S, † P <0.05 vs. HF/CD-S, ‡ P <0.05 vs. HFD-Ex.

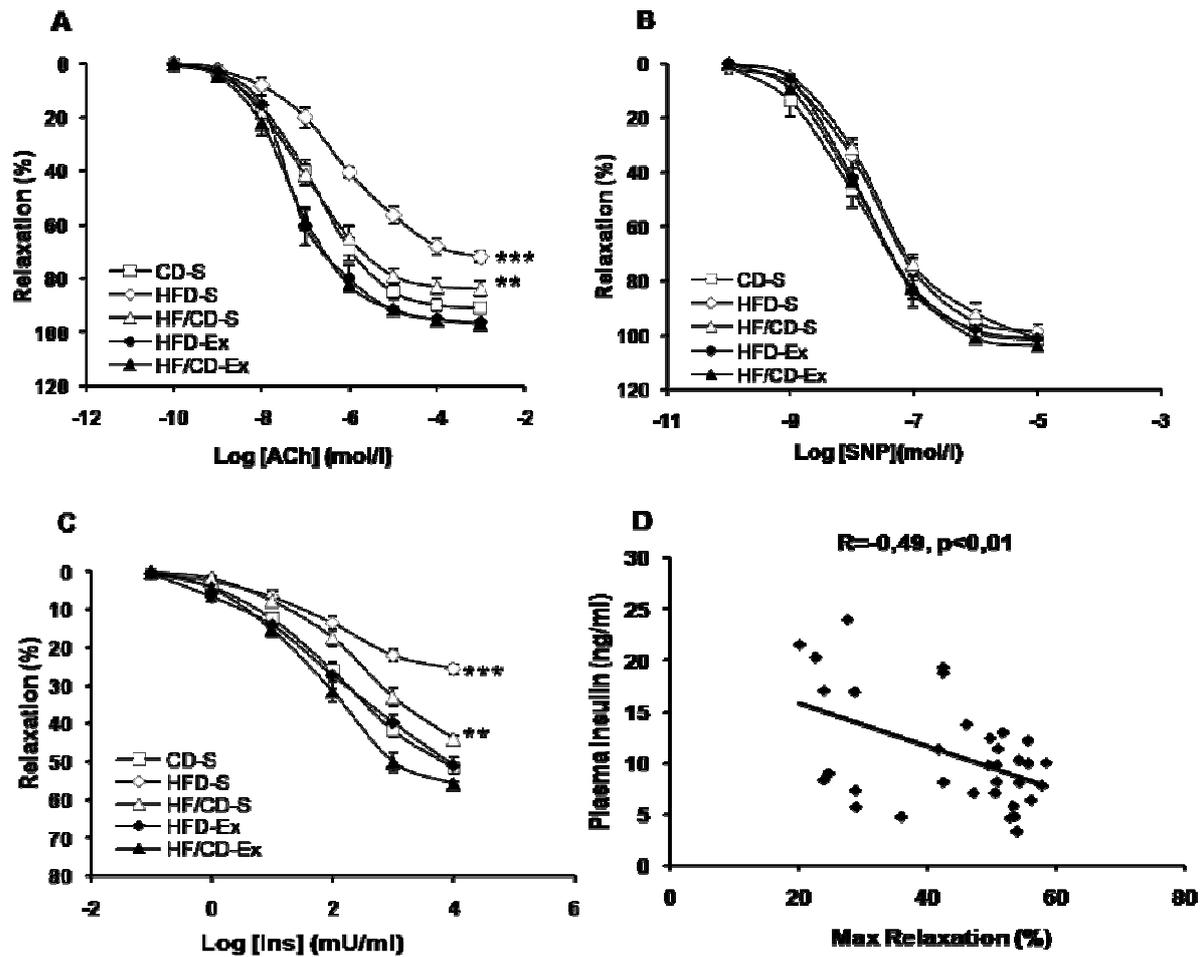


Figure 4. Dose response curves in aortic rings to acetylcholine (A), sodium nitroprusside (B) and insulin (C), correlation between maximal relaxation of isolated aortic segments with insulin and plasma insulin (D). Data are expressed as mean \pm SEM for sedentary rats fed on control diet (CD-S, n=10), sedentary rats fed on high fat diet (HFD-S, n=10), sedentary rats fed on modified diet (high fat to control diet, n=8) (HF/CD-S, n=8), exercise trained rats fed on high fat diet (HFD-EX, n=7) and exercise trained rat fed on modified diet (HF/CD-Ex, n=8). *** $P < 0.001$ vs. others groups, ** $P < 0.05$ vs. CD-S, HFD-Ex and HF/CD-Ex.

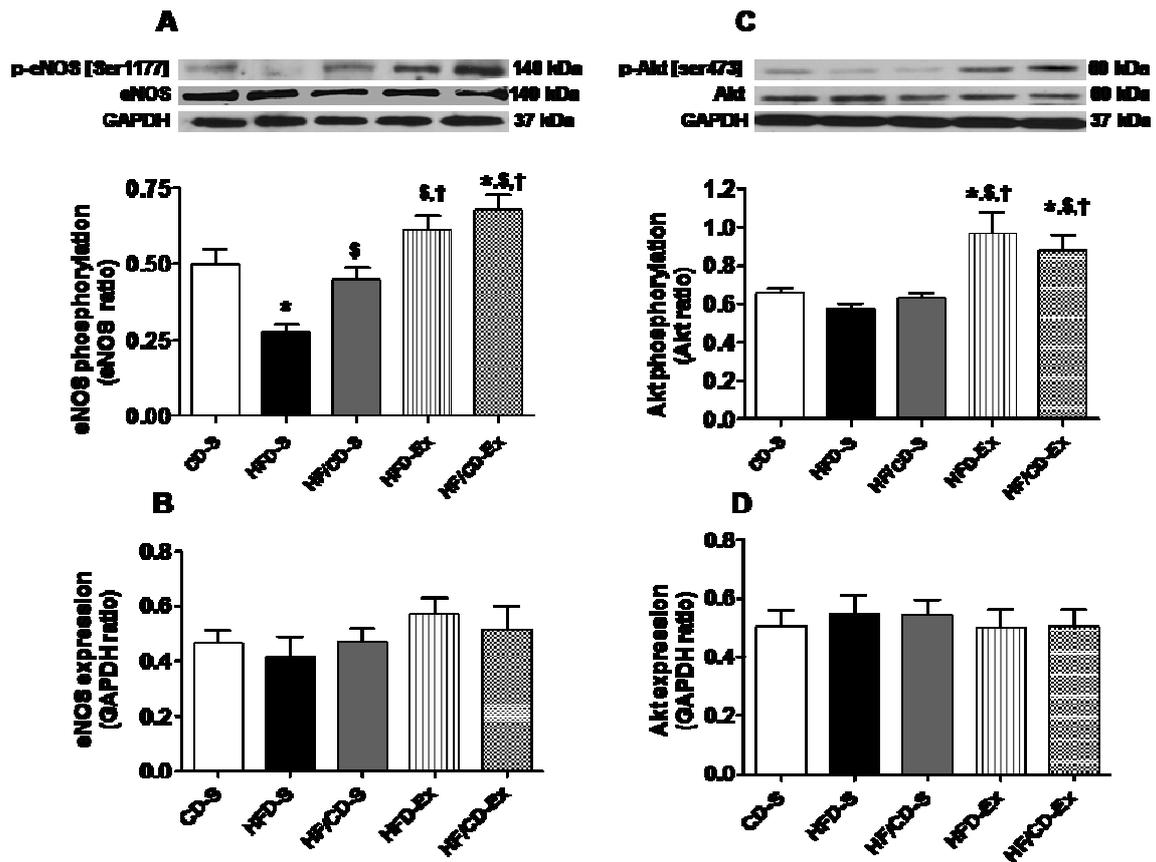


Figure 5. eNOS and Akt phosphorylation and expression in aorta. Upper panels, representative immunoblots for eNOS and Akt phosphorylation and expression and GAPDH expression. Lower panels, corresponding bar graphs show densitometric data for phosphorylation for eNOS (A), the expression for total eNOS (B), the phosphorylation for Akt (C) and the expression for total Akt (D) from CD-S, HFD-S, HF/CD-S, HFD-Ex and HF/CD-Ex rats. Results are presented as means \pm SEM of 6 or 8 experiments. * P <0.05 vs. CD-S, $^{\S}P$ <0.05 vs. HFD-S, $^{\ddagger}P$ <0.05 vs. HF/CD-S.

4. Discussion et conclusion

Le résultat principal qui ressort de cette étude est que l'exercice physique, indépendamment du régime alimentaire utilisé, est capable de corriger les facteurs de risque cardiovasculaire installés chez le rat pendant la période d'obésité.

Plusieurs travaux antérieurs ont démontré que la consommation chronique d'un régime hyperlipidique chez les rongeurs entraîne l'apparition d'un syndrome métabolique (Roberts et coll., 2001 ; Dobrain et coll., 2001). Notre étude confirme ces résultats puisque nous avons montré que la consommation d'une telle diète entraîne une obésité viscérale, augmente la pression artérielle, augmente les taux plasmatiques d'insuline, du glucose, du cholestérol total et celle de LDL-c. La pratique de l'exercice et/ou la modification du régime alimentaire (du régime riche en lipide au régime standard) a permis de corriger l'ensemble de ces facteurs de risque dans les groupes interventions. D'une façon remarquable, les valeurs plasmatiques du HDL-c ont été augmentées seulement dans les groupes exercices, en comparaison avec les groupes de rats sédentaires. De même, les rats entraînés avaient des valeurs de pression artérielle systolique moins élevées comparativement aux rats qui ont subies seulement la modification de la diète, suggérant que l'exercice a plus d'effet sur la pression sanguine que le changement des habitudes alimentaires.

D'autre part, le régime alimentaire riche en matières grasses a induit chez les rats obèses une diminution de la vasorelaxation NO-dépendante, en réponse à l'acétylcholine et à l'insuline au niveau aortique. Ces observations montrent le rôle clé des lipides alimentaires dans le développement de la dysfonction endothéliale et la résistance à l'insuline. Dans cette étude, nous avons montré que l'exercice, indépendamment de la diète, est capable de corriger la dysfonction endothéliale ainsi que la résistance à l'insuline au niveau vasculaire, alors que

le changement de la diète seul ne restaure que partiellement ces paramètres. Plusieurs études ont montré que la dysfonction endothéliale et l'insulinorésistance au niveau vasculaire sont caractérisées par une diminution de la production/biodisponibilité du NO (Montagnani et coll., 2002 ; Raij et coll., 2006; Taddei et coll., 2003). C'est pourquoi dans notre étude nous avons explorés la voie de l'Akt/eNOS phosphorylée. Nos résultats montrent que le régime hyperlipidique a induit une diminution de l'activité de la eNOS au niveau aortique (mesuré par le rapport p-eNOS/eNSO total), suggérant que ce type de régime induit une diminution de la production du NO. L'exercice physique, combiné ou non avec le changement de la diète, augmente le rapport p-eNOS/eNOS total ainsi que le rapport p-Akt/Akt total, suggérant que l'exercice indépendamment de la diète améliore la voie de l'Akt/eNOS phosphorylée, et augmente ainsi la production du NO. Ces observations confirment des études précédentes, qui ont observé que l'exercice physique, via l'augmentation des forces de cisaillement, induit une amélioration de la voie de l'Akt/eNOS phosphorylée (Hambrecht et coll., 2003 ; Zhang et coll., 2007). Notre étude montre également que le changement de la diète améliore également la voie de production du NO. En effet, nos résultats mettent en évidence une augmentation de l'activité de la eNOS au niveau aortique dans le groupe de rats ayant subi une modification de la diète, en comparaison avec le groupe de rats obèses. Cette amélioration ne semble pas passer par une augmentation de la phosphorylation de l'Akt, puisque le rapport p-Akt/Akt totale n'était pas affecté par les modifications de la diète. Il est possible que le changement de régime alimentaire améliore la voie de production/biodisponibilité du NO et corrige ainsi la dysfonction endothéliale via une réduction du stress oxydatif. C'est pourquoi, dans notre prochaine étude, nous allons étudier la relation exacte entre l'augmentation du stress oxydatif et la dysfonction endothéliale dans l'obésité, ainsi que le rôle thérapeutique de la modification de style de vie.

En somme, l'exercice physique semble être une stratégie plus efficace que le changement du régime alimentaire pour combattre les facteurs de risque cardiovasculaires installés pendant la période d'obésité. De plus, la combinaison de l'exercice avec le changement d'alimentation ne semble pas avoir plus d'effets bénéfiques supplémentaires sur ces facteurs de risque. Cette observation nous montrent bien la contribution thérapeutique directe de l'exercice physique.

L'exercice physique, même sans modification du régime alimentaire, peut être une stratégie non-pharmacologique efficace pour le traitement des maladies cardiométaboliques liées à l'obésité.

**DEUXIÈME PARTIE : L'EXERCICE CORRIGE LA DYSFONCTION
ENDOTHELIALE ET INHIBE L'ACTIVATION DE LA NADPH OXYDASE CHEZ
LE RAT RENDU OBÈSE PAR UN RÉGIME HYPERLIPIDIQUE**

Exercise reverses endothelial dysfunction and NADPH-dependent oxidative stress in high-fat diet-induced obese rats

Sabeur Touati, Augusto C.I. Montezano, Fayçal Meziri, Yen He, Tlili Barhoumi, Alain Berthelot, Rhian M. Touyz, Pascal Laurant

Sera soumise sous peu à Hypertension (Impact factor 6.614)

1. But de l'étude

Déterminer les mécanismes moléculaires par lesquels l'exercice et/ou le changement d'un régime alimentaire (riche en matière grasse puis diète standard), améliore les facteurs de risques cardiovasculaires incluant la fonction endothéliale et l'hypertension artérielle.

Nous supposons que l'exercice et/ou la modification de la diète sont capables de réduire le stress oxydatif au niveau cardiovasculaire: 1) en diminuant l'activation de la NADPH oxydase via une inhibition de la translocation de la sous-unité p47^{phox} vers la membrane cellulaire, 2) en stimulant les défenses antioxydantes via une augmentation de la SOD1 au niveau cardiovasculaire. Nous supposons également que l'amélioration de la voie de la eNOS phosphorylée pourrait expliquer, en partie, ce bénéfice.

2. Méthode

2.1 Animaux

Nous avons utilisé des rats mâles Sprague-Dawley (âgés de 6 semaines). Les animaux étaient divisés de façon aléatoire en 2 groupes: un groupe nourri avec un régime standard (CD, n=10), et l'autre nourri avec un régime enrichi en graisse (HF, n=40). Après 12 semaines, ce dernier groupe a été ensuite divisé en 4 groupes : HFD-S (sédentaire, n=10), HFD-Ex (exercice, n=10), HF/CD-S (changement du régime HF au régime CD, n=10) et HF/CD-Ex (changement du régime HF au régime CD + exercice, n=10) pendant 12 semaines.

2.2 Le protocole d'exercice

Les animaux dans les groupes exercices ont suivi un programme de course sur tapis roulant 5 fois/semaine ; 60 minutes/jour.

2.3 Le régime alimentaire

-Régime riche en matière grasse : 70% de l'énergie totale provient des lipides

-Régime standard : 10% de l'énergie totale provient des lipides

2.4 Les étapes de l'investigation

-Mesurer l'activité totale de la NADPH oxydase au niveau cardiaque et aortique par lucigenin-derived chemiluminescence.

- Mesurer la translocation de la sous-unité p47^{phox} : quantifier l'expression de la protéine au niveau cytosolique et membranaire par western blot.

- Déterminer l'expression des sous-unités membranaires de la NADPH oxydase (Nox1-Nox2-Nox4).

-Explorer la voie Akt-eNOS phosphorylée au niveau cardiaque et aortique avec quantification de l'expression des protéines eNOS, phospho-eNOS sur sérine 1177, Akt et phospho-Akt sur sérine 473 par western blot.

-Mesurer l'expression des récepteurs de l'angiotensine II (AT1 et AT2) au niveau du cœur et de l'aorte par western blot.

3. Résultats principaux

3.1 L'exercice physique seul

-Réduit le stress oxydatif systémique, mesuré par les concentrations plasmatiques des TBARS

-Diminue le stress oxydatif au niveau cardiovasculaire :

- Diminue l'activité totale de la NADPH oxydase
- Inhibe la translocation de la p47^{phox} du cytosol vers la membrane
- Diminue l'expression de la sous-unité Nox4

-Améliore la voie Akt/eNOS phosphorylée : augmente l'expression des taux protéiques de p-eNOS et de p-Akt au niveau de l'aorte et du cœur.

-N'a pas d'effet sur l'expression de l'AT₁ et de l'AT₂

3.2 Modification du régime alimentaire seul

-Améliore aussi le stress oxydatif au niveau cardiovasculaire, par l'intermédiaire des mécanismes cités ci-dessus.

-Corrige le rapport p-eNOS/eNOS totale

-N'a pas d'effet sur l'expression de l'AT₁ et de l'AT₂

3.3 Association Exercice + changement de la diète

- N'a pas d'effet bénéfique supplémentaire sur le stress oxydatif et la voie Akt/eNOS phosphorylée par rapport à l'exercice seul.

-N'a pas d'effet sur l'expression de l'AT₁ et de l'AT₂

Exercise reverses endothelial dysfunction and NADPH-dependent oxidative stress in high-fat diet-induced obese rats.

Sabeur Touati, Augusto C.I. Montezano, Fayçal Meziri, Yen He, Tlili Barhoumi, Alain Berthelot, Rhian M. Touyz, Pascal Laurant

From the Laboratory of Physiology and Physiopathology of Cardiovascular Adaptations to Exercise, University of Avignon, Avignon, France (S.T., F.M., T.B., PL); University of Franche-Comté, Besançon, France (A.B); Kidney Research Centre, Ottawa Health Research Institute, University of Ottawa, Canada (A.C.I.M., Y.H., R.M.T).

