



Intérêt de l'apport en chocolat noir dans la prévention des effets de la plongée à l'air et en apnée sur l'endothélium vasculaire

Sigrid Theunissen

► To cite this version:

Sigrid Theunissen. Intérêt de l'apport en chocolat noir dans la prévention des effets de la plongée à l'air et en apnée sur l'endothélium vasculaire. Physiologie [q-bio.TO]. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2013. Français. NNT : 2013BRES0053 . tel-01063135

HAL Id: tel-01063135

<https://theses.hal.science/tel-01063135>

Submitted on 11 Sep 2014

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

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

THÈSE / UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

sous le sceau de l'Université européenne de Bretagne

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

Mention : Physiologie

École Doctorale SICMA

présentée par

Sigrid Theunissen

Préparée conjointement au laboratoire
ORPHY (Brest) et au laboratoire de
Physiologie environnementale et
occupationnelle (Bruxelles).

**Intérêt de l'apport en chocolat
noir dans la prévention des effets
de la plongée à l'air et en apnée
sur l'endothélium vasculaire**

Thèse soutenue le 8 novembre 2013

devant le jury composé de :

François GUERRERO

Professeur, Université de Bretagne Occidentale / *Directeur de thèse*

Costantino BALESTRA

Professeur, Haute Ecole Paul-Henri Spaak / *Directeur de thèse*

Jacques MANSOURATI

Professeur, Université de Bretagne Occidentale / *Président du jury*

Jean-Eric BLATTEAU

Directeur de recherche, Institut de Recherches Biomédicales des Armées / *Rapporteur*

Jean-Pierre IMBERT

Ingénieur biomédical, Entreprise DIVETECH / *Rapporteur*

Peter GERMONPRE

Médecin hyperbare, Hôpital Militaire Reine Astrid, Bruxelles / *Examineur*

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	8
LISTE DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES	10
PUBLICATIONS, COMMUNICATIONS ET POSTERS ASSOCIES A LA REALISATION DE LA THESE	13
STRUCTURE DE LA THESE	16
RESUME	18
ABSTRACT	19
CHAPITRE 1 - INTRODUCTION GENERALE	21
1.1. CONTRAINTES ENVIRONNEMENTALES ASSOCIEES A LA PLONGEE	21
1.1.1. L'IMMERSION	21
1.1.2. LE FROID	23
1.1.3. L'EXPOSITION HYPERBARE	25
1.1.4. L'HYPOXIE/HYPERCAPNIE	28
1.1.5. L'EXERCICE PHYSIQUE	29
1.1.6. TABLEAU GENERAL DES CONTRAINTES ENVIRONNEMENTALES SCUBA ET APNEE	30
1.2. L'ENDOTHELIUM	31
1.2.1. SES CARACTERISTIQUES	31
1.2.2. LA FONCTION ENDOTHELIALE	31
1.2.3. LA DYSFONCTION ENDOTHELIALE	31
1.2.4. CE A QUOI IL EST SENSIBLE	32
1.2.5. CE QU'IL PRODUIT	33
1.3. LE MONOXYDE D'AZOTE	38
1.3.1. CARTE D'IDENTITE	38
1.3.2. PRODUCTION DU MONOXYDE D'AZOTE	38
1.3.3. ACTIONS DU MONOXYDE D'AZOTE	40
1.3.4. INACTIVATION DU MONOXYDE D'AZOTE	40
1.4. LES ANTIOXYDANTS	42
1.4.1. ORIGINE DES ANTIOXYDANTS	42
1.4.2. LES EFFETS PROTECTEURS DES ANTIOXYDANTS	44
1.4.3. LE CHOCOLAT NOIR	45
1.5. L'ENDOTHELIUM PLONGE	47
1.6. OBJECTIFS DE LA THESE	51
CHAPITRE 2 - MATERIELS ET OUTILS METHODOLOGIQUES	52
2.1. EXPLORATION DE LA FONCTION ENDOTHELIALE	52
2.1.1. LA DILATATION FLUX-DEPENDANTE	52
2.1.2. L'HYPERHEMIE POST-OCCLUSIVE	53
2.1.3. LA RIGIDITE ARTERIELLE	54

2.2. PARAMETRES HEMATOLOGIQUES	55
2.2.1. LE MONOXYDE D'AZOTE	55
2.2.2. LES PEROXYNITRITES	55
2.2.3. LES GROUPEMENTS THIOLS	56
2.3. VALIDITE ET LIMITES METHODOLOGIQUES	56
2.4. ANALYSES STATISTIQUES	59
2.4.1. COMPARAISON ENTRE L'EVOLUTION D'UN PARAMETRE ET 100%.	60
2.4.2. COMPARAISON ENTRE LES GROUPES OU LES PARAMETRES.	60
<u>CHAPITRE 3 - LA DYSFONCTION ENDOTHELIALE APRES UNE PLONGEE A L'AIR OU EN APNEE, DEUX MECANISMES DIFFERENTS DE VARIATION DU MONOXYDE D'AZOTE ?</u>	<u>61</u>
3.1. OBJECTIFS	61
3.2. PROTOCOLE	61
3.2.1. POPULATION ETUDIEE	61
3.2.2. PROFIL DES PLONGEES ET MESURES	62
3.3. RESULTATS	62
3.3.1. DIAMETRE BASAL DE L'ARTERE BRACHIALE ET FMD	63
3.3.2. HYPERHEMIE REACTIVE POST-OCCLUSIVE	64
3.3.3. LE MONOXYDE D'AZOTE CIRCULANT	64
3.4. DISCUSSION	65
3.5. CONCLUSION	70
<u>CHAPITRE 4 - LE STRESS OXYDANT APRES UNE SERIE D'APNEES SUCCESSIVES</u>	<u>71</u>
4.1. OBJECTIFS	71
4.2. PROTOCOLE	71
4.2.1. POPULATION ETUDIEE	71
4.2.2. PROFIL DES PLONGEES ET MESURES	71
4.3. RESULTATS	72
4.3.1. NITRATE/NITRITE PLASMATIQUE	72
4.3.2. MARQUEURS DE STRESS OXYDANT : LA NITROTYROSINE ET LES GROUPEMENTS THIOLS	72
4.4. DISCUSSION	73
4.5. CONCLUSION	75
<u>CHAPITRE 5 - LES EFFETS DU CHOCOLAT NOIR ET BLANC SUR LA FONCTION ENDOTHELIALE DE L'HOMME SAIN</u>	<u>76</u>
5.1. OBJECTIFS	76
5.2. PROTOCOLE	76
5.2.1. POPULATION ETUDIEE ET MESURES	76
5.3. RESULTATS	76
5.3.1. EVOLUTION DANS LE TEMPS	76
5.3.2. CHOIX DU CHOCOLAT	77
5.4. DISCUSSION	78
5.5. CONCLUSION	81

CHAPITRE 6 - LE CHOCOLAT NOIR PREVIENT LA DYSFONCTION ENDOTHELIALE APRES UNE PLONGEE A L'AIR	82
6.1. OBJECTIFS	82
6.2. PROTOCOLE	82
6.2.1. POPULATION ETUDIEE	82
6.2.2. PROFIL DES PLONGEES ET MESURES	82
6.3. RESULTATS	83
6.3.1. DIAMETRES DE L'ARTERE BRACHIALE ET DILATATION FLUX-DEPENDANTE	83
6.3.2. RIGIDITE ARTERIELLE	83
6.3.3. MONOXYDE D'AZOTE CIRCULANT ET PEROXYNITRITES PLASMATIQUES	84
6.4. DISCUSSION	85
6.5. CONCLUSION	86
CHAPITRE 7 - LE CHOCOLAT NOIR PREVIENT LA DYSFONCTION ENDOTHELIALE APRES LA PLONGEE EN APNEE	87
7.1. OBJECTIFS	87
7.2. PROTOCOLE	87
7.2.1. POPULATION ETUDIEE	87
7.2.2. PROFIL DES PLONGEES ET MESURES	87
7.3. RESULTATS	88
7.3.1. DIAMETRES DE L'ARTERE BRACHIALE ET DILATATION FLUX-DEPENDANTE	88
7.3.2. PHOTOPLETHYSMOGRAPHIE DIGITALE	89
7.3.3. MONOXYDE D'AZOTE CIRCULANT ET PEROXYNITRITES	89
7.4. DISCUSSION	90
7.5. CONCLUSION	97
TABLEAU GENERAL DES RESULTATS	98
DISCUSSION GENERALE	99
IMPACT DE LA PLONGEE EN SCAPHANDRE AUTONOME SUR LA FONCTION ENDOTHELIALE	99
IMPACT DE LA PLONGEE EN APNEE SUR LA FONCTION ENDOTHELIALE	103
LE CHOCOLAT NOIR COMME MOYEN DE PREVENTION DE LA DYSFONCTION ENDOTHELIALE	110
EFFETS SUR LA PLONGEE A L'AIR	110
EFFETS SUR LA PLONGEE EN APNEE	111
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	113
REFERENCES	115
ANNEXES	140
ANNEXE 1 : ARTICLE PUBLIÉ DANS L' <i>UNDERSEA AND HYPERBARIC MEDICINE</i>	140
ANNEXE 2 : ARTICLE PUBLIE DANS LE <i>DIVING AND HYPERBARIC MEDICINE</i>	150
ANNEXE 3 : ARTICLE SOUMIS A L' <i>EUROPEAN JOURNAL OF APPLIED PHYSIOLOGY</i>	154
ANNEXE 4 : ACCORD DU COMITE D'ETHIQUE	163

TABLE DES FIGURES

Figure 1 - Représentation d'une artère. L'endothélium est la couche la plus interne.....	31
Figure 2 – Carte mentale résumant les principales caractéristiques de l'endothélium, ce à quoi il est sensible, ce qu'il produit, ses actions, la fonction et dysfonction endothéliale.....	37
Figure 3 – Carte mentale représentant la carte d'identité du monoxyde d'azote, sa production, son inactivation et ses actions.	41
Figure 4 – Programme d'analyse de la dilatation flux-dépendante (FMD) par la Mesure des diamètres de l'artère brachiale avant et après 5 minutes d'occlusion (FMD-I software, FLOMEDI, Belgium).....	52
Figure 5 – Représentation de la mesure de l'hyperhémie réactive post-occlusive (PORH) mesurée par photopléthysmographie au bout du doigt.	53
Figure 6 – Schéma de l'onde de pouls obtenue par photopléthysmographie digitale.....	55
Figure 7 – Analyse des échantillons sanguins par colorimétrie.....	56
Figure 8 - Dilatation flux-dépendante (FMD) et Hyperhémie réactive post-occlusive (PORH) avant et après la plongée.....	63
Figure 9 – Evolution du monoxyde d'azote circulant (NO) après une plongée en apnée (n = 5) ou à l'air (n = 9).	64
Figure 10 – Résumé des mécanismes proposés pendant une plongée à l'air (SCUBA). ...	66
Figure 11 – Résumé des mécanismes proposés durant la plongée en apnée.....	69
Figure 12 – Evolution du monoxyde d'azote (NO), des peroxy-nitrites (ONOO-) et des groupements thiols (SH) après une série de plongées successives à 20 mètres de profondeur pour une durée totale d'immersion de 20 minutes.	73
Figure 13 – Evolution de la dilatation flux-dépendante (FMD) après une plongée contrôle de 20 minutes à 33 mètres et de la même plongée précédée d'un supplément de 30g de chocolat noir 1h30 avant la plongée.....	83
Figure 14 - Evolution de la dilatation flux-dépendante (FMD) après une série de plongées successives en apnée à 20 mètres totalisant un temps cumulé d'apnée de 20 minutes et après la même série de plongées successives précédée d'un supplément de 30g de chocolat noir 1h avant la plongée.....	89
Figure 15 - Influences de l'exposition au froid, à l'hyperoxie, à l'hypoxie, à l'exercice et aux flavonoïdes sur la biodisponibilité du monoxyde d'azote (NO).....	96