Corresponding author:

Sabeur Touati

EA₄₂₇₈ Physiologie et physiopathologie des Adaptations cardiovasculaires et à l'Exercice, Pôle Sportif et de Recherche Universitaire, 15 Boulevard Limbert, 84000 Avignon, France

Phone number: +33 (0)490162934, Fax number: +33 (0)490162901

E-mail: sabeur.touati@univ-avignon.fr

Short title: Anti-oxidant effects of exercise in obesity

Total word count: 6016 Word count of abstract: 245

Number of tables: 2 ; number of figures: 6

ABSTRACT

Exercise is known to improve cardiovascular function in obesity/metabolic syndrome. The aim of this study was to determine the molecular mechanisms where exercise improves cardiovascular risks in high-fat diet-induced obese rats. Male Sprague-Dawley rats were placed on a high fat (HFD) or control diet (CD) for 12 weeks. HFD rats were then divided into 4 groups: sedentary high fat diet group (HFD-S), exercise trained (motor treadmill 5 days/week, 60 min/day for 12 weeks) high fat diet group (HFD-Ex), modified diet (high fat to control diet) group (HF/CD-S) and exercise trained with modified diet group (HF/CD-Ex). Exercise and/or diet modification restored cardiovascular risks including high blood pressure, dyslipidimias, plasma levels of insulin, glucose, TBARS, TNF- α and IL-6. Exercise, independently of diet used, corrected the endothelial dysfunction induced by obesity. This effect was associated with the decreased NADPH oxidase activity in aortic tissue. Exercise alone was able to reduce NADPH oxidase activation through the modulation of the p47^{phox} translocation. Aortic superoxide dismutase (SOD1) expression was increased only in exercise trained groups. We demonstrated also, that exercise with or without diet modification improves the Akt/eNOS phosphorylation pathway, suggesting that exercise increases NO production. Ours results show that exercise without necessary to switch to a normal caloric diet, was able to restore the obesity-associated endothelial dysfunction .This protective mechanism can be attributed to the increased NO production/bioavailability due to the up-regulation of Akt-dependent-eNOS-phosphorylation, the down-regulation of NADPH oxidase activity, and lastly, the modulation of antioxidant systems such as SOD1.

Key words: Obesity, Hypertension, Exercise, Endothelial Dysfunction, NADPH oxidase.

INTRODUCTION

Obesity has become a major health problem and its prevalence continues to increase at a rapid rate in both developed and developing countries.¹ Obesity is a central feature of the metabolic syndrome, which is characterized by insulin resistance, hyperlipidemia and high blood pressure.² In addition, endothelial dysfunction, an early manifestation of atherosclerosis and an independent predictor of cardiovascular morbidity and mortality, has also been associated with obesity.³ However, the exact mechanisms relating obesity to endothelial dysfunction are not fully understood. Increased oxidative stress and decreased nitric oxide (NO) bioavailability appears to play a significant role in this dysfunction.⁴

A major source of ROS generation in the vasculature is the NAD(P)H oxidase family of enzymes.⁵ NADPH oxidase is a multisubunit enzymes complex composed of 2 membrane-associated components: gp91^{phox} (Nox2) and p22^{phox} and 3 cytosolic components: p40^{phox}, p47^{phox}, and p67^{phox}.^{6,7} Activation of NADPH oxidase complex leads to phosphorylation of cytosolic subunits and translocation from the cytosol to the membrane.⁸ In the past few years, 4 homologues of Nox2 called Nox1, Nox3, Nox4, and Nox5 have been identified. In vascular tissue, mainly Nox1, Nox2, and Nox4 are expressed in endothelial and vascular smooth muscle cells.^{9,10} Previous works have been reported that ROS generation by NADPH oxidase may contribute to the development of various cardiovascular disorders including endothelial dysfunction, hypertension and vascular remodeling.^{11,12,13}

Lifestyle modifications aiming to increase physical activity and to reduce the energy intake are recommended for optimal health. In obese subjects, lifestyle modification effectively improve cardiovascular function by decreasing risk factors such as adiposity, plasma lipids, diabetes incidence, inflammation and blood pressure.^{14,15} Although lifestyle modification has been recognized as an important non-pharmacological strategy to combat cardiometabolic complications linked to obesity/metabolic syndrome, little is known about the cellular and molecular mechanisms through which exercise/healthy diet exert these

beneficial effects. Using the experimental model of high fat-induced obesity, the propose of the present study was to determine the possible molecular mechanisms through which exercise and/or diet modification from high-fat to normal fat diet improved cardiovascular risks, including endothelial dysfunction and high blood pressure. We hypothesized that exercise/diet modifications would reduce local cardiovascular oxidative stress by reducing NADPH oxidase activation, and improve NO production/ bioavailability through the up-regulation of eNOS pathway.

MATERIALS AND METHODS

Animals. Male Sprague-Dawley rats (6 weeks old), were purchased from Elevage Janvier (Le Genest-Saint-Isle, France). Animals were kept under a 12h-12h light: dark cycle and allowed free access to food (SAFE, Augy, France) and water *ad libitum*. The investigation conforms to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animal published by the US National Institutes of Health (NIH publication No. 85-23, revised 1996).

Experimental design. After one week of acclimatization, rats were pair-fed with either a control diet (CD; 12.15 KJ/g, energy content in %: protein 23, carbohydrate 67, fat 10) or high fat diet (HFD; 24 KJ/g, energy content: protein 12, carbohydrate 18, fat 70 including 8 from soya oil and 62 saturated fat from lard) for 12 weeks. HFD rats were then randomly divided into 4 groups: sedentary rats fed with the high fat diet (HFD-S), exercise trained rats fed with the high fat diet (HFD-Ex), sedentary rats switched to the CD (HF/CD-S) and exercise trained rats switched to the CD diet (HF/CD-Ex). After 24 weeks of the experiments, fasted rats were anesthetized with an intraperitoneal injection of pentobarbital sodium (60mg/kg). To avoid acute effects of exercise, they were sacrificed 48h after the last training.

Blood samples were collected from abdominal aorta into heparin or EDTA tubes. The plasma was immediately separated by centrifugation and kept frozen at -80°C until chemical assays.

Exercise protocol. The exercise training protocol was adapted from a previously published procedure.¹⁶ Briefly, rats in the exercise groups were trained on a motor treadmill (Columbus Instruments, Columbus OH, USA) at the speed of 12 m/min for 20 min on the first day.

Running time was extended by 10 min/day, to 60 min/day. The running speed was increased 3 m/min every 2 weeks until the speed reached 27 m/min at the end of the training protocol.

These rats were trained 5 days/week for 12 weeks. All training sessions took place during the afternoon (2:00–5:00 p.m.).

Blood Pressure. Systolic blood pressure (SBP) was measured every 2 weeks in conscious rats by the indirect plethysmographic tail-cuff method using an automatic BP monitoring system (BP 2000, Visitech System, Apex NC, USA).

Skeletal muscle oxidative enzyme activity. The exercise training effect is commonly confirmed by an increase in muscular citrate synthase activity. Enzyme activity was measured on homogenized soleus muscle samples by spectrophotometric method as previously described.¹⁷

Measurement of plasma parameters. Plasma insulin, TNF α , and IL-6 were measured by ELISA (RI-13K; Linco-Research, St Charles, MO, USA, #BMS622, #BMS625; Bender MedSystems, Burlingame, USA). Plasma level of total cholesterol (TC), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), triglyceride and glucose were measured by colorimetric enzymatic assays (Cobas Integra automated analyzer; Roche, Meylan, France). Low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) was calculated as follows: $LDL-C = TC - (HDL-C) - (Triglycerides/2.2)$. Thiobarbituric acid–reacting substances (TBARS) were determined in

plasma samples as an index of oxidative stress by assaying malonaldehyde-*bis* (MDA), as previously described.¹⁸

Measurement of NAD(P)H Oxidase Activity. The lucigenin-derived chemiluminescence assay was used to determine NADPH oxidase activity in aorta and heart as previously described.¹⁹ Activity was expressed as arbitrary units/mg protein.

Evaluation of the vasorelaxant responses of isolated aorta. After sacrifice, the descending thoracic aorta was rapidly dissected, cleaned from loose connective tissue in the adventitia and immersed in Krebs solution composed of (mM): NaCl 118, KCl 4.7, NaHCO₃ 25, CaCl₂ 2.5, MgSO₄ 1.2, KH₂PO₄ 1.2 and glucose 11; bubbled with a mixture of 95% O₂ and 5% CO₂ at pH of 7.4. Three aortic rings (2-3mm long) per rat were studied in parallel (one for each drug studied as described below). The rings were then suspended horizontally between two L-shaped stainless steel hooks in organ chambers which contained 10 ml of Krebs maintained at 37°C. Isometric tension was measured using a force displacement transducer (Emka Technologies, Falls Church, VA, USA) connected to the upper hook. During an equilibration period of 60 min, aortic rings were progressively stretched to their optimal passive tension (2g) as assessed by the response to 100 mM KCl. The rings were then exposed to norepinephrine (10⁻⁷ M). Endothelial integrity was confirmed before the experiment by testing relaxation induced by acetylcholine (10⁻⁶ M) under norepinephrine (10⁻⁷ M) pre-contracted conditions. After this procedure, the rings were washed and allowed to re-equilibrate to baseline tension for 60 min. Endothelium-dependent relaxation was assessed by cumulative concentration–response curves to acetylcholine (10⁻¹⁰ to 10⁻³ M). Endothelium-independent relaxation was evaluated by cumulative concentration–response curves to sodium nitroprusside (10⁻¹⁰ to 10⁻⁵ M).

Western Blotting. Aorta and heart were used as follows. Frozen tissue was homogenized in lysis buffer A (50 mmol/L of Tris/HCl [pH 7.4], 5 mmol/L of EGTA, 2 mmol/L of EDTA, 0.1 mmol/L of PMSF, 1 mmol/L of pepstatin A, 1 mmol/L of leupeptin, and 1 mmol/L of aprotinin). Half of the homogenate was used for total fraction protein analysis. The remaining portion was used for membrane and cytosolic separation. Homogenates were centrifuged at 500g for 10 minutes, the nuclei-rich pellet discarded, and the supernatant fluid recentrifuged at 100 000g for 1 hour at 4°C. The supernatant fluid (cytosolic fraction) was removed, whereas the pellet, containing the particulate fraction, was resuspended in lysis buffer A containing 1% Triton X-100 and recentrifuged at 100 000g for 1 hour. The resultant supernatant fluid (now membrane-enriched fraction) was used. Total or fractionated proteins were separated by electrophoresis on a 10% polyacrylamide gel and transferred onto a nitrocellulose membrane. Nonspecific binding sites were blocked with 5% skim milk in Tris-buffered saline solution with Tween for 1 hour at 24°C. Membranes were then incubated with specific antibodies overnight at 4°C. Phospho-antibodies were as follows: anti-eNOS (Ser1177; Santa Cruz), anti-Akt (Thr432; Cell Signaling), anti-stress-activated protein kinase (SAPK)/c-Jun N-terminal kinase (JNK; Thr183/Tyr185; Cell Signaling) and anti- extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2; Thr202/Tyr204; Cell Signaling). The respective nonphospho-antibodies (1:1000) were also used: eNOS (Santa Cruz Biotechnology), Akt, SAPK/JNK and ERK 1/2 (Cell Signaling). Anti-p47^{phox}, anti-Nox1, anti-Nox2 and anti-Nox4 (Santa Cruz Biotechnology). Anti- vascular cell adhesion molecule (VCAM-1; from Santa Cruz Biotechnology) and anti-superoxide dismutase (SOD-1; from BioVision). After incubation with secondary antibodies, signals were revealed with chemiluminescence, visualized by autoradiography, and quantified densitometrically. GAPDH were used as housekeeping proteins.

Statistical Analysis. All values are expressed as mean \pm SEM. Statistical comparisons between groups were made by analysis of variance (ANOVA) and each group was compared with the others using Fisher's protected least significant difference (PLSD) test. Significance was considered present when probability values were <0.05 .

RESULTS

Body weight, fat mass depot and citrate synthase activity

A high fat diet significantly increased body weight of the HFD-S rats compared to the CD-S rats ($p<0.001$; Table.1). Exercise and diet modification were both beneficial in reducing body weight. No significant difference was observed in the final body weight between the CD-S, HF/CD-S, HFD-Ex and HF/CD-Ex groups. The retroperitoneal and epididymal fat pad mass were also significantly greater in the HFD-S rats compared to the CD-S ($p<0.001$; Table 1). Exercise and low fat diet were both beneficial in reducing the body fat depot. Furthermore, the combination of exercise and diet modification (HF/CD-Ex) had a significantly greater effect than each modification individually did (Table.1). Effectiveness of exercise was determined by evaluating citrate synthase activity. Exercise training significantly increased the citrate synthase activity in the soleus muscles of the HFD-Ex and HF/CD-Ex rats compared to the sedentary rats ($p<0.05$; Table.1). High fat diet or dietary change did not affect the muscular citrate synthase activity.

Systolic Blood Pressure

As shown in Figure. 1A, high fat diet significantly increased systolic blood pressure in the HFD-S rats. Twelve weeks of physical exercise significantly and progressively decreased systolic blood pressure in both HFD-Ex and HF/CD-Ex rats than in HFD-S rats ($p<0.001$).

The decrease in blood pressure was similar between the two trained groups. While modifying the high fat diet to normal diet also significantly decreased blood pressure, the lowering effect was less pronounced than that obtained after exercise training ($p < 0.05$).

Plasma lipid, insulin, glucose, TNF α and IL-6 levels

Total cholesterol and LDL-Cholesterol concentrations in the plasma were greater in the HFD-S than in the CD-S rats ($p < 0.01$; Table.1). Exercise and modified high-fat-to-normal diet, lowered and “normalized” the total cholesterol and LDL-cholesterol levels in the plasma. However, total cholesterol and LDL-cholesterol plasma concentrations were significantly smaller in the HF/CD-Ex than in the HFD-Ex and HF/CD-S rats ($p < 0.05$). Plasma HDL-cholesterol levels were not changed by the high fat diet, but they were significantly greater in the trained groups (HFD-Ex and HF/CD-Ex) than in the sedentary groups (CD-S, HFD-S and HF/CD-S; $p < 0.05$) (Table.1). However, the modified high-fat-to-normal diet did not alter the HDL-cholesterol concentrations, which indicates that the change in HDL-cholesterol was mainly due to exercise effects. The triglyceride concentrations in the plasma were not significantly different amongst the five groups (Table.1). On the other hand, plasma insulin, glucose, TNF α and IL-6 levels were significantly higher in the HFD-S than in the CD-S rats ($p < 0.05$). Exercise and modified high-fat-to-normal diet improved and “normalized” plasma insulin, glucose, pro-inflammatory cytokines levels. No significant difference was observed between the CD-S, HF/CD-S, HFD-Ex and HF/CD-Ex rats.

Plasma TBARS

Systemic oxidative stress evaluated using plasma TBARS was significantly greater in the HFD-S compared to the CD-S rats ($p < 0.05$; Table 1). Exercise significantly decreased the TBARS in HFD-Ex and HF/CD-Ex rats as compared to the HFD-S rats ($p < 0.05$; Table 1). However, the modified high-fat-to-normal diet, did not display an decrease TBARS levels.

Vascular reactivity

The endothelium-dependent vasorelaxation induced by acetylcholine was significantly attenuated in the aorta from the HFD-S rats in comparison to the response obtained in the aorta from the CD-S rats. The maximal relaxation to acetylcholine was significantly more attenuated in the HFD-S than in the CD-S rats ($p < 0.001$; Fig.1B). Exercise and dietary change to normal diet restored the endothelium-dependent relaxation to acetylcholine. However, the relaxation response in the aorta from the exercise training rats (HFD-Ex and HF/CD-Ex) was greater than in HF/CD-S rats. The endothelium-independent vasorelaxation in response to sodium nitroprusside was similar between all treatment groups (Fig.1C).

eNOS and Akt expression and phosphorylation

As shown in figure 2, total eNOS expression in the aorta (Fig. 2B) and heart tissues (Fig. 2F) from exercised rats did not differ significantly from that of sedentary rats, whereas in the case of eNOS phosphorylation, the ratio of phospho-eNOS to total eNOS was significantly lower in the aorta of HFD-S than in the control group ($p < 0.05$, Fig. 2A). Exercise was more effective than dietary modification in increasing the phosphorylation of eNOS in HFD-Ex and HF/CD-Ex. Total Akt protein expression in the aorta (Fig. 2D) and heart tissue (Fig. 2H) was also similar across all groups, whereas in the case of Akt phosphorylation, the ratio of phospho-Akt to total Akt was significantly greater in the aorta from exercised rats than in sedentary rats ($p < 0.05$; Fig. 2C). High fat diet or dietary change did not affect the phosphorylation of Akt in the aorta. On the other hand, high fat diet significantly decreased the phosphorylation of Akt in the heart tissue of the HFD-S group in comparison to the control and exercised groups. ($p < 0.05$; Fig. 2G).

NADPH oxidase activity and p47^{phox} translocation

Figure 3 shows that lucigenin-derived luminescence in the aorta (Fig. 3A) and heart tissues (Fig. 3D) was significantly higher in HFD-S rats than in CD-S rats ($p < 0.001$). Exercise and dietary modification had the same beneficial effect in decreasing NADPH oxidase activity. Furthermore, p47^{phox} translocation, which is critically involved in triggering the activation of NADPH oxidase, was increased in the aorta (Fig. 3B) and heart tissues (Fig. 3E) from HFD-S rats in comparison to the controls ($p < 0.05$). No difference was observed between CD-S, HF/CD-S, HFD-Ex and HF/CD-EX.

Protein expression of NADPH oxidase isoforms

As shown in figure 3C, NOX4 protein expression in the aorta was significantly greater in the HFD-S group than in the CD-S group ($p < 0.05$). Both exercise and dietary modification decreased NOX4 expression. On the other hand, NOX1 and NOX2 expression in the aorta was the same across all groups (data not shown). Likewise, NOX4 (Fig. 3F) and NOX 2 (data not shown) protein expression in the myocardium was similar among all groups.

SOD-1 expression

As shown in figure 4A, exercise training significantly increased SOD-1 expression in the aorta from HFD-Ex and HF/CD-Ex rats compared to the sedentary rats ($p < 0.05$). High fat diet or dietary change did not affect SOD-1 expression in the aorta, however. In contrast, SOD-1 expression was not significantly different across all groups in the heart tissue (Fig.4B).

MAPK phosphorylation

As shown in Figure 5A, aortas from HFD-S rats displayed an increased ERK1/2 phosphorylation compared to CD-S rats ($p < 0.05$). Exercise was more effective than dietary modification in decreasing ERK1/2 phosphorylation in both exercise trained groups. SAPK/JNK phosphorylation was also increased in HFD-S rats compared to the controls ($p < 0.05$; Figure 5B). Exercise and diet modification were both successful in reducing SAPK/JNK phosphorylation. Contrarily, no significant difference was observed in the ERK1/2 and SAPK/JNK phosphorylation in heart tissue.

VCAM-1 expression

As shown in figure 6, VCAM-1 expression in the aorta (6A) and heart tissues (6B) was increased in HFD-S rats when compared to control rats. Exercise and dietary modification had the same effect in decreasing VCAM-1 expression in both tissues.