Figure 16 - Mécanismes associés à la diminution de la FMD après une plongée à l'air.	102
Figure 17 – Schéma récapitulatif des mécanismes associés à la réduction de la dilatation flux-dépendante observée après une série de plongées successives en apnée dans des conditions thermiquement neutres.....	106
Figure 18 - Influence de l'exercice, de l'hyperoxie, de l'hypoxie, de l'exposition au froid et des antioxydants sur la biodisponibilité du monoxyde d'azote (NO).....	108
Figure 19 – mécanismes associés à la plongée SCUBA après supplémentation en chocolat noir.....	111
Figure 20 – Mécanismes sous-jacents à la plongée en apnée Après ingestion de chocolat noir.....	112

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 - Tableau général reprenant une comparaison des effets de l'immersion, de l'hyperoxie, de l'hypoxie et hypercapnie, du froid et des embolies gazeux sur le plongeur dans le cas d'une plongée SCUBA ou de l'apnée.	30
Tableau 2 : Liste des articles sélectionnés à partir de la banque de données Pubmed retraçant l'évolution des recherches concernant l'endothélium, le stress oxydant et la plongée SCUBA et en apnée.	48
Tableau 3 - Evolution de la dilatation flux-dépendante avant ingestion de 30g de chocolat noir et 30, 60, 90, 120, 150 et 180 minutes après la prise de chocolat.	77
Tableau 4 – Résultats en valeurs absolues des diamètres pré-occlusion de l'artère brachiale, de la dilatation flux-dépendante et de l'index de rigidité artérielle avant et après ingestion de 30g de chocolat noir ou blanc.	77
Tableau 5 – Résultats en valeurs absolues des diamètres pré-occlusion de l'artère brachiale, de la dilatation flux-dépendante, des paramètres photopléthysmographiques et sanguins avant et après une plongée de 20 minutes à 33 mètres pour le groupe contrôle et le groupe chocolat	84
Tableau 6 – Résultats en valeurs absolues des diamètres pré-occlusion de l'artère brachiale, de la dilatation flux-dépendante, des paramètres photopléthysmographiques et sanguins avant et après une série de plongées successives en apnée à 20 mètres cumulant un temps total d'apnée de 20 minutes pour le groupe contrôle et le groupe chocolat	90
Tableau 7 - Récapitulatif des pourcentages d'évolution de tous les résultats obtenus lors des différentes expériences.....	98

REMERCIEMENTS

Par un bel après-midi de printemps 2010, je reçus un coup de téléphone de mon très cher collègue et ami Costantino Balestra me demandant si je voulais entreprendre une thèse avec le Professeur François Guerrero à l'Université de Bretagne Occidentale. Ne m'étant pas posée la question de plus près et ne connaissant pas ce Mr Guerrero, je ne savais trop quoi répondre. « Tu ne veux pas faire de thèse ? » me demanda-t-il. « Je n'ai pas dit ça... » « Alors, tu veux faire une thèse ! Très bien, je préviens François à Brest que tu as accepté de travailler avec lui, il sera ravi ! Salut ! » Me voilà donc 30 secondes plus tard engagée pour un travail dont je n'avais aucune idée de l'importance qu'il allait prendre. Mais au fond de moi, je n'avais aucune crainte. Je savais que si Tino me le proposait, c'est que c'était une opportunité à saisir et qu'il savait que j'en serais capable. Car si je suis où je me trouve pour l'instant dans ma vie professionnelle, c'est en grande partie grâce à sa patience et à la confiance qu'il a toujours eue en moi. Je ne le remercierai jamais assez pour ses multiples conseils qui m'ont fortement guidée dans mes choix, tant professionnels que personnels.

Septembre 2010, je démarre donc ma thèse avec Tino Balestra et François Guerrero que je remercie pour le soutien qu'il m'a apporté tout au long de ce travail malgré les 850 km qui nous séparaient. Merci en passant à celui qui a inventé skype. Sans oublier de remercier le professeur Jacques Mansourati pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire de recherche.

Un an plus tard démarra le projet PHYPODE¹ avec l'arrivée de Frauke, Walter, Miroslav et Virginie qui sont venus compléter mes connaissances techniques et linguistiques.

Et puis, je me dois de remercier une multitude de personnes sans qui ce travail n'aurait jamais été possible. Je compte parmi eux bien évidemment les plongeurs SCUBA et apnéistes qui ont participé aux expériences mais aussi la trentaine de collaborateurs qui ont bénévolement donné de leur temps pour mener à bien ces expériences. John Beernaerts pour l'accès à la piscine Némó 33 et Christian Furet pour celle de Conflans-Ste-Honorine. Merci à Antoine Boutros pour sa présence et son aide matérielle tout au long des expériences. Dank u Peter pour le bel exemple d'organisation que tu as mis sur pied à Némó et toutes les corrections apportées aux différents articles.

Parmi nos plongeurs volontaires, Patrick Musimu qui malheureusement nous a quitté en juin 2011. J'aimerais également souhaiter beaucoup de courage à la famille de cet apnéiste hors pair que je respectais beaucoup.

Puis, l'analyse des échantillons sanguins aurait été impossible sans l'aide de Francis Corazza et les laborantins du CHU de Brugmann ainsi que le Dr Sponciello de DAN Europe Italie.

Je remercie également mes collègues et surtout le directeur de l'Institut Supérieur d'Ergothérapie et de Kinésithérapie (ISEK), Philippe Meeus qui a eu le don de faire régner au sein de l'école une ambiance exceptionnelle qui permet de travailler avec plaisir. Et puis, parmi mes collègues, je remercie particulièrement Thyl Snoeck dont la thèse a été pour moi un exemple de clarté et de pédagogie. Marc Amand, avec qui nous avons partagé des moments statistiquement constructifs. Enfin, David De Bels qui par son écoute, son enthousiasme et sa positivité m'a toujours remise sur le droit chemin lorsque je perdais un peu de courage et de clarté dans les idées.

Merci à mes parents sans qui je ne pourrais écrire ces mots, à mon papa pour ses éternels « Et comment va ton doctorat ? » Je les remercie également pour leur écoute permanente. Ma belle-famille et plus particulièrement Luk pour ses talents graphistes qui m'ont permis d'illustrer ce travail. Hilde, Bart et Liesbet ; Dank u voor de steun, voor jullie advies en om jullie ervaring te hebben gedeeld !² Et puis Gert, l'homme exceptionnel avec lequel j'ai la chance de partager ma vie...

Enfin, mes derniers remerciements vont aux membres du jury qui ont consacré une partie de leur temps à lire ce travail et me faire part de leur expérience.

Et me voilà 3 ans plus tard en train d'écrire ces mots, la tête pleine de souvenirs de moments agréables et de rencontres intéressantes. Merci à vous tous qui avez croisé mon chemin.

¹ PHYPODE signifie « Physiopathologie de la Décompression » et est un projet européen sous le programme *Marie Curie Initial Training Network*.

² Merci pour votre soutien, vos conseils et pour m'avoir fait partager votre expérience.

LISTE DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES

Ach – Acétylcholine

Akt – Protéine kinase B

ARNm – Adénosine ribonucléique messenger

AT II – Angiotensine II

BH₂ – Dihydrobiopterine

BH₄ – Tetrahydrobiopterine

Ca⁺⁺ – Calcium

cGMP – Guanosine Monophosphate cyclique

CO₂ – Dioxyde de carbone

COX – Cyclo-oxygénase

EDCF – Endothelium-dependent contracting factors (facteurs constricteurs endothélium-dépendants)

EDHF – Endothelium-derived hyperpolarizing factors (facteurs hyperpolarisants endothélium-dépendants)

EDRF - Endothelium-dependent relaxing factors (facteurs relaxants endothélium-dépendants)

eNOS – endothelial Nitric Oxide Synthase

ET-1 – Endotheline-1

FAD – Flavine adenine dinucléotide

FMD – Flow-Mediated Dilation (Dilatation flux-dépendante)

FMN – Flavine mononucléotide

GPx – Glutathione peroxydase

GTP – Guanosine Triphosphate

Hb – Hémoglobine

HbO – Oxy-hémoglobine

H₂O₂ – Peroxyde d'hydrogène

HSP 90 – Heat Shock Protein 90 (Protéine de choc thermique 90)

I κ B α – Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha

iNOS – Nitric Oxide Synthase inductible

KS – Kolmogorov-Smirnov

L-NAME – L-NG-Nitroarginine Methyl Ester

MDD – Maladie de décompression

n – Nombre de sujets

NADPH – Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate

NF κ B – Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

nNOS – Nitric Oxide Synthase neuronale

NO – Nitric Oxide (Monoxyde d'azote)

NOS – Nitric Oxide Synthase

NS / ns – Non-significatif

O₂^{-•} – Anion superoxyde

ONOO^{-•} – Peroxynitrite

Pabs. – Pression absolue

PAF – Platelet Activating factor (Facteur d'activation plaquettaire)

PGH₂ – Prostaglandine H₂

PGI₂ – Prostacyclin

PGIS – Prostacyclin synthétase

PI3K – Phosphatidylinositol-3-kinase

PN₂ – Pression en azote

PO₂ – Pression en oxygène

PORH – Post occlusive reactive hyperaemia (Hyperhémie réactive post-occlusive)

PPT – Peak-to-Peak Time (Temps entre les 2 pics de l'onde de pouls)

RNS – Reactive Nitrogen Species (Radicaux libres dérivés de l'azote)

ROS – Reactive Oxygen Species (Radicaux libres dérivés de l'oxygène)

rpm – Revolutions par minute

RhoA – Ras homolog gene family, member A

Rho-Kinase – Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase

R-SH – Groupements thiols

SCUBA – Self-Contained Underwater Breathing Apparatus

sGC – Guanylate Cyclase soluble

SI – Stiffness Index (Index de rigidité artérielle)

SOD – Superoxyde dismutase

SRAA – Système rénine-angiotensine-aldostérone

TBARS – Acide thiobarbiturique

t test – Test *t* de Student

TXA₂ – Thromboxane A₂

VEGF – Vascular endothelial growth factor (Facteur de croissance vasculaire)

ZTN – Zone thermiquement neutre

PUBLICATIONS, COMMUNICATIONS ET POSTERS ASSOCIES A LA REALISATION
DE LA THESE

PUBLICATIONS ASSOCIEES A LA THESE

THEUNISSEN S., SCHUMACKER J., GUERRERO F., TILLMANS F., BOUTROS A., LAMBRECHTS K., MAZUR A., PIERI M., GERMONPRE P., BALESTRA C. (2013) Dark chocolate reduces endothelial dysfunction after successive breath-hold dives in cool water. *Eur J Appl Physiol.* 2013 Sep 28.

THEUNISSEN S., SPONSIELLO N., ROZLOZNIK M., GERMONPRE P., GUERRERO F., CIALONI D., BALESTRA C. (2013) Oxidative stress in breath-hold divers after repetitive dives. *Diving Hyperb Med* 2013;43(2):63-66.