DISCUSSION

The fat enriched diet given to rats is regarded as an important factor in the development of cardiometabolic abnormalities with features resembling those of the human metabolic syndrome.²⁰ The major finding of the present study is that exercise improved cardiovascular risks, including endothelial dysfunction and high blood pressure, without the need to necessarily switch from a high-fat to a normal fat diet. These effects seem to be related to modulate NADPH oxidase activity and to improve NO production/bioavailability through the up-regulation of the eNOS cascade.

Obesity has been found to increase the incidence of cardiovascular diseases.²¹ Previous experimental observations demonstrated that high fat feeding impaired endothelium-

dependent relaxation and ultimately caused hypertension.^{20,22} Furthermore, Cuevas et al.²³ reported that even a single high-fat meal can lead to a transient endothelial dysfunction in healthy subjects. Research suggests that dietary high-fat content is the culprit of endothelial dysfunction and cardiovascular disorders. In the present study, we showed that high fat diet increased systolic blood pressure and impaired the endothelium-dependent relaxation in response to acetylcholine. Obese rats that were put through exercise training and/or were switched from a high fat to normal diet demonstrated a decreased systolic blood pressure, and interestingly enough, displayed a restored endothelial dysfunction. Regardless of the diet modification used, trained rats exhibited a greater decrease in blood pressure than the sedentary ones with modified diets did. It has also been noted that exercise successfully restored and even increased the endothelium- and NO-dependent aortic relaxant response to acetylcholine, once again regardless of the diet employed. However, switching the diet of sedentary rats from a high-fat one to the control diet, only improved this aortic relaxant response but did not restore it completely. Our results have demonstrated that aerobic exercise training was more effective than a dietary change in reversing high blood pressure and endothelial dysfunction. Corrected alterations in the expression and activity of eNOS, and corrected alterations in vascular levels of superoxide as well as superoxide-mediated NO inactivation, may be potential mechanisms at the heart of the increased NO bioactivity instigated by exercise.

Previous experimental studies have reported that shear stress increases eNOS mRNA and protein expression in human endothelial cells after exposure to laminar shear stress.²⁴ Furthermore, human and animal investigations demonstrated that exercise improves vascular function through shear stress-induced/Akt-dependent eNOS phosphorylation at Ser¹¹⁷⁷.^{25,26} In the present study, we found that total Akt and eNOS protein expression were unaffected by a high fat diet or exercise. However, investigation of eNOS phosphorylation revealed that levels

of Ser¹¹⁷⁷ phosphorylation, which activates the enzyme, were reduced in the aorta from obese sedentary rats when compared to control rats. This finding is in line with other studies claiming that chronic treatment with a high-fat diet induced aortic endothelial dysfunction, hypertension, and a marked reduction of eNOS phosphorylation.^{20,27} Interestingly, exercise with or without diet modification increased eNOS phosphorylation at Ser¹¹⁷⁷, suggesting that exercise increased eNOS activity independently of the diet used. These effects of exercise seem to be related in the increase of Akt phosphorylation at Ser⁴⁷³ in aortas from exercised rats.²⁵ Our results suggest that shear stress-induced/Akt-dependent augment eNOS phosphorylation at Ser¹¹⁷⁷. This is an important molecular mechanism contributing to the direct beneficial effects of exercise in endothelial dysfunction induced by a high-fat diet. On the other hand, switching from a high-fat diet to a normal fat diet was also able to improve endothelial dysfunction and to increase levels of eNOS phosphorylation more so in HF/CD-S rat aortas than in HFD-S rats. However, this beneficial effect was independent of Akt phosphorylation in the aortas from HF/CD-S rats. It is possible that diet modification restored NO bioavailability and corrected endothelial dysfunction in HF/CD-S by reducing vascular oxidative stress.

Clinical studies have identified elevated oxidative stress as an important mechanism linking obesity to the increased risk of cardiovascular diseases.²⁸ There are several enzyme systems that can potentially produce reactive oxygen species (ROS), including NADPH oxidase, xanthine oxidase, a dysfunctional eNOS due to uncoupling, and enzymes of the mitochondrial respiratory chain.¹¹ Strong evidence supports the idea that NADPH oxidase is the major source of ROS in the cardiovascular system. Many studies demonstrated an increase in NADPH oxidase activity in the vessel wall of hypertensive animals.^{13,29} Furthermore, Hayashi et al.³⁰ reported that inhibition of NADPH oxidase activity using apocynin, improved endothelial dysfunction in diabetic rats, suggesting that NADPH oxidase play a major role in

vascular damage. In our study, high blood pressure and endothelial dysfunction were accompanied by elevated NADPH oxidase activity in cardiovascular systems from HFD-S rats. Furthermore, the p47^{phox} cytosolic subunit, which plays a pivotal role in NADPH oxidase activation,⁸ displays increased levels of translocation towards the membrane in cardiovascular tissue from sedentary obese rats, confirming the up-regulation of NADPH oxidase. To shed some light on which NADPH-oxidase isoforms are involved in the augmented cardiovascular oxidative stress due to high-fat diet induced obesity, we measured gp91phox (Nox2) protein expression and the putative vascular homologues of this catalytic subunit, Nox1 and Nox4. Interestingly, while levels of Nox2 and Nox1 (data not shown) were not different, expression of Nox4, a major source of O₂⁻ in endothelial cells,¹⁰ was markedly higher in aortas from HFD-S. In the present study, exercise and/or diet modification suppressed the development of cardiovascular oxidative stress induced by a high-fat diet. This effect seems to be related to a reduced NADPH oxidase activity through the inhibition of the p47^{phox} translocation, as well as to a diminished Nox4 expression. Previous studies have reported that Angiotensin II plays an important role in vascular NADPH oxidase activation.^{8,31} For example, Adams et al.,³² reported a positive relationship between increased AT1/AT2 ratio and NADPH oxidase activity at mammary artery levels in patients with coronary artery disease. In the present study, increased NADPH oxidase activity as well as p47^{phox} translocation in the aortas and hearts of obese rat were not associated with activation of renin angiotensin systems (RAS). In addition, protein expression of AT1 and AT2 receptors was not altered. Moreover, exercise decreased NADPH oxidase activity and modulated p47^{phox} translocation in the aorta and heart, without decreasing AT1 and AT2 expression. Our findings indicate an inactivation of NADPH oxidase with exercise, independent of RAS inactivation. These results were in conflict with previous studies which demonstrated that exercise, via shear stress, reduces AT1 expression along with vascular NADPH oxidase activity.³² Recent in-vitro studies have reported that the prolonged exposure

of human endothelial cells to laminar shear stress induced a reduction of superoxide production, as well as mRNA and protein expression of Nox2 and p47^{phox}. This effect disappeared upon inhibition of eNOS through L-NAME, demonstrating a direct effect of shear stress-induced stimulated NO in NADPH oxidase regulation.³³ In our study, it is suggested that exercise-induced shear stress may have directly modulated activity/expression of NADPH oxidase.

On the other hand, obesity was associated with chronic inflammation characterized by macrophage infiltration in adipose tissue.³⁴ The latter is responsible for the majority of pro-inflammatory cytokines such as TNF- α .³⁴ This abnormal production of TNF- α played a direct role in the development of insulin resistance.³⁵ TNF- α can equally activate JNK, which, in turn can also play a role in insulin resistance.³⁶ Additionally, an in-vitro study has reported that the prolonged exposure of human endothelial cells to TNF- α induced an augmentation of ROS, via increased expression of Nox2 and Nox4.³⁷ Subsequently, ROS can equally activate JNK pathways, similarly playing a role in the development of insulin resistance.³⁸ However, our results showed that obesity increased plasma levels of TNF- α as well as vascular protein expression of JNK, and that dietary modification “normalized” these effects. It is possible that a reduction of visceral adipose tissue, achieved with dietary modification, caused a decrease in macrophage infiltration. This effect led to a reduction in TNF- α production, which may have directly or indirectly improved insulin resistance, thus, reducing atherogenic risk. However, further research is needed to confirm this mechanism.

We also considered the possibility that exercise and/or diet modification exerted an antioxidant effect by increasing the expression and/or activity of superoxide dismutase (SOD), a major antioxidant enzyme in arteries that reacts with and reduces the bioavailability of the superoxide anion.³⁹ In the present study, we showed that a high-fat diet or dietary change from high to normal fat diet did not affect SOD1 (Cu/Zn) expression in cardiovascular

systems. Interestingly, SOD-1 expression in the aortas from both exercise trained groups increased independently of diet used. This up-regulation of SOD was accompanied by an increase in the endothelium- and NO-dependent aortic relaxant response to acetylcholine. Therefore, our findings clearly show a strong relationship between the improved relaxant response seen in trained animals, as well as in the up-regulation of SOD-1 expression. This is consistent with previous reports demonstrating that chronic exercise training increased SOD-1 expression associated with the improved endothelial dysfunction.⁴⁰ However, the exact reasons for such an up-regulation are unknown. It is possible that laminar blood flow induced by exercise training ameliorates the activity/expression of the anti-oxidant enzyme.

In summary, our data demonstrated that lifestyle intervention, including aerobic exercise and dietary modification, reverse cardiometabolic abnormality linked to obesity. We provide the direct evidence that exercise training, regardless of diet employed, reduced oxidative stress and improved endothelial dysfunction in high-fat diet-induced obese rats. This protective mechanism can be attributed to the increased NO production/bioavailability due to the up-regulation of Akt-dependent eNOS phosphorylation, the down-regulation of NADPH oxidase activity, and lastly, the modulation of antioxidant systems such as SOD1.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Dr Isabelle Jallat-Dalloz for excellent technical assistance.

SOURCES OF FUNDING

This study was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (R.M.T).

R.M.T. is funded by a Canada Research Chair of the Canadian Institutes of Health Research and through the Canadian Foundation for Innovation.

DISCLOSURES

None.

REFERENCES

Haslam D, James P. Obesity. *Lancet*. 2005;366: 1197–1209.

Gami AS, Witt BJ, Howard DE, Erwin PJ, Gami LA, Somers VK, Montori VM. Metabolic syndrome and risk of incident cardiovascular events and death: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *J Am Coll Cardiol*. 2007; 49:403–414.

Perticone F, Ceravolo R, Candigliota M, Ventura G, Iacopino S, Sinopoli F, Mattioli PL. Obesity and body fat distribution induce endothelial dysfunction by oxidative stress: protective effect of vitamin C. *Diabetes*. 2001;50:159–165.

Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res*. 2000;87:840–844.

Rajagopalan S, Kurz S, Münzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griending KK, Harrison DG. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation: contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest*. 1996;97:1916–1923.

Babior BM. NADPH oxidase: an update. *Blood*. 1999;93:1464–1476.

Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*. 2000;86:494–501.

Touyz RM, Yao G, Schiffrin EL. c-Src induces phosphorylation and translocation of p47phox: role in superoxide generation by angiotensin II in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:981–987.

Sorescu D, Weiss D, Lassenge B, Clempus RE, Szocs K, Sorescu GP, Valppu L, Quinn MT, Lambeth JD, Vega JD, Taylor WR, Griendling KK. Superoxide production and expression of Nox family proteins in human atherosclerosis. *Circulation.* 2002;105:1429–1435.

Ago T, Kitazono T, Ooboshi H, Iyama T, Han YH, Takada J, Wakisaka M, Ibayashi S, Utsumi H, Iida M. Nox4 as the major catalytic component of an endothelial NAD(P)H oxidase. *Circulation.* 2004;109:227–233.

Higashi Y, Noma K, Yoshizumi M, Kihara Y. Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circ J.* 2009;73:411–418.

Touyz RM, Schiffrin EL. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. *Histochem Cell Biol.* 2004;122:339–352.

Zalba G, Beaumont FJ, San José G, Fortuño A, Fortuño MA, Etayo JC, Díez J. Vascular NADH/NADPH oxidase is involved in enhanced superoxide production in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 2000;35:1055–1061.

Bassuk SS, Manson JE. Epidemiological evidence for the role of physical activity in reducing risk of type 2 diabetes and cardiovascular disease. *J Appl Physiol.* 2005;99:1193–204.

Hamdy O, Ledbury S, Mullooly C, Jarema C, Porter S, Ovalle K, Moussa A, Caselli, A, Caballero AE, Economides PA, Veves, A, Horton ES. Lifestyle modification improves endothelial function in obese subjects with the insulin resistance syndrome. *Diabetes* 2003; 26: 2119-25.

Chen HI, Chiang IP, Jen CJ. Exercise training increases acetylcholine-stimulated endothelium-derived nitric oxide release in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Biomedical Science*. 1996; 3, 454–460.

Srere, PA. Citrate synthase. *Methods in Enzymology*. 1969; 13:3–5.

Callera GE, Tostes RC, Yogi A, Montezano AC, Touyz RM. Endothelin-1-induced oxidative stress in DOCA-salt hypertension involves NADPH-oxidase-independent mechanisms. *Clin Sci (Lond)*. 2006;110:243–253.

Yogi A, Mercure C, Touyz J, Callera GE, Montezano AC, Aranha AB, Tostes RC, Reudelhuber T, Touyz RM. Renal redox-sensitive signaling, but not blood pressure, is attenuated by Nox1 knockout in angiotensin II-dependent chronic hypertension. *Hypertension*. 2008;51:500–506.

Roberts CK, Vaziri ND, Liang KH, Barnard RJ. Reversibility of chronic experimental syndrome X by diet modification. *Hypertension*. 2001; 37:1323–1328.

Eckel RH. Obesity and heart disease: a statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee, American Heart Association. *Circulation*. 1997;96:3248–3250.

Elmarakby AA, Imig JD. Obesity is the major contributor to vascular dysfunction and inflammation in high-fat diet hypertensive rats. *Clin Sci (Lond)*. 2010;11:291–301.

Cuevas AM, Guasch V, Castillo O, Iribarra V, Mizon C, San Martin A, Strobel P, Perez D, Germain AM, Leighton F. A high-fat diet induces and red wine counteracts endothelial dysfunction in human volunteers. *Lipids*. 2000; 35: 143–1438.

Uematsu M, Ohara Y, Navas JP, Nishida K, Murphy TJ, Alexander RW, Nerem RM, Harrison DG. Regulation of endothelial cell nitric oxide synthase mRNA expression by shear stress. *Am J Physiol*. 1995;269:C1371–1378.

Hambrecht R, Adams V, Erbs S, Linke A, Kränkel N, Shu Y, Baither Y, Gielen S, Thiele H, Gummert JF, Mohr FW, Schuler G. Regular physical activity improves endothelial function in patients with coronary artery disease by increasing phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*. 2003;107:3152–3158.

Zhang QJ, Li QX, Zhang HF, Zhang KR, Guo WY, Wang HC, Zhou Z, Cheng HP, Ren J, Gao F. Swim training sensitizes myocardial response to insulin: role of Akt-dependent eNOS activation. *Cardiovasc Res*. 2007;75:369–380.

Ketonen J, Pilvi T, Mervaala E. Caloric restriction reverses high-fat diet-induced endothelial dysfunction and vascular superoxide production in C57Bl/6 mice. *Heart Vessels*. 2010;25:254-262.

Morrow JD. Is oxidant stress a connection between obesity and atherosclerosis? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23:368–370.

Beswick RA, Dorrance AM, Leite R, Webb RC. NADH/NADPH oxidase and enhanced superoxide production in the mineralocorticoid hypertensive rat. *Hypertension*. 2001;38:1107–1111.

Hayashi T, Juliet PA, Kano-Hayashi H, Tsunekawa T, Dingqunfang D, Sumi D, Matsui-Hirai H, Fukatsu A, Iguchi A. NADPH oxidase inhibitor, apocynin, restores the impaired endothelial-dependent and -independent responses and scavenges superoxide anion in rats with type 2 diabetes complicated by NO dysfunction. *Diabetes Obes Metab*. 2005;7:334-343.

Landmesser U, Cai H, Dikalov S, McCann L, Hwang J, Jo H, Holland SM, Harrison DG. Role of p47(phox) in vascular oxidative stress and hypertension caused by angiotensin II. *Hypertension*. 2002;40:511-5.

Adams V, Linke A, Kränkel N, Erbs S, Gielen S, Möbius-Winkler S, Gummert JF, Mohr FW, Schuler G, Hambrecht R.. Impact of regular physical activity on the NAD(P)H oxidase and angiotensin receptor system in patients with coronary artery disease. *Circulation*. 2005 8;111:555-562.

Duerrschmidt N, Stielow C, Muller G, Pagano PJ, Morawietz H. NO-mediated regulation of NAD(P)H oxidase by laminar shear stress in human endothelial cells. *J Physiol*. 2006; 576 (Pt 2):557-67.

Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*. 2003 ;112:1796-1808.

Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*. 1993;259:87-91.

Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Görgün CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M, Hotamisligil GS. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature*. 2002;420:333-336.

Yoshida LS, Tsunawaki S. Expression of NADPH oxidases and enhanced H₂O₂-generating activity in human coronary artery endothelial cells upon induction with tumor necrosis factor- α . *Int Immunopharmacol*. 2008;8:1377-1385.

Erol A. Insulin resistance is an evolutionarily conserved physiological mechanism at the cellular level for protection against increased oxidative stress. *Bioessays*. 2007;29:811-818.

Faraci FM, Didion SP. Vascular protection: Superoxide dismutase isoforms in the vessel wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24:1367–1373.

Rush JW, Turk JR, Laughlin MH. Exercise training regulates SOD-1 and oxidative stress in porcine aortic endothelium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;284:1378-1387.

TABLES AND FIGURES

Table 1. Blood pressure, Body weight, Fat mass and Citrate synthase activity

	CD-S	HFD-S	HF/CD-S	HFD-EX	HF/CD-Ex
Blood pressure (mmHg)					
Initial	126 ± 2.28	123,7 ± 2.33	127.12 ± 2.5	123.4 ± 2.8	126.5 ± 2.63
Final	132.5 ± 1.2	163.5 ± 1.23***	145.3 ± 1.75 ^{\$\$\$,*,\dagger,\text{¥}}	141 ± 0.85 ^{\$\$\$,*}	137 ± 1.5 ^{\$\$\$,*}
Body weight (g)					
Initial	219 ± 4	221 ± 4	223 ± 5	220 ± 4	220 ± 5
Final	670 ± 9	850 ± 26***	710 ± 29 ^{\$\$\$}	677 ± 28 ^{\$\$\$}	655 ± 15 ^{\$\$\$}
Retroperitoneal fat mass (g)	8.2 ± 0.4	30.6 ± 2.7***	11.5 ± 1.33 ^{\$\$\$}	15.4 ± 2.1 ^{*,\$\$\$,\text{¥}}	6.75 ± 0,17 ^{\$\$\$}
Epididymal fat mass (g)	6.4 ± 0.31	10.7 ± 0.62***	6.7 ± 0.5 ^{\$\$\$}	7.5 ± 0.84 ^{\$\$\$,\text{¥}}	5,00 ± 0,21 ^{\$\$\$}
Citrate synthase activity (nmol/min/mg protein)	110 ± 12	117 ± 8	99 ± 17	190 ± 17 ^{*,\text{¥},\dagger}	166 ± 14 ^{*,\text{¥},\dagger}

All data are expressed as mean ± SEM for CD-S, HFD-S, HF/CD-S, HFD-Ex and HF/CD-Ex rats, n = 7-10 rats/group.

* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs. CD-S,

\$ $P < 0.05$, \$\$\$ $P < 0.001$ vs. HFD-S,

† $P < 0.05$ vs. HF/CD-S,

‡ $P < 0.05$ vs. HFD-Ex,

¥ $P < 0.05$ vs. HF/CD-Ex. ,

Table 2. Plasma lipids, insulin, glucose, TNF α , IL-6 and TBARS

	CD-S	HFD-S	HF/CD-S	HFD-EX	HF/CD-Ex
Plasma total cholesterol (g/l)	0.71 \pm 0.03	0.96 \pm 0.02*	0.76 \pm 0.04 [§]	0.78 \pm 0.04 ^{§,¥}	0.68 \pm 0.01 [§]
Plasma HDL-Cholesterol (g/l)	0.21 \pm 0.01	0.22 \pm 0,01	0.21 \pm 0.01	0.28 \pm 0.01 ^{*,§,†}	0.26 \pm 0.01 ^{*,§,†}
Plasma LDL-Cholesterol (g/l)	0.22 \pm 0.03	0.47 \pm 0.04*	0.26 \pm 0.02 ^{§,¥}	0.24 \pm 0.03 [§]	0.18 \pm 0.01 [§]
Plasma triglycerides (g/l)	1.3 \pm 0.08	1.34 \pm 0,13	1.36 \pm 0.12	1.24 \pm 0.15	1.23 \pm 0.09
Plasma insulin (ng/ml)	8.2 \pm 0.73	19 \pm 2.5*	11.43 \pm 1.51 [§]	7.4 \pm 1.53 [§]	9.1 \pm 0.88 [§]
Plasma glucose (mmol/l)	10.6 \pm 0.26	13 \pm 0.55*	10.6 \pm 0.5 [§]	9.73 \pm 0.29 [§]	9.4 \pm 0.26 [§]
Plasma TNF α (pg/ml)	77.9 \pm 10.01	122.3 \pm 8.33*	61.8 \pm 10.87 [§]	50.6 \pm 6.70 [§]	71.2 \pm 16.22 [§]
Plasma IL-6 (pg/ml)	40.2 \pm 3.16	60.1 \pm 11.11*	42 \pm 4.08 [§]	32.5 \pm 4.37 [§]	36.1 \pm 4.63 [§]
Plasma TBARS (nm/ml)	2 \pm 0.05	2.43 \pm 0.22*	2.16 \pm 0.08 ^{§,‡}	1.72 \pm 0.09 [§]	1.76 \pm 0.01 [§]

All data are expressed as mean \pm SEM for CD-S, HFD-S, HF/CD-S, HFD-Ex and HF/CD-Ex rats, n = 7-10 rats/group.

HF/CD-Ex rats, n = 7-10 rats/group.

* $P < 0.05$ vs. CD-S,

[§] $P < 0.05$ vs. HFD-S,

[†] $P < 0.05$ vs. HF/CD-S,

[‡] $P < 0.05$ vs. HFD-Ex,

[¥] $P < 0.05$ vs. HF/CD-Ex.

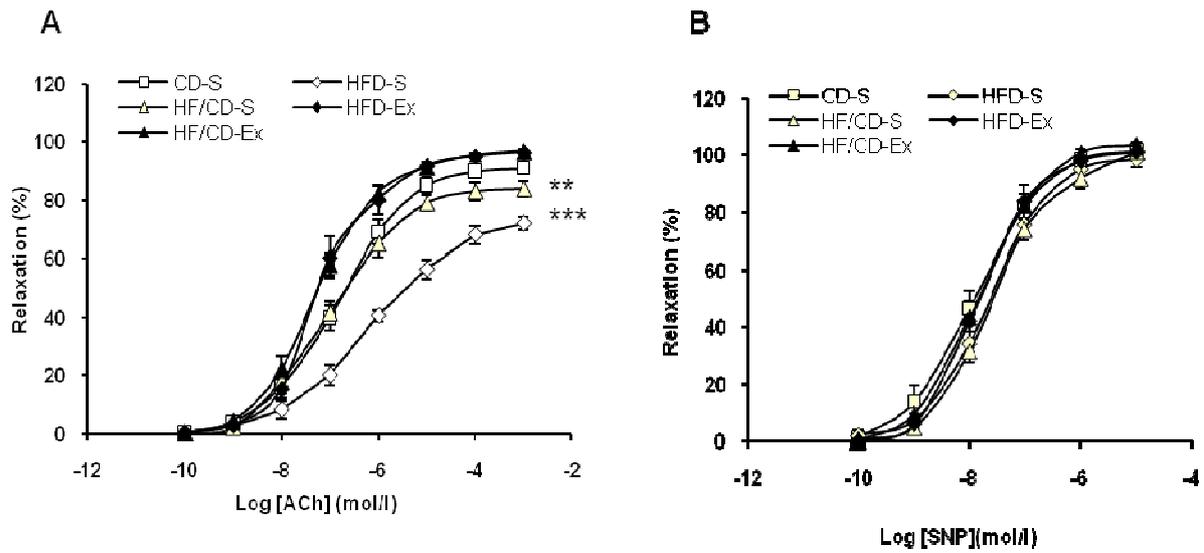


Figure 1. Dose response curves in aortic rings to acetylcholine (A) and sodium nitroprusside (B) in CD-S, HFD-S, HF/CD-S, HFD-Ex and HF/CD-Ex rats. SBP was measured every 2 weeks for 24 weeks. Results are presented as means \pm SEM. $n = 7-10$ rats/group. *** $P < 0.001$ vs. others groups, ** $P < 0.05$ vs. CD-S, HFD-Ex and HF/CD-Ex.

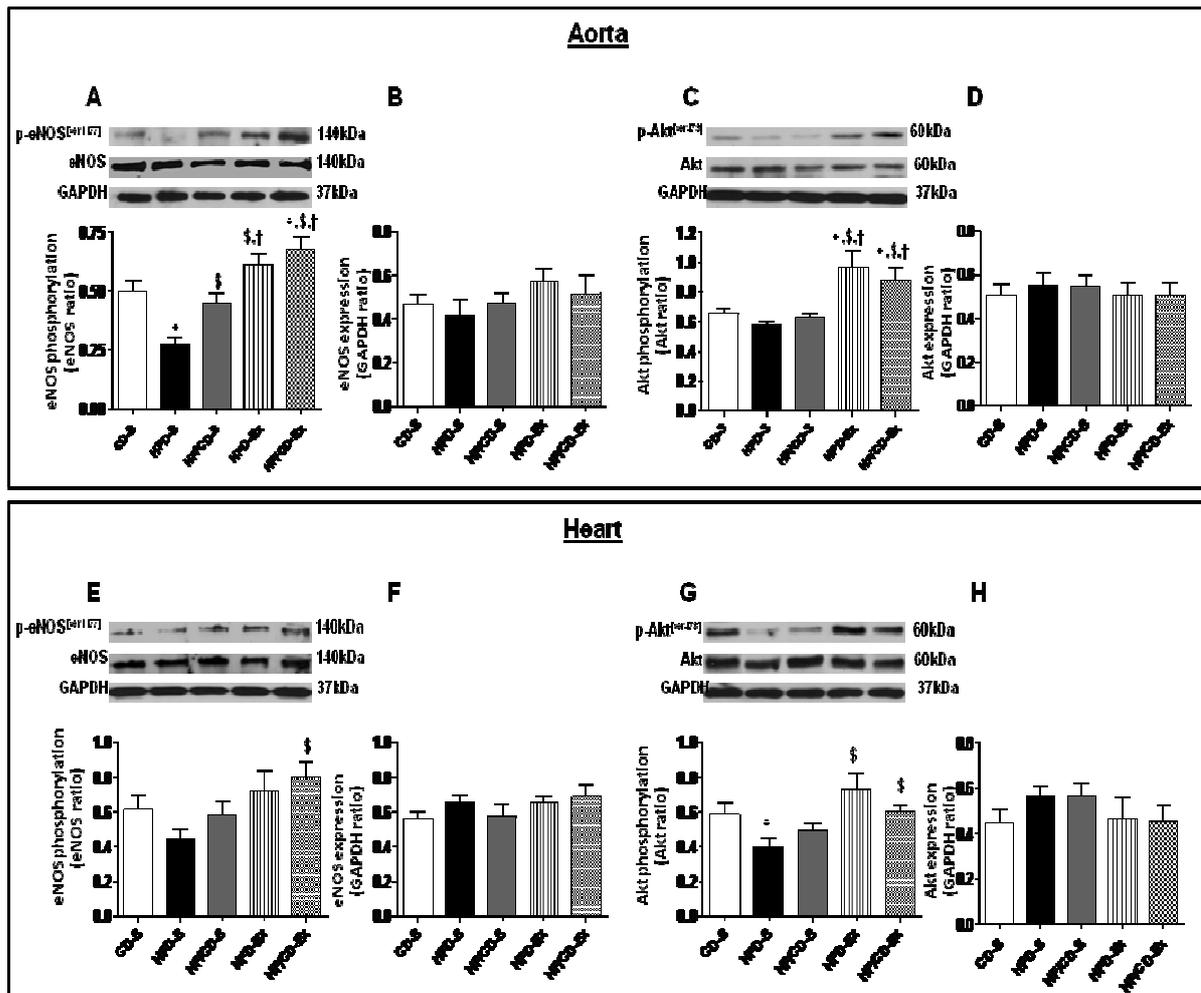


Figure 2. eNOS, p-eNOS (Ser1177), Akt and p-Akt (Ser473) expression. Upper panels, representative immunoblots for eNOS and Akt phosphorylation and expression and GAPDH expression. Lower panels, corresponding bar graphs show densitometric data for phosphorylation for eNOS in aorta (A) and in heart (E), the expression for eNOS in aorta (B) and in heart (F), the phosphorylation for Akt in aorta (C) and in heart (G) and the expression for Akt in aorta (D) and in heart (H) from CD-S, HFD-S, HF/CD-S, HFD-Ex and HF/CD-Ex rats. Results are presented as means \pm SEM of 6 or 8 experiments. * P <0.05 vs. CD-S, \$ P <0.05 vs. HFD-S, † P <0.05 vs. HF/CD-S.

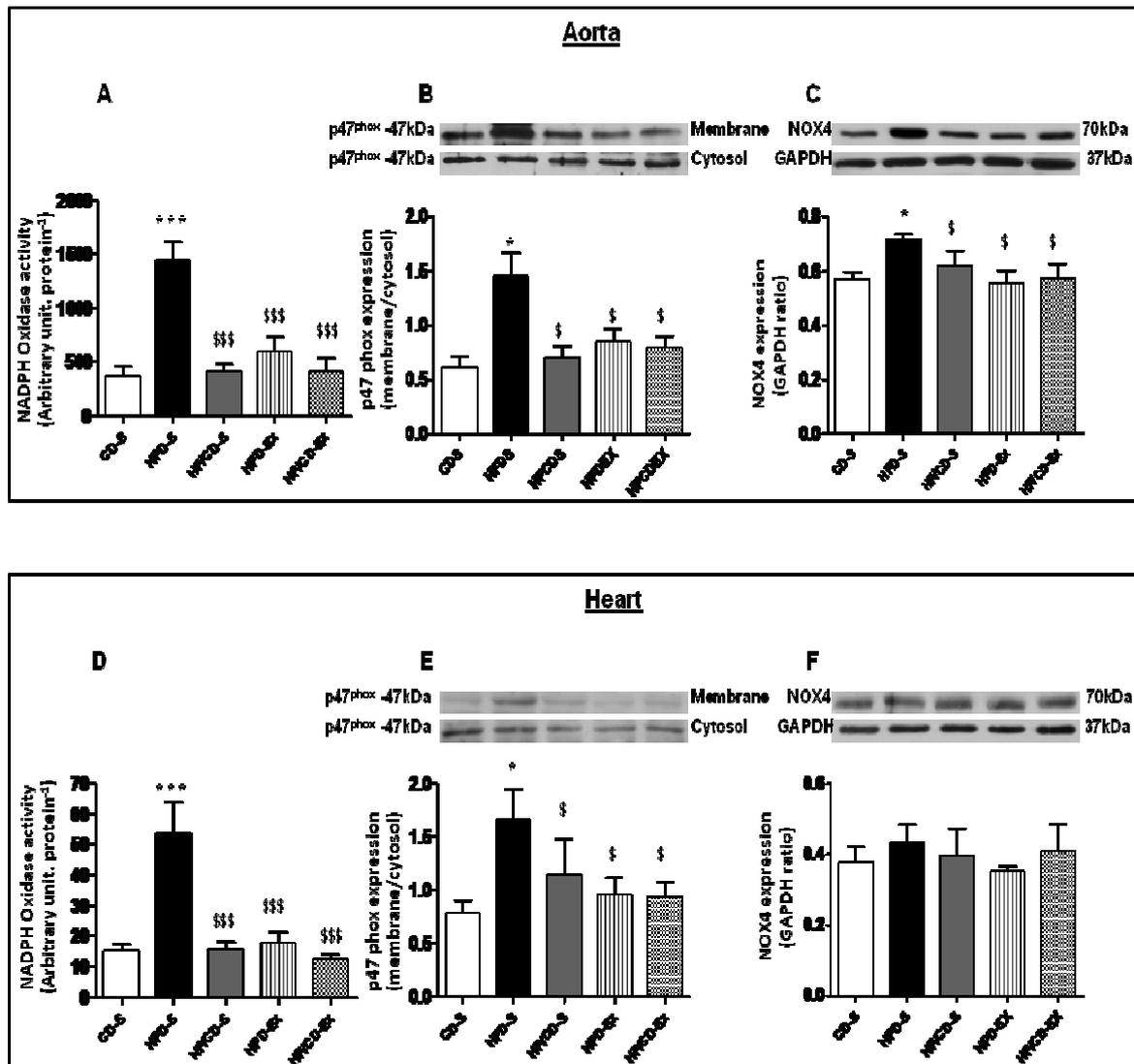


Figure 3. Bar graphs represent NAD(P)H oxidase in aorta (A) and in heart (D) homogenates evaluated by lucigenin-derived chemiluminescence activity, p47^{phox} translocation as ratio of membrane: cytosol expression in aorta (B) and in heart (E), and NOX4 protein expression in aorta (C) and in heart (F) from CD-S, HFD-S, HF/CD-S, HFD-Ex and HF/CD-Ex rats. Upper panels, representative immunoblots are shown. Results are presented as means \pm SEM of 6 or 8 experiments. * P <0.05, *** P <0.001 vs. CD-S, \$ P <0.05, \$\$\$ P <0.001 vs. HFD-S.

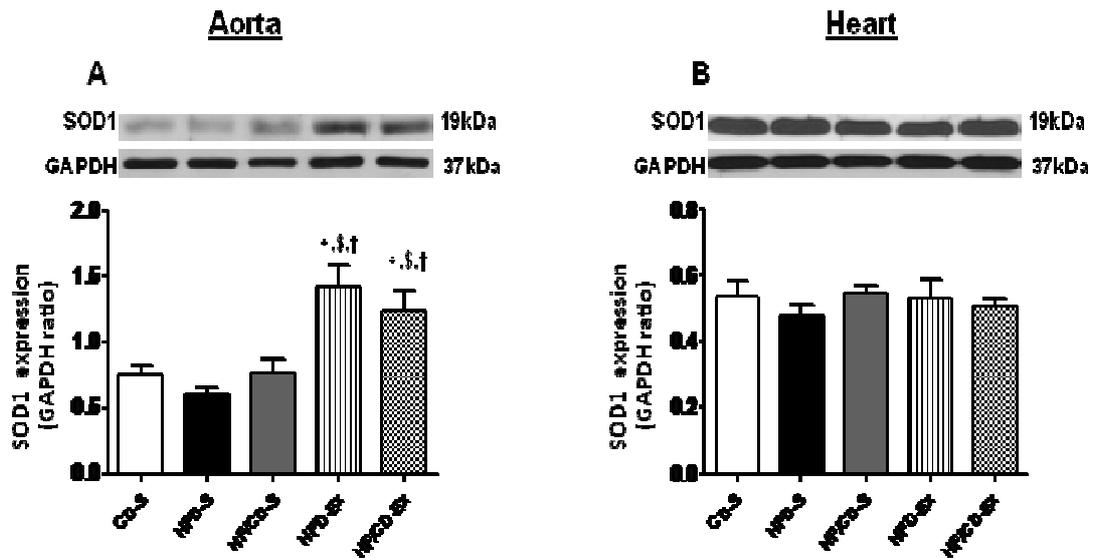


Figure 4. SOD-1 protein expression in aorta (A) and in heart (B). Upper panels, representative immunoblots for SOD-1 and GAPDH expression. Lower panels, corresponding bar graphs show densitometric data for SOD-1 expression in CD-S, HFD-S, HF/CD-S, HFD-Ex and HF/CD-Ex rats. Results are presented as means \pm SEM of 6 or 8 experiments. * $P < 0.05$ vs. CD-S, $^{\S}P < 0.05$ vs. HFD-S, $^{\dagger}P < 0.05$ vs. HF/CD-S.