THEUNISSEN S., GUERRERO F., SPONSIELLO N., CIALONI D., PIERI M., GERMONPRE P., OBEID G., TILLMANS F., PAPADOPOULOU V., HEMELRYCK W., MARRONI A., DE BELS D., BALESTRA C. (2013) Nitric oxide-related endothelial changes in breath-hold and scuba divers. *Undersea Hyperb Med.* 2013;40(2):135-44. Cité dans « New pearls of wisdom in the diving and hyperbaric medicine literature » présenté par Jose Evangelista et Davut Savaser dans l'UHMS conference (Orlando, FL) ; Juin 2013.

GUERRERO F., THIOUB S., GOANVEC C., **THEUNISSEN S.**, FERAY A., BALESTRA C., MANSOURATI J. (2012) Effect of tetrahydrobiopterin and exercise training on endothelium-dependent vasorelaxation in SHR. *Physiol Biochem.* 2012;69:277-87.

BALESTRA C., GERMONPRE P., VIRGILI F., SNOECK T., **THEUNISSEN S.**, SZCZESNY G., LAFERE P., MARABOTTI C., CATAPANO G., FRANCHI D., CIALONI D., BEDINI R., MARRONI A. Post Immersion Flow Mediated Dilation: Comparison between Scuba and Apnea Divers. *Eur J Underwater and Hyperb Med.* 2006;7:51-52.

MARABOTTI C., BEDINI R., BALESTRA C., SCALZINI A., BELARDINELLI A., PASSERA M., CIALONI D., **THEUNISSEN S.**, SZCZESNY G., CATAPANO G. Anatomical and Functional Cardiac Changes During Scuba Diving : an Underwater Echographic Study. *Eur J Underwater Hyperb Med* 2006;7:62.

SZCZESNY G., BALESTRA C., GERMONPRE P., SNOECK T., LAFERE P., **THEUNISSEN S.**, MARRONI, A. Computer Assisted Evaluation of Flow Mediated Dilation. *Eur J Underwater Hyperb Med* 2006;7:50-51.

COMMUNICATIONS DANS DES CONGRES

THEUNISSEN S., TILLMANS F., SCHUMACKER J., HEMELRYCK W., BOUTROS A., OBEID G., BALESTRA C., LAFERE P., GUERRERO F., GERMONPRE P. Dark chocolate prevents endothelial function after a SCUBA dive - European Underwater and Barometrical Society – 39th Annual Meeting – Saint-Gilles, La Réunion – September 23th - 28th, 2013.

THEUNISSEN S., SCHUMACKER J., TILLMANS F., HEMELRYCK W., BOUTROS A., LAMBRECHTS K., MAZUR A., PIERI M., GUERRERO F., GERMONPRE P., BALESTRA C. Dark chocolate improves endothelial function in breath-hold diving. European Underwater and Barometrical Society – 38th Annual Meeting – Belgrade, Serbia – September 11th -16th, 2012.

THEUNISSEN S. Effects of hyperoxia on vascular responsiveness. Deutsche Physiologische Gesellschaft – Dresden, Germany – 91st Annual Meeting – March 22th - 25th, 2012.

POSTERS – POSTERS

THEUNISSEN S., SPONSIELLO N., TILLMANS F., GUERRERO F., GERMONPRE P., HEMELRYCK W., BALESTRA C. (2012) Oxidative stress in breath-hold divers after successive dives - European Underwater and Barometrical Society – 38th Annual Meeting – Belgrade, Serbia – September 11th -16th (Patrick Musimu Award).

THEUNISSEN S., DE BELS D., DEVRIENDT J., GERMONPRE P., LAFERE P., VALSALMIS J., SNOECK T., MEEUS P., BALESTRA C. (2011). The “Normobaric Oxygen Paradox”: does it increase Hb? - European Underwater and Barometrical Society – 37th Annual Meeting – Gdansk, Poland – August 22th -28th

THEUNISSEN S., GUERRERO F., GERMONPRE P., BALESTRA C. (2011). Reduced Endothelial Function both in SCUBA and Breath-hold Diving - European Underwater and Barometrical Society – 37th Annual Meeting – Gdansk, Poland – August 22th -28th

AUTRES PUBLICATIONS

LEVENEZ M., **THEUNISSEN S.,** BOTTERO A., SNOECK T., BRUYERE A., TINLOT A., BALESTRA C., PROVYN S. The effect of a passive stretch training protocol on performance during a drop jump in humans. *J Sports Med Phys Fitness* 2013 ; 53: 319-326.

VIVARIO R., HALLET G., VIVARIO V., **THEUNISSEN S.** Étude visant à définir un profil de force isométrique chez les cavalières âgées de 16 à 26 ans. *Kinesither Rev.* 2013, *in press.*

DE BELS D., **THEUNISSEN S.,** DEVRIENDT J., GERMONPRE P., LAFERE P., VALSALMIS J., SNOECK T., MEEUS P., BALESTRA C. The 'normobaric oxygen paradox': does it increase haemoglobin? *Diving Hyperb Med.* 2012 Jun;42(2):67-71.

THEUNISSEN S., DE BELS D., DEVRIENDT J., GERMONPRE P., LAFERE P., VALSALMIS J., SNOECK T., MEEUS P., BALESTRA C. The normobaric oxygen paradox: does it increase haemoglobin? *Crit Care.* 2011; 15(Suppl 1): 422

DE BELS D., DEVRIENDT J., GOTTIGNIES P., CHOCHRAD D., **THEUNISSEN S.,** SNOECK T., BALESTRA C., PILARD U., ROQUES S. Hand-grip test is a good predictor of extubation success in adult ICU patients. *Crit Care.* 2011; 15(Suppl 1): 161

AMAND, M., MEEUS, P., **THEUNISSEN, S.,** BALESTRA, C. Inter-age Score to Evaluate kinesthetic abilities (ISEK Test) operates symmetrically to the hand grip strength (grip test). *Kinesither Rev.* 2010;10:39-45.

Ce travail est structuré de la manière suivante :

Chapitre 1 – Une introduction générale permet au lecteur de se replonger dans le sujet et d’acquérir les connaissances nécessaires à la compréhension et l’interprétation de ce travail. Elle aborde les contraintes environnementales rencontrées en plongée en scaphandre autonome et en apnée, l’endothélium, le monoxyde d’azote, les antioxydants et une revue de la littérature concernant les recherches effectuées sur l’endothélium et stress oxydant en plongée.

Chapitre 2 – Le deuxième chapitre présente le matériel et les outils méthodologiques. Il comprend la description de l’exploration de la fonction endothéliale, des mesures effectuées à partir des échantillons sanguins ainsi qu’une analyse critique des méthodes utilisées.

Chapitre 3 – Le troisième chapitre présente la dysfonction endothéliale observée dans les 2 types de plongée, en scaphandre autonome et en apnée. Elle engendre la question du stress oxydant en apnée qui n’avait jusqu’ici peu voire pas été mis en avant.

Chapitre 4 – Ce chapitre analyse le stress oxydant présent chez le plongeur effectuant 20 minutes d’apnées successives.

Chapitre 5 – Le stress oxydant étant présent en plongée en scaphandre autonome et en apnée, ce chapitre montre les effets du chocolat noir et blanc sur des sujets sains non plongeurs. Le but étant de savoir si le chocolat pouvait être un moyen préventif de la dysfonction endothéliale observée en plongée.

Chapitre 6 – Ce chapitre décrit les effets du chocolat noir sur la fonction endothéliale. Celui-ci ayant un effet positif chez le sujet sain, il fut testé en supplémentation avant une plongée en scaphandre autonome.

Chapitre 7 – Le même protocole fut appliqué aux plongeurs en apnée. Ce chapitre décrit donc les effets du chocolat noir sur la fonction endothéliale après 20 minutes d’apnées successives.

Après un tableau général récapitulant tous les résultats obtenus dans les différentes expériences, une discussion générale reprend l'analyse critique de l'évolution des recherches de ce travail et tente d'établir un modèle des mécanismes rencontrés dans les différents types de plongée.

Enfin, la conclusion résume ce qu'il faut retenir de ces études et pointe une ouverture vers le futur.

Tout au long de ce travail, nous avons tenté de répondre aux questions suivantes :

- La dysfonction endothéliale observée après une plongée en scaphandre autonome est-elle également observée en apnée ?
- Quels sont les mécanismes sous-jacents au stress oxydant observé dans les 2 types de plongée ?
- Comment prévenir la dysfonction endothéliale due au stress oxydant ?
- Si le chocolat noir a un effet de prévention, quelle quantité et combien de temps avant la plongée faut-il l'administrer afin d'obtenir un effet maximal ?
- Quels sont les mécanismes d'action du chocolat noir combiné à la plongée sur la fonction endothéliale ?
- Ce moyen de prévention est-il efficace aussi bien pour la plongée en scaphandre autonome qu'en apnée ?

Préalable éthique :

Toutes les expériences ont été réalisées en accord avec la déclaration d'Helsinki et approuvées par le comité académique de bioéthique de Bruxelles (B200 – 2009 – 39). Toutes les méthodes et risques potentiels ont été expliqués en détail aux participants et un formulaire de consentement éclairé fut signé avant les expérimentations.

Objectifs : La plongée à l'air induit une diminution de la dilatation flux-dépendante (FMD), liée à une augmentation du stress oxydant. Celle-ci a été interprétée comme une dysfonction endothéliale qui serait due soit à l'hyperoxie, soit à l'action de bulles circulantes générées pendant la décompression. L'objectif de ce travail est de comparer les effets de la plongée à l'air et d'une série de plongées successives en apnée sur la vasodilatation d'origine endothéliale et le stress oxydant. Ensuite, tenter de prévenir la dysfonction endothéliale post plongée par une supplémentation en antioxydants.

Méthodes : La fonction endothéliale des grosses artères est évaluée par la FMD et celle des petites artères par l'hyperhémie réactive post-occlusive (PORH) ou par l'index de rigidité artérielle (SI) calculé à partir de la vitesse de l'onde de pouls. Les concentrations plasmatiques de monoxyde d'azote (NO) et des peroxynitrites (ONOO⁻) furent évaluées en mesurant respectivement les nitrites/nitrates et la nitrotyrosine par colorimétrie. Les effets de 30g de chocolat noir et de chocolat blanc sur la fonction endothéliale furent testés sur des sujets sains puis le chocolat noir fut donné en supplémentation 1h30 avant la plongée à l'air et 1h avant une série de plongées successives en apnée.

Résultats : La FMD diminue aussi bien après la plongée à l'air qu'après la plongée en apnée. Le taux de NO circulant est inchangé après la plongée à l'air alors qu'il augmente après l'apnée. Cette augmentation de NO est accompagnée d'un taux plus élevé de ONOO⁻. La PORH est réduite après la plongée à l'air alors qu'elle est augmentée chez les plongeurs en apnée. Dans une eau plus froide que les conditions thermiquement neutres, le taux de NO se voit réduit et les ONOO⁻ inchangés chez les plongeurs en apnée. La prise de chocolat noir, mais pas de chocolat blanc, augmente la FMD et réduit la rigidité des artères périphériques de sujets sains 2h après son ingestion. Lorsque le chocolat noir est administré en supplémentation à des plongeurs, la FMD est augmentée aussi bien après la plongée à l'air qu'en apnée. Le NO augmente après la plongée à l'air alors qu'il ne change pas après l'apnée. Les taux de ONOO⁻ ne montrent aucune évolution dans aucun des 2 types de plongée après ingestion de chocolat noir. Le SI n'évolue dans aucune des conditions expérimentales.