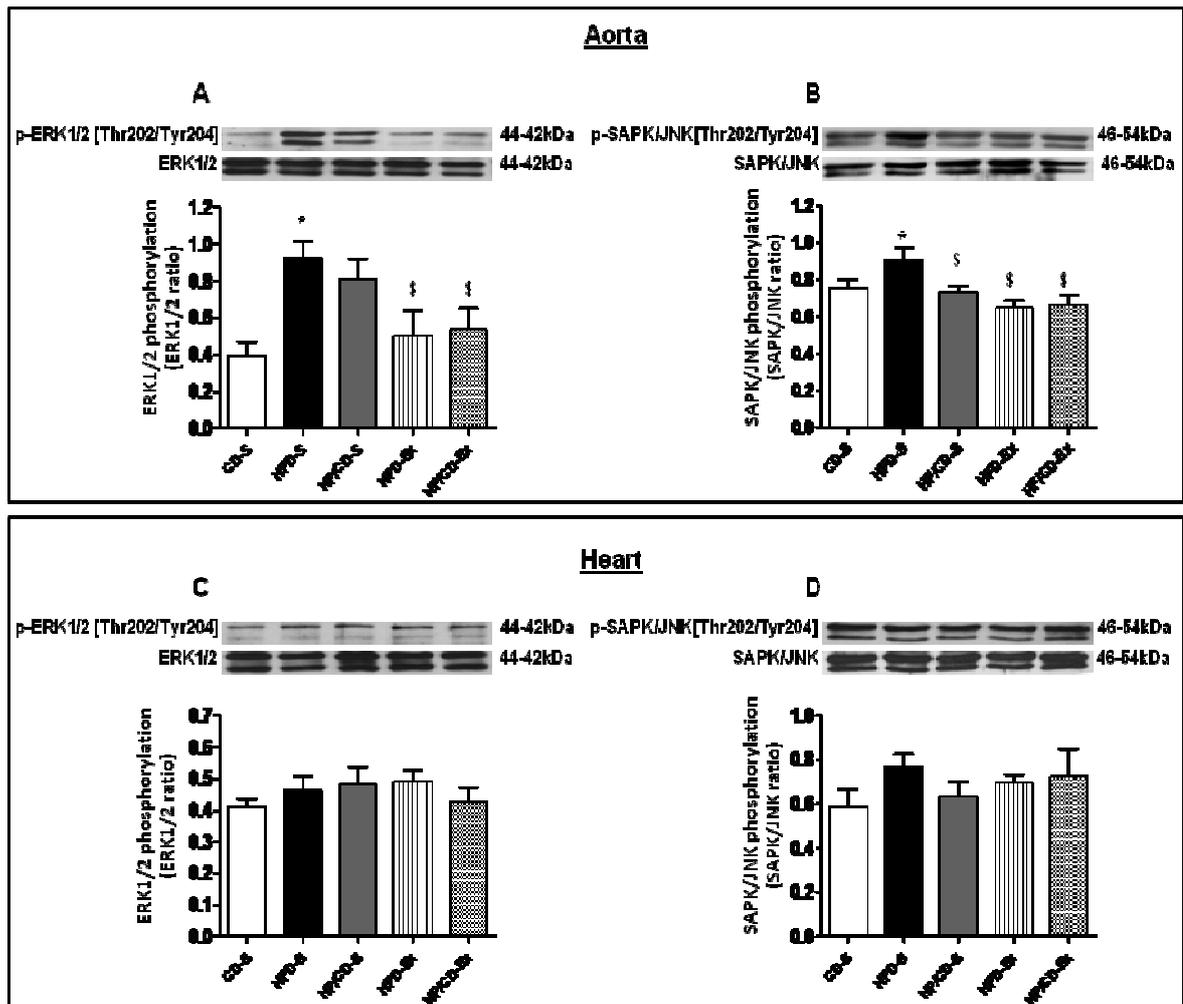


Figure 5. MAPK phosphorylation. Upper panels, representative immunoblots for MAPK protein phosphorylation and expression. Lower panels, corresponding bar graphs show densitometric data for phosphorylation of ERK 1/2 in aorta (A) and in heart (C) and SAPK/JNK in aorta (B) and in heart (D) from CD-S, HFD-S, HF/CD-S, HFD-Ex and HF/CD-Ex rats. Results are presented as means \pm SEM of 6 or 8 experiments. * $P < 0.05$ vs. CD-S, § $P < 0.05$ vs. HFD-S.

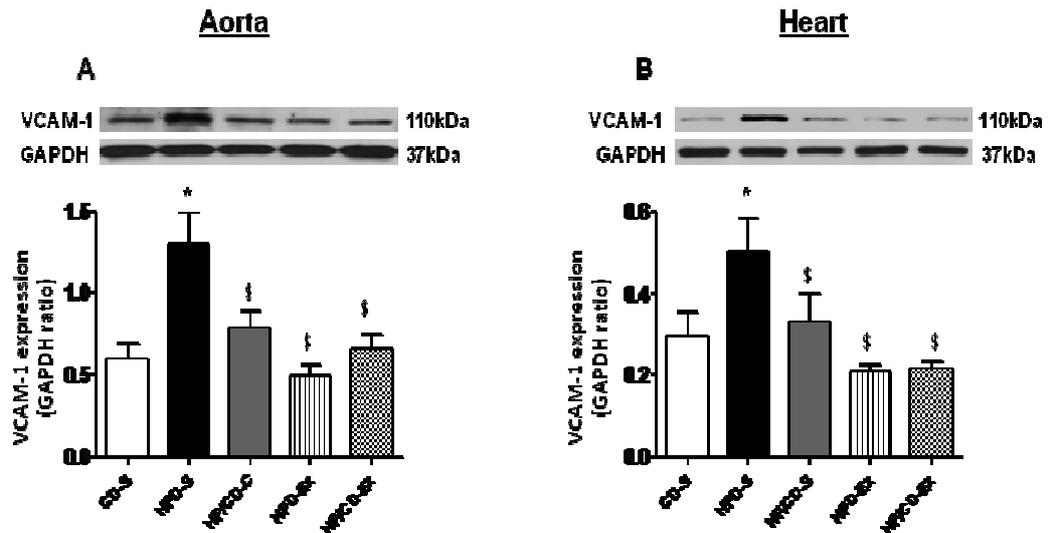


Figure 6. VCAM-1 protein expression in aorta (A) and in heart (B). Upper panels, representative immunoblots for VCAM-1 and GAPDH expression. Lower panels, corresponding bar graphs show densitometric data for VCAM-1 expression in CD-S, HFD-S, HF/CD-S, HFD-Ex and HF/CD-Ex rats. Results are presented as means \pm SEM of 6 or 8 experiments. * $P < 0.05$ vs. CD-S, \$ $P < 0.05$ vs. HFD-S.

4. Discussion et conclusion

L'obésité est souvent associée à une dysfonction endothéliale et à un risque athérogène important (Eckel et coll., 1997 ; Elmarakby et coll., 2010). Cependant, la nature exacte de cette relation reste encore à définir. Le stress oxydatif semble être un des principaux maillons reliant l'obésité à la dysfonction endothéliale ainsi qu'au risque athérogène. Le principal résultat de cette étude est que l'exercice physique, associé ou non à un changement du régime alimentaire (du régime hyperlipidique au normo-lipidique), est capable de corriger la dysfonction endothéliale induite par la consommation chronique d'un régime alimentaire hyperlipidique. Cet effet thérapeutique de l'exercice semble lié à une amélioration du stress oxydatif au niveau vasculaire *via* une diminution de l'activité de la NADPH oxydase, et une stimulation des défenses antioxydantes *via* une augmentation de l'expression de la SOD1, suggérant ainsi une augmentation de la biodisponibilité du NO.

Le stress oxydatif semble jouer un rôle crucial dans le développement de la dysfonction endothéliale dans l'obésité (Morrow et coll., 2003). Dans notre étude, nous nous sommes intéressés principalement à l'étude du complexe enzymatique NADPH oxydase au niveau cardiovasculaire. Ainsi nous avons, dans un premier temps, mesuré l'activité totale de la NADPH oxydase, puis par la suite nous avons évalué l'activation de ce complexe par la mesure de la translocation du cytosol vers la membrane cellulaire, de la sous-unité p47^{phox} (principal acteur dans l'activation de la NADPH oxydase), et enfin nous avons déterminé l'expression des sous-unités membranaires de la NADPH oxydase, à savoir Nox1, Nox2 et Nox4. Nos résultats montrent que le régime alimentaire a induit une augmentation de l'activité de la NADPH oxydase au niveau de l'aorte et du cœur dans le groupe de rats obèses par rapport aux rats contrôles. D'une façon intéressante, la translocation de la sous-unité p47^{phox} vers la membrane cellulaire est augmentée aussi dans le groupe obèse par rapport aux

rats normaux, suggérant que l'obésité stimule l'activation du complexe NADPH oxydase. Nos résultats mettent aussi en évidence une augmentation de l'expression de la Nox4 au niveau de l'aorte et non celle de la Nox1 ou de la Nox2, suggérant que la Nox4 serait la principale source de génération de ROS au niveau vasculaire au cours de l'obésité. Dans cette étude, la modification du style de vie supprime le stress oxydatif au niveau cardiovasculaire. En effet, nos résultats montrent une diminution de l'activité totale de la NADPH oxydase dans les groupes intervention. De plus, nous montrons pour la première fois que l'exercice et/ou le changement de la diète inhibe la translocation de la sous-unité p47^{phox} au niveau cardiovasculaire. Notre étude démontre également que l'exercice ou le changement de la diète diminue l'expression de la Nox4 au niveau vasculaire.

D'autre part, nous avons considéré que l'obésité induit une diminution des défenses antioxydantes de l'organisme. C'est pourquoi nous avons déterminé l'expression de la SOD1 au niveau de l'aorte et du cœur. Nos résultats montrent que l'expression de la SOD1 n'est pas affectée par le régime hyperlipidique. D'une façon remarquable, notre étude montre que l'exercice, indépendamment de la diète utilisée, augmente l'expression de cette enzyme antioxydante au niveau vasculaire. Le changement de la diète n'affecte pas l'expression de la SOD1. Ces observations montrent bien que seul l'exercice est capable de stimuler les défenses antioxydantes de l'organisme.

En somme, l'exercice physique et/ou le changement de la diète sont capables de corriger les facteurs de risque cardiovasculaires liés à l'obésité incluant la dysfonction endothéliale et l'hypertension artérielle, avec un effet bénéfique plus prononcé de l'exercice. Cet effet anti-athérogène semble lié à une amélioration du stress oxydatif au niveau cardiovasculaire via une diminution de l'expression/activité de la NADPH oxydase et une augmentation de l'expression de la SOD1.



**DISCUSSION GÉNÉRALE ET
CONCLUSION**

La prévalence de l'obésité est en constante augmentation dans nos pays occidentaux. Parmi les causes les plus souvent citées par la littérature scientifique pour expliquer l'émergence de ce fléau, on retrouve les facteurs constituant le «Big Two», soit la sédentarité et la mauvaise hygiène alimentaire. Malgré la récente prise de conscience des pouvoirs publics, et les efforts déployés pour promouvoir des habitudes alimentaires plus saines et la pratique du sport (on peut citer en exemple les campagnes publicitaires découlant du Programme National Nutrition Santé, 2001), il reste encore beaucoup à faire pour parvenir à sensibiliser l'ensemble de la population. Or, les différentes études menées à ce sujet montrent bien l'importance d'adopter un mode de vie sain, lequel joue un rôle à la fois préventif et curatif. Il apparaît donc aujourd'hui primordial de poursuivre la recherche scientifique en ce sens, car les résultats obtenus constitueront un levier d'action fort, et permettront ainsi de conforter l'Etat sur le bien-fondé de toute action entreprise dans ce domaine. C'est bien là la volonté qui sous-tend notre travail, qui nous l'espérons permettra d'enrichir les connaissances scientifiques existantes.

Nos résultats montrent que la pratique régulière de l'exercice physique, avec ou sans modification des habitudes alimentaires, corrige les facteurs de risque cardiovasculaire apparus lors du développement de l'obésité. En effet, l'exercice physique aérobie, même avec la consommation régulière d'un régime alimentaire « Obésogène » et « Athérogène », est capable de traiter les composantes cliniques du syndrome métabolique incluant l'hypertension artérielle, l'insulinorésistance et la dyslipidémie. Ces résultats ne concordent pas totalement avec les recommandations actuelles concernant la prise en charge de l'obésité et du syndrome métabolique (PNNS, 2001). En fait, ces dernières insistent sur une modification du style de vie globale, et ne dissocient jamais l'approche nutritionnelle de la pratique régulière de l'exercice physique. De même, dans la pratique clinique, l'approche nutritionnelle et le traitement pharmacologique semblent être en première ligne dans la prise en charge de

l'obésité et de ses complications associées (Dickerson et Carek, 2009; Shewmake et Huntington, 2009), bien que l'approche nutritionnelle optimale ne fasse pas toujours l'objet d'un consensus (Foreyt et coll., 2009). Nos résultats soulèvent ainsi plusieurs questions sur les stratégies choisies dans le cadre de la prévention et du traitement de l'obésité. Par exemple, la pratique régulière d'une activité physique sans modification des habitudes alimentaires prévient-elle le développement de l'obésité ? Le réentraînement à l'effort sans approche nutritionnelle ou pharmacologique traite-t-il les facteurs de risque cardiovasculaire associés à l'obésité ? D'autres travaux supplémentaires notamment cliniques sont nécessaires pour répondre à ces questions, ainsi que pour définir l'intensité et le volume d'exercice préconisé, dans le cadre de la prévention ou du traitement.

Nos résultats mettent également en lumière les mécanismes moléculaires sous-jacents par lesquels l'exercice exerce son rôle anti-athérogène et améliore ainsi la fonction vasculaire. L'exercice physique semble corriger la dysfonction endothéliale, via une amélioration de la production/biodisponibilité du NO. Nos résultats montrent que la pratique régulière d'exercice, avec ou sans modification du régime alimentaire, améliore la voie signalétique de la eNOS, probablement suite à une élévation des forces de cisaillement. En effet, l'exercice physique, à travers les forces de cisaillement, stimule la phosphorylation de l'Akt sur la serine 478, qui elle-même à son tour entraîne la phosphorylation de la eNOS sur la sérine 1177, suggérant une augmentation de l'activité de la eNOS. Nos résultats confirment les études antérieures qui avaient démontré une amélioration de la voie Akt/eNOS phosphorylée suite à un programme d'exercice physique autant chez l'homme (Hambrecht et coll., 2003) que chez l'animal (Moien-Afshari et coll., 2008). Ainsi, nous suggérons que l'amélioration de cette voie signalétique représente un important mécanisme vasculo-protecteur de l'exercice.

D'autre part, l'activité physique semble aussi avoir un potentiel antioxydant. À cet égard, nous montrons que la pratique régulière de l'exercice en endurance est accompagnée d'une augmentation de l'expression de la SOD1 au niveau de l'aorte. Nos résultats sont en accord avec des travaux antérieurs qui ont démontré que l'exercice physique, via l'accroissement des forces de cisaillement, augmente l'expression de cette enzyme et améliore ainsi la fonction endothéliale (de Moraes et coll., 2008 ; Rush et coll., 2003).

La NADPH oxydase représente la principale source de production des ROS au niveau vasculaire et joue un rôle important dans le développement de la dysfonction endothéliale et de l'hypertension artérielle (Paravicini et Touyz, 2008 ; Sedeek et coll., 2009). Il semble qu'il existe une relation entre l'activation du système rénine angiotensine (RAS) et celle de la NADPH oxydase. Il a été démontré que l'association de l'angiotensine II à son récepteur AT1, au niveau des cellules musculaires lisses vasculaires, stimule la phosphorylation et la translocation de la sous-unité p47^{phox} du cytosol vers la membrane, entraînant ainsi l'activation du système NADPH oxydase (Touyz et coll., 2003). De même, Landmesser et coll., (2002) ont mis en évidence que l'administration de l'angiotensine II entraîne une augmentation de la production de l'O₂⁻ chez la souris standard, contrairement à la souris p47^{phox}^{-/-}, démontrant ainsi le rôle crucial de la p47^{phox} dans l'activation de la NADPH oxydase, induite par l'angiotensine II. De plus, Adams et coll., (2005) ont montré, chez les patients coronariens, une relation positive entre l'augmentation du rapport AT₁/AT₂ et l'activité de la NADPH oxydase au niveau des artères mammaires. Dans notre étude, l'augmentation de l'activité de la NADPH oxydase, ainsi que la translocation de la p47^{phox} chez les rats obèses au niveau de l'aorte et du cœur, n'étaient pas associées à une activation du système RAS, puisque l'expression des récepteurs AT₁ et AT₂ n'était pas altérée. De plus, l'exercice physique diminue l'activité de la NADPH oxydase et module la translocation de la p47^{phox} au niveau du cœur et de l'aorte, sans pour autant diminuer l'expression des AT₁ et

AT₂. Ces résultats indiquent que l'inactivation de la NADPH oxydase par l'entraînement dans notre modèle passe par une voie indépendante du système RAS. Nos résultats ne sont pas en accord avec les travaux antérieurs qui ont effectivement démontré que l'exercice physique, via l'accroissement des forces de cisaillement, induit une réduction de l'expression des récepteurs AT₁ associée à une diminution de l'activité de la NADPH oxydase au niveau vasculaire chez les patients coronariens (Adams et coll., 2005).

Ainsi, nous suggérons que l'exercice physique module l'activité et l'expression de la NADPH oxydase, par une voie indépendante d'une modification de l'expression des récepteurs AT₁ et du RAS. Récemment, il a été rapporté *in-vitro* que l'exposition prolongée (24 heures) des cellules endothéliales humaines à des forces de cisaillement entraîne une réduction de la production de l'O₂⁻, ainsi qu'une diminution de l'expression des ARNm et des protéines des sous-unités de la NADPH oxydase Nox2 et p47^{phox}. Cet effet disparaît lorsqu'on inhibe la eNOS par le L-NAME, démontrant ainsi un effet direct du NO dans la régulation de la NADPH oxydase (Duerrschmidt et coll., 2006). Ainsi, nous suggérons que l'exercice, via l'accroissement des forces de cisaillement, module l'expression et l'activité de la NADPH oxydase par une voie NO-dépendante (figure 7), et que cette dernière représente un important mécanisme par lequel l'exercice physique exerce son rôle anti-athérogène et vasculo-protecteur.