Conclusion: La diminution de la FMD après la plongée en apnée suggère qu'elle n'est pas liée aux bulles de décompression. En apnée, comme en plongée à l'air, elle est liée à un stress oxydant puisqu'elle est prévenue par le chocolat noir. Le ONOO⁻ ne semble pas être un bon marqueur de stress oxydant en plongée. Le chocolat noir est un bon moyen préventif pour la dysfonction endothéliale aussi bien en plongée à l'air qu'en apnée. L'absence de variation du NO suggère que la diminution de la FMD est la conséquence d'une activité du système nerveux autonome et/ou d'une altération du muscle lisse vasculaire. La PORH semble être un meilleur moyen que le SI pour observer la fonction endothéliale des petites artères à court terme. Les mécanismes observés en plongée sont un bon modèle pour la personne âgée où du stress oxydant et une dysfonction endothéliale sont également retrouvés.

Objectives : SCUBA diving induces a reduced flow-mediated dilation (FMD), associated with an increased oxidative stress. This has been interpreted as an endothelial dysfunction either due to hyperoxia or to an action of circulating bubbles generated during decompression. The objective of this study is to compare the effects of SCUBA diving with a series of successive breath-hold dives on endothelial vasodilation and on oxidative stress. Then trying to prevent post dive endothelial dysfunction by a supplementation in antioxidants.

Methods : Endothelial function of large arteries is evaluated by FMD and those of small arteries by post-occlusive reactive hyperemia (PORH) or by the stiffness index (SI) calculated from the speed of the pulse wave. Plasmatic concentrations of nitric oxide (NO) and peroxynitrites (ONOO⁻) were evaluated by measuring respectively nitrite/nitrate and nitrotyrosine by colorimetry. The effects of 30g dark chocolate and white chocolate on endothelial function were tested on healthy subjects. Then dark chocolate was given as a supplement 1h30 before SCUBA diving and 1 hour before a series of successive breath-hold dives.

Results: FMD is reduced after SCUBA diving and after breath-hold diving. The level of circulating NO remains unchanged after SCUBA diving while it increases after breath-hold diving. The increase of NO is accompanied by a higher rate of ONOO⁻. The PORH is reduced after SCUBA diving while it is increased in the breath-hold group. In a water colder than the thermo-neutral conditions, NO is reduced and ONOO⁻ does not change after breath-hold diving. After a supplementation in dark chocolate, but not in white chocolate, FMD increases and the stiffness of small arteries is reduced in healthy subjects 2h after its ingestion. When dark chocolate is administered to divers FMD is increased after SCUBA diving and breath-hold diving. NO is increased after SCUBA diving while it does not change after breath-hold diving. The level of ONOO⁻ showed no change in any of the two types of diving after eating dark chocolate. The SI remains unchanged in all experimental conditions.

Conclusion: The decreased FMD after breath-hold diving suggests that it is not related to decompression bubbles. Breath-hold and SCUBA diving are associated with oxidative stress since it is prevented by dark chocolate. The ONOO⁻ level does not seem to be a good marker of oxidative stress in diving. Dark chocolate is a good way to prevent endothelial dysfunction in SCUBA diving and in breath-hold diving. The lack of variation in NO level suggests that the reduced FMD results from the activity of the autonomic nervous system and/or an alteration of vascular smooth muscle. PORH seems to be a better way than the SI to assess the endothelial function of small arteries in the short term. Mechanisms observed in diving are a good model for the elderly people where oxidative stress and endothelial dysfunction are also encountered.

A ma famille, à mes Amis, à mes Pairs, à Jean-Phi¹...

¹ Que la montagne a emporté le 7 avril 2003...

Chapitre 1 - INTRODUCTION GENERALE

1.1. CONTRAINTES ENVIRONNEMENTALES ASSOCIEES A LA PLONGEE

Dans ce paragraphe, nous allons lister les contraintes environnementales associées à la plongée sous-marine. Il s'agit de l'effet de l'immersion, du froid et de l'exposition hyperbare. Cette dernière sera illustrée par les lois de Dalton, Henry et Boyle-Mariotte où une distinction sera faite entre la plongée à l'air et la plongée en apnée. Nous expliquerons ensuite brièvement l'influence de l'hypoxie, l'hypercapnie et l'exercice sur les paramètres physiologiques.

1.1.1. L'IMMERSION

L'environnement sous-marin est un monde magique mais qui impose au corps des stress physiologiques prononcés. Les effets de l'immersion sont tous liés à la pression hydrostatique et couplés à ceux de la profondeur, ils contraignent le système cardiovasculaire, rénal et respiratoire ([Pendergast et coll. 2009](#)).

L'immersion tête hors de l'eau, de par l'apesanteur, entraîne un déplacement immédiat de sang depuis les membres vers l'abdomen et la cage thoracique. Ceci augmente le volume sanguin intrathoracique ([Arborelius et coll. 1972](#)), la pression centrale veineuse ([Hood et coll. 1968](#)) et étire les cavités cardiaques qui en réponse à un pré-étirement vont se contracter plus fortement, augmentant le volume d'éjection systolique et donc le débit cardiaque. De plus, un déplacement de plasma s'opère depuis les compartiments extracellulaires vers le système vasculaire ([Pendergast et coll. 2009](#)) augmentant le volume sanguin et donc la pression artérielle.

En réponse à l'étirement de l'oreillette droite, la libération du facteur natriurétique auriculaire va augmenter la diurèse par inhibition de l'hormone anti-diurétique de manière à rétablir le volume sanguin, la pression artérielle, le volume d'éjection systolique et enfin le débit cardiaque.