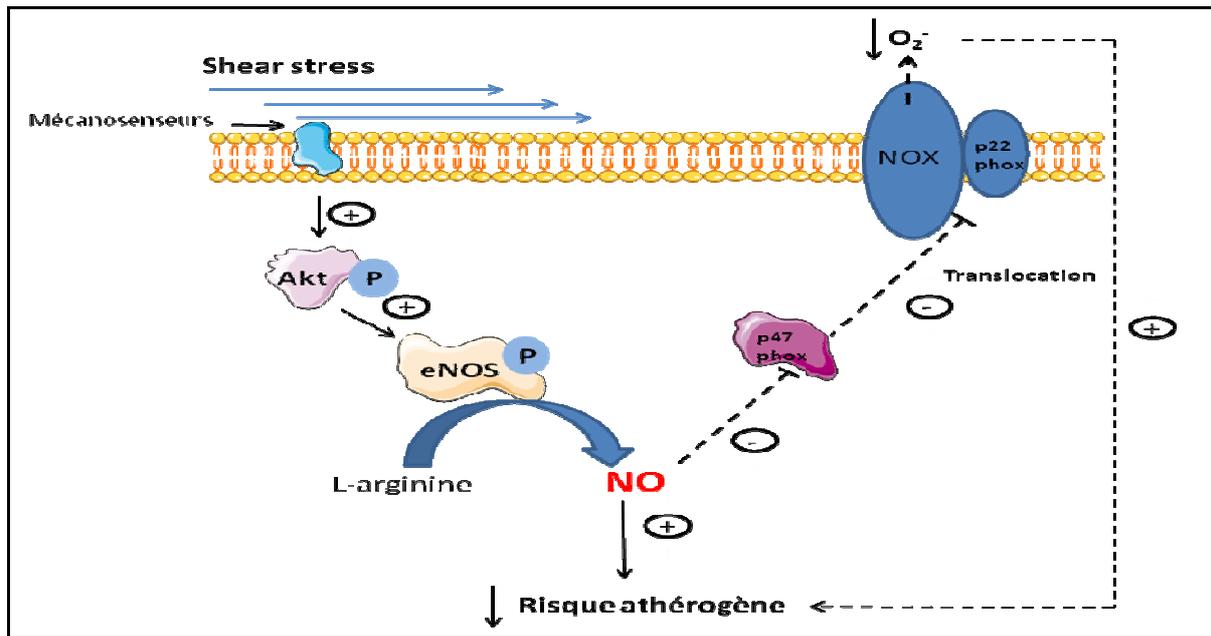


Figure 7. Proposition des mécanismes expliquant la voie d'inhibition de la NADPH oxydase NO-dépendante.

Nous montrons aussi que le changement de la diète seul est capable de moduler l'expression et l'activité de la NADPH oxydase. Cet effet semble indépendant de la voie Akt/eNOS phosphorylée puisque la phosphorylation de l'Akt n'est pas affectée par la modification du régime. Comme nous l'avons mentionné précédemment, l'obésité est associée à un état inflammatoire chronique caractérisé par une infiltration des macrophages au niveau du tissu adipeux, et que ces derniers sont responsables de la majeure partie de la production des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α (Weisberg et coll., 2003 ; Xu et coll., 2003). Cette production anormale de TNF- α joue un rôle direct dans le développement de la résistance à l'insuline (Rui et coll., 2001 ; Ozes et coll., 2001). Cette cytokine peut également activer la JNK, qui, à son tour, peut jouer un rôle dans l'insulino-résistance (Hirosumi et coll., 2002). De plus, il a été rapporté *in-vitro* que l'exposition prolongée des cellules endothéliales humaines en culture au TNF- α entraîne une augmentation

de la production des ROS, via une augmentation de l'expression de la Nox2 et de la Nox4 (Yoshida et coll., 2008). Les ROS peuvent également à leur tour activer la voie de la JNK (Erol, 2007), jouant ainsi un rôle dans le développement de la résistance à l'insuline. Or, nos résultats préliminaires à ce sujet montrent que l'obésité augmente les taux plasmatiques de TNF- α , et que le changement de la diète les normalise. Il est possible que la réduction de la masse adipeuse viscérale, engendrée par la modification du régime, induit une diminution de l'infiltration des macrophages. Cela engendre une diminution de la production de TNF- α , ce qui peut entraîner d'une façon directe ou indirecte une amélioration de l'insulinorésistance, diminuant ainsi le risque athérogène (figure 8). Cependant, cette relation reste à confirmer dans des études futures.

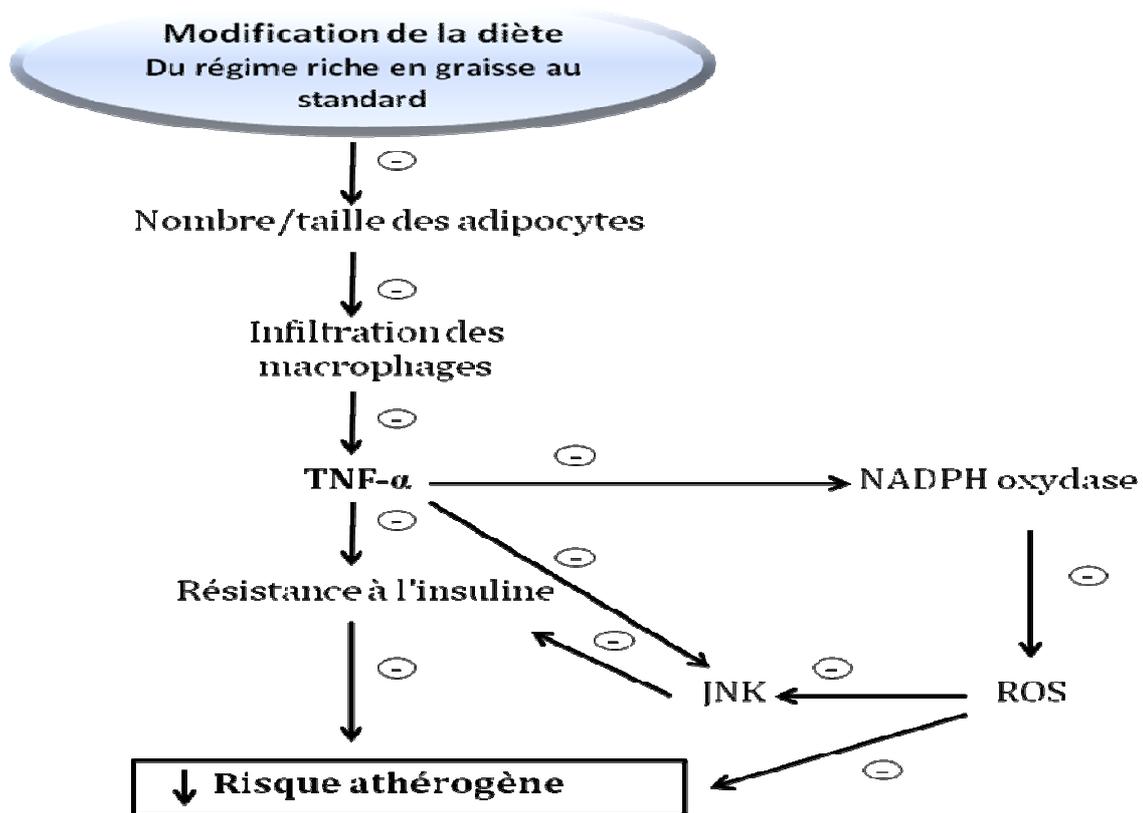
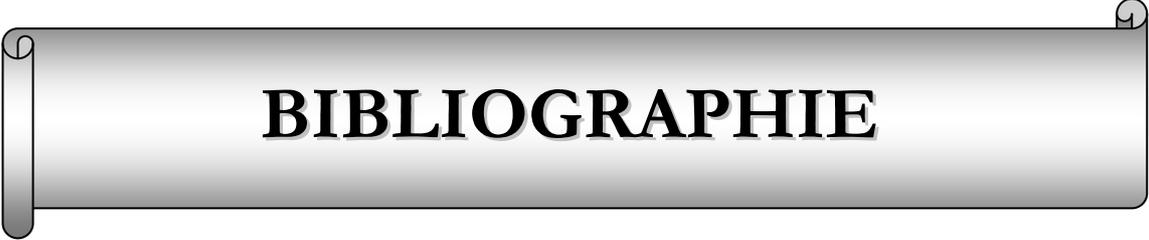


Figure 8. Proposition des mécanismes expliquant la diminution du risque athérogène par la modification du régime alimentaire dans l'obésité. L'exercice physique peut agir de façon similaire.

Ainsi, notre étude montre bien que l'exercice physique et/ou la modification du régime alimentaire diminue le stress oxydatif au niveau cardiovasculaire, via une modulation de l'expression/l'activité de la NADPH oxydase. Cependant, la littérature scientifique montre que les ROS sont générés par une multitude d'enzymes autre que le système NADPH oxydase, comme la xanthine oxydase, les cyclooxygénases, ou encore l'enzyme eNOS découplé, (Cai et Harrison, 2000; Wassamann et coll., 2004). Or, dans notre étude, nous n'avons pas pu déterminer la contribution exacte du complexe enzymatique NADPH oxydase dans la production des ROS, car nous n'avons pas inhibé ce système *in-vivo*. Il serait donc nécessaire de procéder à d'autres études pour mieux le comprendre, en l'inhibant.

D'autre part, nous avons rapporté que l'obésité entraîne une activation de la NADPH oxydase via l'augmentation de la translocation de la p47^{phox} du compartiment cytosolique vers la membrane. Parallèlement, nous avons observé chez les rats obèses une augmentation de l'expression de la Nox4 alors que celle des Nox1 et Nox2 était similaire dans tous les groupes. Bien que ce résultat soit intéressant, le lien direct entre la translocation de la p47^{phox} et l'expression/l'activité de la Nox4 est controversé. Plusieurs auteurs, suggèrent que la régulation de la Nox4 se fait d'une façon indépendante de la p47^{phox} (Shiose et coll., 2001 ; Serrander et coll., 2007). Ainsi pour mieux comprendre nos résultats, il nous paraît indispensable d'étudier dans des travaux futurs, la relation exacte entre la translocation de la p47^{phox} et l'expression de la Nox4. Pour ce faire, nous proposons d'inhiber d'une façon spécifique la phosphorylation et la translocation de la p47^{phox}. Nous proposons également de déterminer la contribution directe de TNF- α dans la régulation de la Nox4. Nous supposons que l'obésité entraîne une augmentation de l'expression de la Nox4 via une voie TNF- α dépendante.

En conclusion, l'exercice physique, indépendamment de la diète utilisée, est capable de supprimer le risque athérogène lié à l'obésité. Cet effet vasculo-protecteur de l'exercice semble lié à une augmentation de la production/biodisponibilité du NO via 1) une amélioration de la voie Akt/eNOS phosphorylée, 2) une diminution de l'activité de la NADPH oxydase et 3) une augmentation de l'expression des enzymes antioxydantes comme la SOD1. Ainsi, l'exercice physique, associé ou non à un changement des habitudes alimentaires, devrait être considéré comme une stratégie privilégiée, à la fois sur le volet préventif et thérapeutique, pour combattre l'émergence de l'obésité et des maladies cardiovasculaires. Il est donc primordial de promouvoir la pratique des activités physiques et sportives dans notre société, ce qui passe obligatoirement par une démarche éducative, afin que le grand public puisse comprendre et intégrer l'intérêt de ces pratiques dans leur vie quotidienne, et soit sensibilisé aux effets bénéfiques que cela peut avoir sur la santé et le bien être en général.



BIBLIOGRAPHIE

A

Adams, V. et al. Impact of regular physical activity on the NAD(P)H oxidase and angiotensin receptor system in patients with coronary artery disease. *Circulation* **111**, 555-562 (2005).

Adams, B.J., Carr, J.G., Ozonoff, A., Lauer, M.S. & Balady, G.J. Effect of exercise training in supervised cardiac rehabilitation programs on prognostic variables from the exercise tolerance test. *Am. J. Cardiol* **101**, 1403-1407 (2008).

Agouni, A. et al. Red wine polyphenols prevent metabolic and cardiovascular alterations associated with obesity in Zucker fatty rats (Fa/Fa). *PLoS ONE* **4**, e5557 (2009).

Aguirre, V., Uchida, T., Yenush, L., Davis, R. & White, M.F. The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). *J. Biol. Chem* **275**, 9047-9054 (2000).

Aguirre, V. et al. Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action. *J. Biol. Chem* **277**, 1531-1537 (2002).

Alberti, K.G.M.M., Zimmet, P. & Shaw, J. The metabolic syndrome--a new worldwide definition. *Lancet* **366**, 1059-1062 (2005).

Aldhahi, W. & Hamdy, O. Adipokines, inflammation, and the endothelium in diabetes. *Curr. Diab. Rep* **3**, 293-298 (2003).

Alexander, C.M., Landsman, P.B., Teutsch, S.M. & Haffner, S.M. NCEP-defined metabolic syndrome, diabetes, and prevalence of coronary heart disease among NHANES III participants age 50 years and older. *Diabetes* **52**, 1210-1214 (2003).

Anderson, T.J. et al. Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations. *J. Am. Coll. Cardiol* **26**, 1235-1241 (1995).

ANAES, Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé. Prise en charge de l'obésité de l'enfant et de l'adolescent, Septembre 2003. Service des recommandations professionnelles.

Atamer, A. et al. The importance of paraoxonase 1 activity, nitric oxide and lipid peroxidation in hepatosteatosis. *J. Int. Med. Res* **36**, 771-776 (2008).

Aude, Y.W., Mego, P. & Mehta, J.L. Metabolic syndrome: dietary interventions. *Curr. Opin. Cardiol* **19**, 473-479 (2004).

B

Balkau, B. et al. International Day for the Evaluation of Abdominal Obesity (IDEA): a study of waist circumference, cardiovascular disease, and diabetes mellitus in 168,000 primary care patients in 63 countries. *Circulation* **116**, 1942-1951 (2007).

Bassett, D.R., Schneider, P.L. & Huntington, G.E. Physical activity in an Old Order Amish community. *Med Sci Sports Exerc* **36**, 79-85 (2004).

Bedard, K. & Krause, K. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev* **87**, 245-313 (2007).

Boulanger, C.M. Secondary endothelial dysfunction: hypertension and heart failure. *J. Mol. Cell. Cardiol* **31**, 39-49 (1999).

Bourgoin, F. et al. Endothelial and vascular dysfunctions and insulin resistance in rats fed a high-fat, high-sucrose diet. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol* **295**, H1044-H1055 (2008).

Bray, G.A. & Popkin, B.M. Dietary fat intake does affect obesity! *Am. J. Clin. Nutr* **68**, 1157-1173 (1998).

Brochu, M. et al. Visceral adipose tissue is an independent correlate of glucose disposal in older obese postmenopausal women. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **85**, 2378-2384 (2000).

C

Cai, H. & Harrison, D.G. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ. Res* **87**, 840-844 (2000).

Calle, E.E., Thun, M.J., Petrelli, J.M., Rodriguez, C. & Heath, C.W. Body-mass index and mortality in a prospective cohort of U.S. adults. *N. Engl. J. Med* **341**, 1097-1105 (1999).

Canello, R. et al. Increased infiltration of macrophages in omental adipose tissue is associated with marked hepatic lesions in morbid human obesity. *Diabetes* **55**, 1554-1561 (2006).

Capeau, J. [Insulin signaling: mechanisms altered in insulin resistance]. *Med Sci (Paris)* **21 Spec No**, 34-39 (2005).

Carey, D.G., Jenkins, A.B., Campbell, L.V., Freund, J. & Chisholm, D.J. Abdominal fat and insulin resistance in normal and overweight women: Direct measurements reveal a strong relationship in subjects at both low and high risk of NIDDM. *Diabetes* **45**, 633-638 (1996).

Chen, S.T., Maruthur, N.M. & Appel, L.J. The Effect of Dietary Patterns on Estimated Coronary Heart Disease Risk: Results From the Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) Trial. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes* **3**, 484-489 (2010).

Chicco, A.J. et al. Low-intensity exercise training delays heart failure and improves survival in female hypertensive heart failure rats. *Hypertension* **51**, 1096-1102 (2008).

Chou, S. et al. Gender-specific effects of caloric restriction on the balance of vascular nitric oxide and superoxide radical. *Cardiovasc. Res* **87**, 751-759 (2010).

Church, T.S. et al. Associations between cardiorespiratory fitness and C-reactive protein in men. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* **22**, 1869-1876 (2002).

Clinical Guidelines on the Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults--The Evidence Report. National Institutes of Health. *Obes. Res* **6 Suppl 2**, 51S-209S (1998).

Coker, R.H. et al. The impact of exercise training compared to caloric restriction on hepatic and peripheral insulin resistance in obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **94**, 4258-4266 (2009).

Colbert, L.H. et al. Physical activity, exercise, and inflammatory markers in older adults: findings from the Health, Aging and Body Composition Study. *J Am Geriatr Soc* **52**, 1098-1104 (2004).

Coppack, S.W. Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue. *Proc Nutr Soc* **60**, 349-356 (2001).

Corson, M.A. et al. Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress. *Circ. Res* **79**, 984-991 (1996).

Cox, D.A. et al. Atherosclerosis impairs flow-mediated dilation of coronary arteries in humans. *Circulation* **80**, 458-465 (1989).

Cuevas, A.M. et al. A high-fat diet induces and red wine counteracts endothelial dysfunction in human volunteers. *Lipids* **35**, 143-148 (2000).

Curb, J.D. & Marcus, E.B. Body fat and obesity in Japanese Americans. *Am. J. Clin. Nutr* **53**, 1552S-1555S (1991).

Cuzzocrea, S. et al. Superoxide: a key player in hypertension. *FASEB J* **18**, 94-101 (2004).

D

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

Dantas, E.M. et al. Effects of chronic treadmill training on body mass gain and visceral fat accumulation in overfed rats. *Braz. J. Med. Biol. Res* **43**, 515-521 (2010).

Davies, M.J. Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **305**, 761-770 (2003).

Davy, K.P. & Hall, J.E. Obesity and hypertension: two epidemics or one? *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol* **286**, R803-813 (2004).

De Filippis, E. et al. Exercise-induced improvement in vasodilatory function accompanies increased insulin sensitivity in obesity and type 2 diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **91**, 4903-4910 (2006).

- de Lemos, E.T. et al. Exercise training is associated with improved levels of C-reactive protein and adiponectin in ZDF (type 2) diabetic rats. *Med. Sci. Monit* **13**, BR168-174 (2007).
- de Moraes, C., Davel, A.P.C., Rossoni, L.V., Antunes, E. & Zanesco, A. Exercise training improves relaxation response and SOD-1 expression in aortic and mesenteric rings from high caloric diet-fed rats. *BMC Physiol* **8**, 12 (2008).
- Deanfield, J. et al. Endothelial function and dysfunction. Part I: Methodological issues for assessment in the different vascular beds: a statement by the Working Group on Endothelin and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. *J. Hypertens* **23**, 7-17 (2005).
- Deheeger, M., Rolland-Cachera, M.F. & Fontvieille, A.M. Physical activity and body composition in 10 year old French children: linkages with nutritional intake? *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord* **21**, 372-379 (1997).
- Dekker, J.M. et al. Metabolic syndrome and 10-year cardiovascular disease risk in the Hoorn Study. *Circulation* **112**, 666-673 (2005).
- DeLeo, F.R. & Quinn, M.T. Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: molecular interaction of oxidase proteins. *J. Leukoc. Biol* **60**, 677-691 (1996).
- Després, J. Is visceral obesity the cause of the metabolic syndrome? *Ann. Med* **38**, 52-63 (2006).
- Dickerson, L.M. & Carek, P.J. Pharmacotherapy for the obese patient. *Prim. Care* **36**, 407-415 (2009).
- Dobrian, A.D., Davies, M.J., Schriver, S.D., Lauterio, T.J. & Prewitt, R.L. Oxidative stress in a rat model of obesity-induced hypertension. *Hypertension* **37**, 554-560 (2001).
- Domenico, R. Pharmacology of nitric oxide: molecular mechanisms and therapeutic strategies. *Curr. Pharm. Des* **10**, 1667-1676 (2004).
- Duerrschmidt, N., Stielow, C., Muller, G., Pagano, P.J. & Morawietz, H. NO-mediated regulation of NAD(P)H oxidase by laminar shear stress in human endothelial cells. *J. Physiol. (Lond.)* **576**, 557-567 (2006).
- Durrant, J.R. et al. Voluntary wheel running restores endothelial function in conduit arteries of old mice: direct evidence for reduced oxidative stress, increased superoxide dismutase activity and down-regulation of NADPH oxidase. *J. Physiol. (Lond.)* **587**, 3271-3285 (2009).
- Dyer, A.R. et al. Ten-year incidence of elevated blood pressure and its predictors: the CARDIA study. Coronary Artery Risk Development in (Young) Adults. *J Hum Hypertens* **13**, 13-21 (1999).

E

Ebbeling, C.B., Pawlak, D.B. & Ludwig, D.S. Childhood obesity: public-health crisis, common sense cure. *Lancet* **360**, 473-482 (2002).

Erol, A. Insulin resistance is an evolutionarily conserved physiological mechanism at the cellular level for protection against increased oxidative stress. *Bioessays* **29**, 811-818 (2007).

Ellekjaer, H., Holmen, J., Ellekjaer, E. & Vatten, L. Physical activity and stroke mortality in women. Ten-year follow-up of the Nord-Trondelag health survey, 1984-1986. *Stroke* **31**, 14-18 (2000).

Esposito, K. et al. Effect of a mediterranean-style diet on endothelial dysfunction and markers of vascular inflammation in the metabolic syndrome: a randomized trial. *JAMA* **292**, 1440-1446 (2004).

F

Fagard, R.H. Exercise is good for your blood pressure: effects of endurance training and resistance training. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol* **33**, 853-856 (2006).

Fantuzzi, G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol* **115**, 911-919; quiz 920 (2005).

Ferro-Luzzi, A. & Branca, F. Mediterranean diet, Italian-style: prototype of a healthy diet. *Am. J. Clin. Nutr* **61**, 1338S-1345S (1995).

Fève, B., Bastard, J. & Vidal, H. [Relationship between obesity, inflammation and insulin resistance: new concepts]. *C. R. Biol* **329**, 587-597; discussion 653-655 (2006).

Field, A.E. et al. Impact of overweight on the risk of developing common chronic diseases during a 10-year period. *Arch. Intern. Med* **161**, 1581-1586 (2001).

Ford, E.S. & Li, C. Physical activity or fitness and the metabolic syndrome. *Expert Rev Cardiovasc Ther* **4**, 897-915 (2006).

Foreyt, J.P. et al. Weight-reducing diets: are there any differences? *Nutr. Rev* **67 Suppl 1**, S99-101 (2009).

Fridovich, I. Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? *Ann. N. Y. Acad. Sci* **893**, 13-18 (1999).

Furchgott, R.F. & Zawadzki, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288**, 373-376 (1980).

Furukawa, S. et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J. Clin. Invest* **114**, 1752-1761 (2004).

G

Galili, O. et al. Early experimental obesity is associated with coronary endothelial dysfunction and oxidative stress. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol* **292**, H904-911 (2007).

Gilbert, D.L. Fifty years of radical ideas. *Ann. N. Y. Acad. Sci* **899**, 1-14 (2000).

Gilligan, D.M. et al. Effect of antioxidant vitamins on low density lipoprotein oxidation and impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with hypercholesterolemia. *J. Am. Coll. Cardiol* **24**, 1611-1617 (1994).

Ginsberg, H.N. & MacCallum, P.R. The obesity, metabolic syndrome, and type 2 diabetes mellitus pandemic: Part I. Increased cardiovascular disease risk and the importance of atherogenic dyslipidemia in persons with the metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus. *J. Cardiometab Syndr* **4**, 113-119 (2009).

Grimsrud, P.A., Picklo, M.J., Griffin, T.J. & Bernlohr, D.A. Carbonylation of adipose proteins in obesity and insulin resistance: identification of adipocyte fatty acid-binding protein as a cellular target of 4-hydroxynonenal. *Mol. Cell Proteomics* **6**, 624-637 (2007).

Grundy, S.M. Atherogenic dyslipidemia associated with metabolic syndrome and insulin resistance. *Clin Cornerstone* **8 Suppl 1**, S21-27 (2006).

Grundy, S.M. et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation* **112**, 2735-2752 (2005).

H

Haffner, S.M., Lehto, S., Rönnemaa, T., Pyörälä, K. & Laakso, M. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N. Engl. J. Med* **339**, 229-234 (1998).

Hambrecht, R. et al. Regular physical activity improves endothelial function in patients with coronary artery disease by increasing phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* **107**, 3152-3158 (2003).

Hamburg, N.M. et al. Physical inactivity rapidly induces insulin resistance and microvascular dysfunction in healthy volunteers. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* **27**, 2650-2656 (2007).

Hanson, R.L., Imperatore, G., Bennett, P.H. & Knowler, W.C. Components of the "metabolic syndrome" and incidence of type 2 diabetes. *Diabetes* **51**, 3120-3127 (2002).

Hayashi, T. et al. Visceral adiposity and the prevalence of hypertension in Japanese Americans. *Circulation* **108**, 1718-1723 (2003).

Hayashi, T. et al. NADPH oxidase inhibitor, apocynin, restores the impaired endothelial-dependent and -independent responses and scavenges superoxide anion in rats with type 2 diabetes complicated by NO dysfunction. *Diabetes Obes Metab* **7**, 334-343 (2005).

- Heiss, C. et al. In vivo measurement of flow-mediated vasodilation in living rats using high-resolution ultrasound. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol* **294**, H1086-1093 (2008).
- Higashi, Y., Noma, K., Yoshizumi, M. & Kihara, Y. Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circ. J* **73**, 411-418 (2009).
- Hirosumi, J. et al. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* **420**, 333-336 (2002).
- Hornig, B. Vitamins, antioxidants and endothelial function in coronary artery disease. *Cardiovasc Drugs Ther* **16**, 401-409 (2002).
- Horta, P.P., de Carvalho, J.J. & Mandarim-de-Lacerda, C.A. Exercise training attenuates blood pressure elevation and adverse remodeling in the aorta of spontaneously hypertensive rats. *Life Sci* **77**, 3336-3343 (2005).
- Hotamisligil, G.S., Shargill, N.S. & Spiegelman, B.M. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* **259**, 87-91 (1993).
- Hotamisligil, G.S., Budavari, A., Murray, D. & Spiegelman, B.M. Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity-diabetes. Central role of tumor necrosis factor-alpha. *J. Clin. Invest* **94**, 1543-1549 (1994).
- Hotamisligil, G.S. et al. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. *Science* **271**, 665-668 (1996).
- Hu, F.B. et al. Dietary fat intake and the risk of coronary heart disease in women. *N. Engl. J. Med* **337**, 1491-1499 (1997).
- Hu, F.B., Li, T.Y., Colditz, G.A., Willett, W.C. & Manson, J.E. Television watching and other sedentary behaviors in relation to risk of obesity and type 2 diabetes mellitus in women. *JAMA* **289**, 1785-1791 (2003).
- Hu, G. et al. Occupational, commuting, and leisure-time physical activity in relation to total and cardiovascular mortality among Finnish subjects with type 2 diabetes. *Circulation* **110**, 666-673 (2004).
- Hu, F.B. et al. Adiposity as compared with physical activity in predicting mortality among women. *N. Engl. J. Med* **351**, 2694-2703 (2004).
- Huang, T.T. et al. Genetic modification of prenatal lethality and dilated cardiomyopathy in Mn superoxide dismutase mutant mice. *Free Radic. Biol. Med* **31**, 1101-1110 (2001).
- Hwang, J. et al. Pulsatile versus oscillatory shear stress regulates NADPH oxidase subunit expression: implication for native LDL oxidation. *Circ. Res* **93**, 1225-1232 (2003).

Ignarro, L.J. Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. *J. Physiol. Pharmacol* **53**, 503-514 (2002).

Irving, B.A. et al. Effect of exercise training intensity on abdominal visceral fat and body composition. *Med Sci Sports Exerc* **40**, 1863-1872 (2008).

Isomaa, B. et al. Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care* **24**, 683-689 (2001).

J

Javeshghani, D., Schiffrin, E.L., Sairam, M.R. & Touyz, R.M. Potentiation of vascular oxidative stress and nitric oxide-mediated endothelial dysfunction by high-fat diet in a mouse model of estrogen deficiency and hyperandrogenemia. *J Am Soc Hypertens* **3**, 295-305 (2009).

Jéquier, E. Pathways to obesity. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord* **26 Suppl 2**, S12-17 (2002).

Joannides, R. et al. Evaluation of the determinants of flow-mediated radial artery vasodilatation in humans. *Clin. Exp. Hypertens* **19**, 813-826 (1997).

K

Kanda, H. et al. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J. Clin. Invest* **116**, 1494-1505 (2006).

Katzmarzyk, P.T., Church, T.S. & Blair, S.N. Cardiorespiratory fitness attenuates the effects of the metabolic syndrome on all-cause and cardiovascular disease mortality in men. *Arch. Intern. Med* **164**, 1092-1097 (2004).

Kawashima, S. & Yokoyama, M. Dysfunction of endothelial nitric oxide synthase and atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* **24**, 998-1005 (2004).

Keaney, J.F. et al. Obesity and systemic oxidative stress: clinical correlates of oxidative stress in the Framingham Study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* **23**, 434-439 (2003).

Ketonen, J., Pilvi, T. & Mervaala, E. Caloric restriction reverses high-fat diet-induced endothelial dysfunction and vascular superoxide production in C57Bl/6 mice. *Heart Vessels* **25**, 254-262 (2010).

Kim, J.Y. et al. Insulin resistance of muscle glucose transport in male and female rats fed a high-sucrose diet. *Am. J. Physiol* **276**, R665-672 (1999).

Kim, J.Y. et al. High-fat diet-induced muscle insulin resistance: relationship to visceral fat mass. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol* **279**, R2057-2065 (2000).

Kitamoto, S. et al. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis in rats increases aortic superoxide anion production via the action of angiotensin II. *J. Hypertens* **18**, 1795-1800 (2000).

Knight, S.F., Yuan, J., Roy, S. & Imig, J.D. Simvastatin and tempol protect against endothelial dysfunction and renal injury in a model of obesity and hypertension. *Am. J. Physiol. Renal Physiol* **298**, F86-94 (2010).

Knowler, W.C. et al. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N. Engl. J. Med* **346**, 393-403 (2002).

Kobayasi, R. et al. Oxidative stress and inflammatory mediators contribute to endothelial dysfunction in high-fat diet-induced obesity in mice. *J. Hypertens* **28**, 2111-2119 (2010).

Kotchen, T.A. Obesity-Related Hypertension: Epidemiology, Pathophysiology, and Clinical Management. *Am J Hypertens* (2010).doi:10.1038/ajh.2010.172

Kraegen, E.W., Cooney, G.J., Ye, J.M., Thompson, A.L. & Furler, S.M. The role of lipids in the pathogenesis of muscle insulin resistance and beta cell failure in type II diabetes and obesity. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* **109 Suppl 2**, S189-201 (2001).

Kris-Etherton, P.M. et al. Fatty acids and progression of coronary artery disease. *Am. J. Clin. Nutr* **65**, 1088-1090 (1997).

Kris-Etherton, P., Eckel, R.H., Howard, B.V., St Jeor, S. & Bazzarre, T.L. AHA Science Advisory: Lyon Diet Heart Study. Benefits of a Mediterranean-style, National Cholesterol Education Program/American Heart Association Step I Dietary Pattern on Cardiovascular Disease. *Circulation* **103**, 1823-1825 (2001).

Kurowska, E.M. Nitric oxide therapies in vascular diseases. *Curr. Pharm. Des* **8**, 155-166 (2002).

Kurukulasuriya, L.R., Stas, S., Lastra, G., Manrique, C. & Sowers, J.R. Hypertension in obesity. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am* **37**, 647-662, ix (2008).

L

Laight, D.W., Carrier, M.J. & Anggård, E.E. Antioxidants, diabetes and endothelial dysfunction. *Cardiovasc. Res* **47**, 457-464 (2000).

Lander, H.M. An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *FASEB J* **11**, 118-124 (1997).

Landmesser, U. et al. Role of p47(phox) in vascular oxidative stress and hypertension caused by angiotensin II. *Hypertension* **40**, 511-515 (2002).

Laufs, U. et al. Physical inactivity increases oxidative stress, endothelial dysfunction, and atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* **25**, 809-814 (2005).

Le Brocq, M., Leslie, S.J., Milliken, P. & Megson, I.L. Endothelial dysfunction: from molecular mechanisms to measurement, clinical implications, and therapeutic opportunities. *Antioxid. Redox Signal* **10**, 1631-1674 (2008).

Lees, S.J. & Booth, F.W. Sedentary death syndrome. *Can J Appl Physiol* **29**, 447-460;

discussion 444-446 (2004).

Lehoux, S. & Tedgui, A. [Shear and signal transduction in the endothelial cell]. *Med Sci (Paris)* **20**, 551-556 (2004).

Levine, G.N. et al. Ascorbic acid reverses endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. *Circulation* **93**, 1107-1113 (1996).

Li, T.Y. et al. Obesity as compared with physical activity in predicting risk of coronary heart disease in women. *Circulation* **113**, 499-506 (2006).

Libby, P. Inflammation and cardiovascular disease mechanisms. *Am. J. Clin. Nutr* **83**, 456S-460S (2006).

Loft, S., Møller, P., Cooke, M.S., Rozalski, R. & Olinski, R. Antioxidant vitamins and cancer risk: is oxidative damage to DNA a relevant biomarker? *Eur J Nutr* **47 Suppl 2**, 19-28 (2008).

Ludmer, P.L. et al. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N. Engl. J. Med* **315**, 1046-1051 (1986).

Ludwig, D.S., Peterson, K.E. & Gortmaker, S.L. Relation between consumption of sugar-sweetened drinks and childhood obesity: a prospective, observational analysis. *Lancet* **357**, 505-508 (2001).

Lynch, S.M. et al. Vascular superoxide dismutase deficiency impairs endothelial vasodilator function through direct inactivation of nitric oxide and increased lipid peroxidation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* **17**, 2975-2981 (1997).

M

McGill, H.C., McMahan, C.A., Malcom, G.T., Oalman, M.C. & Strong, J.P. Relation of glycohemoglobin and adiposity to atherosclerosis in youth. Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth (PDAY) Research Group. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* **15**, 431-440 (1995).

McGill, H.C. et al. Origin of atherosclerosis in childhood and adolescence. *Am. J. Clin. Nutr* **72**, 1307S-1315S (2000).

Maffeis, C., Zaffanello, M. & Schutz, Y. Relationship between physical inactivity and adiposity in prepubertal boys. *J. Pediatr* **131**, 288-292 (1997).

Mestek, M.L. et al. Regular aerobic exercise, without weight loss, improves endothelium-dependent vasodilation in overweight and obese adults. *Obesity (Silver Spring)* **18**, 1667-1669 (2010).

Meyer, A.A., Kundt, G., Lenschow, U., Schuff-Werner, P. & Kienast, W. Improvement of early vascular changes and cardiovascular risk factors in obese children after a six-month exercise program. *J. Am. Coll. Cardiol* **48**, 1865-1870 (2006).

Mohamed-Ali, V. et al. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor

- necrosis factor-alpha, in vivo. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **82**, 4196-4200 (1997).
- Moien-Afshari, F. et al. Exercise restores endothelial function independently of weight loss or hyperglycaemic status in db/db mice. *Diabetologia* **51**, 1327-1337 (2008).
- Mokdad, A.H. et al. Diabetes trends in the U.S.: 1990-1998. *Diabetes Care* **23**, 1278-1283 (2000).
- Mokdad, A.H. et al. Changes in health behaviors among older Americans, 1990 to 2000. *Public Health Rep* **119**, 356-361 (2004).
- Møller, P., Wallin, H. & Knudsen, L.E. Oxidative stress associated with exercise, psychological stress and life-style factors. *Chem. Biol. Interact* **102**, 17-36 (1996).
- Montagnani, M., Chen, H., Barr, V.A. & Quon, M.J. Insulin-stimulated activation of eNOS is independent of Ca²⁺ but requires phosphorylation by Akt at Ser(1179). *J. Biol. Chem* **276**, 30392-30398 (2001).

N

- Naderali, E.K., Fatani, S. & Williams, G. Chronic withdrawal of a high-palatable obesity-inducing diet completely reverses metabolic and vascular abnormalities associated with dietary-obesity in the rat. *Atherosclerosis* **172**, 63-69 (2004).
- Nakatani, Y. et al. Modulation of the JNK pathway in liver affects insulin resistance status. *J. Biol. Chem* **279**, 45803-45809 (2004).
- Napoli, C. et al. Long-term combined beneficial effects of physical training and metabolic treatment on atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **101**, 8797-8802 (2004).
- Nappo, F. et al. Postprandial endothelial activation in healthy subjects and in type 2 diabetic patients: role of fat and carbohydrate meals. *J. Am. Coll. Cardiol* **39**, 1145-1150 (2002).
- Negishi, H. et al. Black and green tea polyphenols attenuate blood pressure increases in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J. Nutr* **134**, 38-42 (2004).
- Nordestgaard, B.G., Benn, M., Schnohr, P. & Tybjaerg-Hansen, A. Nonfasting triglycerides and risk of myocardial infarction, ischemic heart disease, and death in men and women. *JAMA* **298**, 299-308 (2007).

O

- ObEpi-Roche 2009, 5^{ème} édition de l'enquête nationale sur la prévalence de l'obésité et du surpoids en France (enquête réalisée du 29 janvier au 12 mars 2009 auprès d'un échantillon de 27 243 individus âgés de 15 ans et plus, représentatif de la population française).
- Organisation mondiale de la santé. Obésité et surpoids. (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/fr/index.html>). (Access date aout 2010)

Okada, S. et al. Effect of exercise intervention on endothelial function and incidence of cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes. *J. Atheroscler. Thromb* **17**, 828-833 (2010).

Ozes, O.N. et al. A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mTOR pathway mediates and PTEN antagonizes tumor necrosis factor inhibition of insulin signaling through insulin receptor substrate-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **98**, 4640-4645 (2001).

P

Paquet, M.H., Coleman, A.W., Vergnaud, S. & Morel, F. P67-phox-mediated NADPH oxidase assembly: imaging of cytochrome b558 liposomes by atomic force microscopy. *Biochemistry* **39**, 9302-9310 (2000).

Panagiotakos, D.B., Pitsavos, C., Yannakoulia, M., Chrysohoou, C. & Stefanadis, C. The implication of obesity and central fat on markers of chronic inflammation: The ATTICA study. *Atherosclerosis* **183**, 308-315 (2005).

Panagiotakos, D.B. & Polychronopoulos, E. The role of Mediterranean diet in the epidemiology of metabolic syndrome; converting epidemiology to clinical practice. *Lipids Health Dis* **4**, 7 (2005).

Paravicini, T.M. & Touyz, R.M. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care* **31 Suppl 2**, S170-180 (2008).

Picchi, A. et al. Tumor necrosis factor- α induces endothelial dysfunction in the prediabetic metabolic syndrome. *Circ. Res* **99**, 69-77 (2006).

Pierce, G.L., Lesniewski, L.A., Lawson, B.R., Beske, S.D. & Seals, D.R. Nuclear factor- κ B activation contributes to vascular endothelial dysfunction via oxidative stress in overweight/obese middle-aged and older humans. *Circulation* **119**, 1284-1292 (2009).

Pinheiro, A.R., Cunha, A.R., Aguilã, M.B. & Mandarim-de-Lacerda, C.A. Beneficial effects of physical exercise on hypertension and cardiovascular adverse remodeling of diet-induced obese rats. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* **17**, 365-375 (2007).

PNNS. Programme National Nutrition Santé (2001). (<http://www.mangerbouger.fr/menu-secondaire/pnns>). (Access Aout 2010).

Poitou, C. et al. Relationship between single nucleotide polymorphisms in leptin, IL6 and adiponectin genes and their circulating product in morbidly obese subjects before and after gastric banding surgery. *Obes Surg* **15**, 11-23 (2005).

Pou, K.M. et al. Visceral and subcutaneous adipose tissue volumes are cross-sectionally related to markers of inflammation and oxidative stress: the Framingham Heart Study. *Circulation* **116**, 1234-1241 (2007).

Pouliot, M.C. et al. Visceral obesity in men. Associations with glucose tolerance, plasma insulin, and lipoprotein levels. *Diabetes* **41**, 826-834 (1992).

Pradhan, A.D., Manson, J.E., Rifai, N., Buring, J.E. & Ridker, P.M. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA* **286**, 327-334 (2001).

R

Raij, L. Nitric oxide in the pathogenesis of cardiac disease. *J Clin Hypertens (Greenwich)* **8**, 30-39 (2006).

Reaven, G.M. The insulin resistance syndrome: definition and dietary approaches to treatment. *Annu. Rev. Nutr* **25**, 391-406 (2005).

Refsgaard, H.H., Tsai, L. & Stadtman, E.R. Modifications of proteins by polyunsaturated fatty acid peroxidation products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **97**, 611-616 (2000).

Rippe, C. et al. Short-term calorie restriction reverses vascular endothelial dysfunction in old mice by increasing nitric oxide and reducing oxidative stress. *Aging Cell* **9**, 304-312 (2010).

Roberts, C.K., Vaziri, N.D., Wang, X.Q. & Barnard, R.J. Enhanced NO inactivation and hypertension induced by a high-fat, refined-carbohydrate diet. *Hypertension* **36**, 423-429 (2000).

Roberts, C.K., Vaziri, N.D., Liang, K.H. & Barnard, R.J. Reversibility of chronic experimental syndrome X by diet modification. *Hypertension* **37**, 1323-1328 (2001).

Roberts, C.K., Vaziri, N.D. & Barnard, R.J. Effect of diet and exercise intervention on blood pressure, insulin, oxidative stress, and nitric oxide availability. *Circulation* **106**, 2530-2532 (2002).

Roberts, C.K. et al. A high-fat, refined-carbohydrate diet induces endothelial dysfunction and oxidant/antioxidant imbalance and depresses NOS protein expression. *J. Appl. Physiol* **98**, 203-210 (2005).

Roberts, C.K. et al. Oxidative stress and dysregulation of NAD(P)H oxidase and antioxidant enzymes in diet-induced metabolic syndrome. *Metab. Clin. Exp* **55**, 928-934 (2006).

Roberts, C.K., Ng, C., Hama, S., Eliseo, A.J. & Barnard, R.J. Effect of a short-term diet and exercise intervention on inflammatory/anti-inflammatory properties of HDL in overweight/obese men with cardiovascular risk factors. *J. Appl. Physiol* **101**, 1727-1732 (2006).

Ross, R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med* **340**, 115-126 (1999).

Ruotolo, G. & Howard, B.V. Dyslipidemia of the metabolic syndrome. *Curr Cardiol Rep* **4**, 494-500 (2002).

Rui, L. et al. Insulin/IGF-1 and TNF-alpha stimulate phosphorylation of IRS-1 at inhibitory Ser307 via distinct pathways. *J. Clin. Invest* **107**, 181-189 (2001).

Rush, J.W.E., Turk, J.R. & Laughlin, M.H. Exercise training regulates SOD-1 and oxidative stress in porcine aortic endothelium. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol* **284**, H1378-1387 (2003).

S

Sakurai, Y. Duration of obesity and risk of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Biomed. Pharmacother* **54**, 80-84 (2000).

Schmidt, M.I. et al. Identifying individuals at high risk for diabetes: The Atherosclerosis Risk in Communities study. *Diabetes Care* **28**, 2013-2018 (2005).

Sedeek, M., Hébert, R.L., Kennedy, C.R., Burns, K.D. & Touyz, R.M. Molecular mechanisms of hypertension: role of Nox family NADPH oxidases. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens* **18**, 122-127 (2009).

Sentman, M. et al. Phenotypes of mice lacking extracellular superoxide dismutase and copper- and zinc-containing superoxide dismutase. *J. Biol. Chem* **281**, 6904-6909 (2006).

Serrander, L. et al. NOX4 activity is determined by mRNA levels and reveals a unique pattern of ROS generation. *Biochem. J* **406**, 105-114 (2007).

Shaul, P.W. Regulation of endothelial nitric oxide synthase: location, location, location. *Annu. Rev. Physiol* **64**, 749-774 (2002).

Shewmake, R.A. & Huntington, M.K. Nutritional treatment of obesity. *Prim. Care* **36**, 357-377 (2009).

Shiose, A. et al. A novel superoxide-producing NAD(P)H oxidase in kidney. *J. Biol. Chem* **276**, 1417-1423 (2001).

Shulman, G.I. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J. Clin. Invest* **106**, 171-176 (2000).

Silva, M.S.V.D. et al. Benefits of exercise training in the treatment of heart failure: study with a control group. *Arq. Bras. Cardiol* **79**, 351-362 (2002).

Slentz, C.A. et al. Effects of the amount of exercise on body weight, body composition, and measures of central obesity: STRRIDE--a randomized controlled study. *Arch. Intern. Med* **164**, 31-39 (2004).

Spiteller, G. The important role of lipid peroxidation processes in aging and age dependent diseases. *Mol. Biotechnol* **37**, 5-12 (2007).

Stephens, J.M., Lee, J. & Pilch, P.F. Tumor necrosis factor-alpha-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is accompanied by a loss of insulin receptor substrate-1 and GLUT4 expression without a loss of insulin receptor-mediated signal transduction. *J. Biol. Chem* **272**, 971-976 (1997).

T

Taddei, S., Ghiadoni, L., Virdis, A., Versari, D. & Salvetti, A. Mechanisms of endothelial dysfunction: clinical significance and preventive non-pharmacological therapeutic strategies. *Curr. Pharm. Des* **9**, 2385-2402 (2003).

Takase, B. et al. Close relationship between the vasodilator response to acetylcholine in the brachial and coronary artery in suspected coronary artery disease. *Int. J. Cardiol* **105**, 58-66 (2005).

Takaya, T. et al. A specific role for eNOS-derived reactive oxygen species in atherosclerosis progression. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* **27**, 1632-1637 (2007).

Thomas, S.R., Chen, K. & Keaney, J.F. Oxidative stress and endothelial nitric oxide bioactivity. *Antioxid. Redox Signal* **5**, 181-194 (2003).

Thompson, M.A. et al. Exercise preserves endothelium-dependent relaxation in coronary arteries of hypercholesterolemic male pigs. *J. Appl. Physiol* **96**, 1114-1126 (2004).

Tilg, H. & Moschen, A.R. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat. Rev. Immunol* **6**, 772-783 (2006).

Tjønnå, A.E. et al. Aerobic interval training versus continuous moderate exercise as a treatment for the metabolic syndrome: a pilot study. *Circulation* **118**, 346-354 (2008).

Touyz, R.M., Yao, G. & Schiffrin, E.L. c-Src induces phosphorylation and translocation of p47phox: role in superoxide generation by angiotensin II in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* **23**, 981-987 (2003).

Tremellen, K. Oxidative stress and male infertility--a clinical perspective. *Hum. Reprod. Update* **14**, 243-258 (2008).

Trichopoulou, A. & Lagiou, P. Healthy traditional Mediterranean diet: an expression of culture, history, and lifestyle. *Nutr. Rev* **55**, 383-389 (1997).

Tuomilehto, J. et al. Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *N. Engl. J. Med* **344**, 1343-1350 (2001).

U

Uematsu, M. et al. Regulation of endothelial cell nitric oxide synthase mRNA expression by shear stress. *Am. J. Physiol* **269**, C1371-1378 (1995).

Uysal, K.T., Wiesbrock, S.M., Marino, M.W. & Hotamisligil, G.S. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. *Nature* **389**, 610-614 (1997).

V

Valko, M., Morris, H. & Cronin, M.T.D. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med.*

Chem **12**, 1161-1208 (2005).

Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M. & Mazur, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact* **160**, 1-40 (2006).

Varady, K.A., St-Pierre, A.C., Lamarche, B. & Jones, P.J.H. Effect of plant sterols and endurance training on LDL particle size and distribution in previously sedentary hypercholesterolemic adults. *Eur J Clin Nutr* **59**, 518-525 (2005).

Vertuani, S., Angusti, A. & Manfredini, S. The antioxidants and pro-antioxidants network: an overview. *Curr. Pharm. Des* **10**, 1677-1694 (2004).

Vincent, M.A., Montagnani, M. & Quon, M.J. Molecular and physiologic actions of insulin related to production of nitric oxide in vascular endothelium. *Curr. Diab. Rep* **3**, 279-288 (2003).

W

Walford, G. & Loscalzo, J. Nitric oxide in vascular biology. *J. Thromb. Haemost* **1**, 2112-2118 (2003).

Wassmann, S., Wassmann, K. & Nickenig, G. Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hypertension* **44**, 381-386 (2004).

Weisberg, S.P. et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest* **112**, 1796-1808 (2003).

Weisberg, S.P. et al. CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J. Clin. Invest* **116**, 115-124 (2006).

Wellen, K.E. & Hotamisligil, G.S. Inflammation, stress, and diabetes. *J. Clin. Invest* **115**, 1111-1119 (2005).

Wessel, T.R. et al. Relationship of physical fitness vs body mass index with coronary artery disease and cardiovascular events in women. *JAMA* **292**, 1179-1187 (2004).

Wheatcroft, S.B., Williams, I.L., Shah, A.M. & Kearney, M.T. Pathophysiological implications of insulin resistance on vascular endothelial function. *Diabet. Med* **20**, 255-268 (2003).

Wilson, P.W.F., D'Agostino, R.B., Sullivan, L., Parise, H. & Kannel, W.B. Overweight and obesity as determinants of cardiovascular risk: the Framingham experience. *Arch. Intern. Med* **162**, 1867-1872 (2002).

Wood, Z.A., Poole, L.B. & Karplus, P.A. Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Science* **300**, 650-653 (2003).

Woodman, C.R., Turk, J.R., Williams, D.P. & Laughlin, M.H. Exercise training preserves endothelium-dependent relaxation in brachial arteries from hyperlipidemic pigs. *J. Appl. Physiol* **94**, 2017-2026 (2003).

Woodman, C.R., Ingram, D., Bonagura, J. & Laughlin, M.H. Exercise training improves femoral artery blood flow responses to endothelium-dependent dilators in hypercholesterolemic pigs. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol* **290**, H2362-2368 (2006).

Wu, R., Millette, E., Wu, L. & de Champlain, J. Enhanced superoxide anion formation in vascular tissues from spontaneously hypertensive and desoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *J. Hypertens* **19**, 741-748 (2001).

X

Xu, H. et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J. Clin. Invest* **112**, 1821-1830 (2003).

Y

Yamato, M. et al. Fatty acids increase the circulating levels of oxidative stress factors in mice with diet-induced obesity via redox changes of albumin. *FEBS J* **274**, 3855-3863 (2007).

Yki-Järvinen, H. & Westerbacka, J. The fatty liver and insulin resistance. *Curr. Mol. Med* **5**, 287-295 (2005).

Yoshida, L.S. & Tsunawaki, S. Expression of NADPH oxidases and enhanced H₂O₂-generating activity in human coronary artery endothelial cells upon induction with tumor necrosis factor- α . *Int. Immunopharmacol* **8**, 1377-1385 (2008).

Yoshioka, S. et al. Dietary fat-induced increase in blood pressure and insulin resistance in rats. *J. Hypertens* **18**, 1857-1864 (2000).

Yuan, M. et al. Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikk β . *Science* **293**, 1673-1677 (2001).

Yusuf, S. et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet* **364**, 937-952 (2004).

Z

Zambon, A., Hokanson, J.E., Brown, B.G. & Brunzell, J.D. Evidence for a new pathophysiological mechanism for coronary artery disease regression: hepatic lipase-mediated changes in LDL density. *Circulation* **99**, 1959-1964 (1999).

Zeyda, M. & Stulnig, T.M. Obesity, inflammation, and insulin resistance--a mini-review. *Gerontology* **55**, 379-386 (2009).

Ziccardi, P. et al. Reduction of inflammatory cytokine concentrations and improvement of endothelial functions in obese women after weight loss over one year. *Circulation* **105**, 804-809 (2002).

Zick, Y. Insulin resistance: a phosphorylation-based uncoupling of insulin signaling. *Trends Cell Biol* **11**, 437-441 (2001).



ANNEXES

AUTRES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

- **Publications**

-Fayçal Meziri, Delphine Binda, **Sabeur Touati**, Maxime Pellegrin, Alain Berthelot, Rhian M Touyz, Pascal Laurant. Exercise aggravates cardiovascular risks and mortality in rats with disrupted nitric oxide pathway and treated with recombinant human erythropoietin. En révision à l'*European Journal of Applied Physiology* (2.047).

- **Communications**

Orales

-**S.TOUATI**, F. MEZIRI, Y. HE, A. MONTEZANO, T. BARHOUMI, A. BERTHELOT, R. TOUYZ, P. LAURANT. « L'exercice physique corrige la dysfonction endothéliale, le stress oxydatif et l'inflammation chez le rat obèse ». Congrès de Physiologie, pharmacologie et thérapeutique, Bordeaux, France 2010.

-**S.TOUATI**, F. MOUGIN, M.L SIMON-RIGAUD, V. NEGRE, J. REGNARD « Paramètres cardiorespiratoires et métaboliques au repos et à l'exercice musculaire chez l'adolescent obèse ». XXVI^{ème} Congrès de la Société Française de Médecine du Sport, Essonne, France 2006.

Afichées

-**S.TOUATI**, F. MEZIRI, Y. HE, A. MONTEZANO, T. BARHOUMI A. BERTHELOT, R. TOUYZ, P. LAURANT. «Effect of exercise with and without diet modification on endothelial function and oxidative stress in obese rats». Printemps de la cardiologie, Nantes, France 2010.

-S.TOUATI, Y. HE, A. MONTEZANO, F. MEZIRI, P. LAURANT, R. TOUYZ « Low-fat diet and exercise improve vascular function and oxidative stress in obese rats without effect on NADPH oxidase activity». 63rd High Blood Pressure Research Conference, Chicago USA 2009.

-S.TOUATI, F. MEZIRI, S. DEVAUX, T. BARHOUMI, J. REGNARD, A. BERTHELOT, R. TOUYZ, P. LAURANT. «Exercise prevents development of metabolic syndrome in a rat model of diet-induced obesity». 20th Ontario Hypertension Society Annual Spring Meeting – Peterborough, Canada 2009.

-S.TOUATI, F. MEZIRI, S. DEVAUX, T. BARHOUMI, J. REGNARD, A. BERTHELOT, R. TOUYZ, P. LAURANT. «Effect of exercise and diet modification intervention on endothelial dysfunction and insulin resistance in a rat model of diet-induced obesity». 13th Annual Congress of the European College of Sport Science, Estoril, Portugal 2008.

-F. MEZIRI, **S.TOUATI**, T. BARHOUMI, M. SIMOES, A. BERTHELOT, R. TOUYZ, P. LAURANT. «Prevention of the cardiovascular risk by exercise training in rats with chronic kidney disease treated with recombinant human erythropoietin». Printemps de la cardiologie, Nantes, France 2010.

-F. MEZIRI, **S.TOUATI**, T. BARHOUMI, M. SIMOES, A. BERTHELOT, R. TOUYZ, P. LAURANT. «Exercise training effects on vascular and renal functions in rats with chronic kidney disease treated with recombinant human erythropoietin». Congrès de Physiologie, pharmacologie et thérapeutique, Bordeaux, France.

-F. MEZIRI, M. SIMOES, **S.TOUATI**, BARHOUMI, A. BERTHELOT, T.Rhian, P. LAURANT. «Exercise training and recombinant human erythropoietin effects on blood

pressure, vascular function and kidney status in rats with chronic kidney disease» 20th Ontario Hypertension Society Annual Spring Meeting – Peterborough, Canada 2009.

-F. MEZIRI, M. SIMOES, **S.TOUATI**, T. BARHOUMI, A. BERTHELOT, T.Rhian, P. LAURANT. «Exercise training prevents development of hypertension and improves vascular function in rats with chronic kidney disease treated with recombinant human erythropoietin». Canadian Cardiovascular Congress -Toronto Canada 2008.

-F. MEZIRI, M. SIMOES, **S.TOUATI**, T. BARHOUMI, A. BERTHELOT, T.Rhian, P. LAURANT. «Exercise training prevents the cardiovascular risk induced by chronic kidney disease in rats treated with recombinant human erythropoietin». 13th Annual Congress of the European College of Sport Science, Estoril, Portugal 2008.