Lorsque la pression ambiante augmente, par exemple lors d'une immersion tête hors de l'eau en chambre hyperbare ([Matsuda et coll. 1978](#)), le volume d'éjection systolique reste constant mais la fréquence cardiaque diminue, entraînant une diminution du débit

cardiaque. Nous retrouvons en effet une bradycardie induite par le nerf vague et une vasoconstriction périphérique due à l'augmentation de l'activité du système sympathique liée à l'hypertension initiale ([Lindholm et coll. 2009](#)).

Pendant la plongée en scaphandre autonome, les plongeurs sont exposés à des influences externes qui affectent la fonction cardio-vasculaire. En effet, certaines études montrent que la plongée à l'air est associée à une augmentation de la pression pulmonaire ([Dujic et coll. 2006](#)) et à une dysfonction endothéliale artérielle ([Brubakk et coll. 2005](#); [Obad et coll. 2010](#)). Au niveau cardiaque, la plongée à l'air induit à la fois une augmentation de la précharge (par déplacement sanguin de la périphérie vers le cœur) et une augmentation de la postcharge (par vasoconstriction périphérique) ainsi qu'une diminution du débit cardiaque ([Valic et coll. 2005](#)). La plupart de ces changements sont encore présents après la plongée. L'effort cardio-vasculaire est en plus augmenté par une limitation de la ventilation en plongée (résistances respiratoires augmentées, limitation par l'équipement et la densité des gaz respirés).

Lors de l'immersion en apnée, ces changements sont encore plus prononcés. En effet, les plongeurs en apnée présentent une réduction du débit cardiaque par diminution de la fréquence cardiaque et du volume d'éjection systolique ([Marabotti et coll. 2008](#)).

Une autre réponse hémodynamique retrouvée pendant l'apnée est une remise en circulation d'érythrocytes par la rate augmentant la capacité de stockage des gaz et la fonction de transport de la circulation sanguine, ce qui pourrait faciliter la plongée en apnée chez les humains ([Hurford et coll. 1990](#)). Mais cela peut diminuer la fluidité du sang et augmenter les problèmes liés à la distribution sanguine, accentuant les possibles risques de shunt mécanique et d'embolie gazeuse cérébrale. Néanmoins, étant donné que seulement une quantité réduite d'érythrocytes est relâchée durant l'apnée ([Schagatay et coll. 2001](#)), leur rôle dans les accidents de décompression est sans doute limité.

Toutes ces modifications hémodynamiques sont reprises sous le nom de « réflexe du plongeur ». Ces changements incluant un déplacement de sang vers le thorax et de l'eau extracellulaire vers l'espace vasculaire pourraient entraîner une accumulation d'eau extravasculaire dans les poumons et augmenter le risque d'œdème pulmonaire chez les plongeurs en apnée.

Pour l'évaluer, les comètes pulmonaires détectées par une échographie thoracique sont un signe simple et non-invasif de l'augmentation de l'eau extravasculaire pulmonaire ([Frassi et coll. 2008](#)). Marinovic et coll. ([Marinovic et coll. 2010](#)) furent les premiers à rapporter une accumulation d'eau extravasculaire chez les plongeurs SCUBA lors de 6 plongées au TRIMIX sur des jours consécutifs. Celle-ci ne retourne pas à sa valeur de base lors des plongées répétées et pourrait donc avoir un effet cumulatif possible augmentant le risque d'oedème pulmonaire. Néanmoins, les plongées SCUBA effectuant des plongées à 33m pendant 20 minutes avec une remontée sans palier de décompression ne mettent pas en évidence une augmentation des comètes pulmonaires ([Dujic et coll. 2011](#)). Celles-ci ne changent pas après une plongée profonde mais leur augmentation devient significative après la 2^{ème} plongée successive ([Ljubkovic et coll. 2010](#)).

Du côté des apnéistes, une augmentation des comètes pulmonaires fut retrouvée chez les plongeurs en apnée de haut niveau, indiquant une prévalence assez importante d'accumulation d'eau extravasculaire dans les poumons ([Frassi et coll. 2008](#)). La combinaison de 3 mécanismes fut proposée pour expliquer cette augmentation des comètes pulmonaires en apnée ([Lambrechts et coll. 2011](#)) : (1) le gradient de pression hydrostatique induit par l'immersion provoque un déplacement du sang veineux périphérique vers le thorax, (2) l'effet de concentration sanguine (« blood pooling ») retrouvé durant le « réflexe du plongeur » redistribue le sang vers le lit vasculaire pulmonaire et (3) les contractions diaphragmatiques involontaires de fin d'apnée entraînent un déplacement du sang des capillaires pulmonaires vers les alvéoles pulmonaires. Néanmoins, une étude sur les pêcheurs en apnée a trouvé une augmentation des comètes chez 3 plongeurs sur 30 lors de 2 compétitions de 5 heures de pêche. Chez deux d'entre eux, elles étaient associées à des problèmes pulmonaires tels que la toux ou une dyspnée ainsi qu'une diminution du débit pulmonaire ([Boussuges et coll. 2011](#)).

1.1.2. LE FROID

Nous parlons d'immersion en eau froide lorsque la température de l'eau se trouve en dehors de la zone thermiquement neutre (ZTN). La définition de celle-ci fut établie en 1902 pour la première fois sur les animaux par Max Rubner ([Rubner 1982](#)) et fut ensuite appliquée à l'homme en 1937 par Hardy et Dubois ([Hardy et coll. 1937a](#)). La

limite inférieure de la ZTN fut définie comme « *le gradient maximum (T° peau – T° air) pour lequel le corps peut maintenir sa température sans augmenter la production de chaleur* ». En dessous de cette limite, la régulation de la perte de chaleur par vasoconstriction cutanée n'est plus suffisante pour maintenir la température corporelle ([Hardy et coll. 1937a](#); [Hardy et coll. 1937b](#)). De nos jours, la définition de la ZTN est reformulée et correspond à « *la zone de température ambiante pour laquelle la régulation de température est obtenue seulement par le contrôle de la perte minimale de chaleur (à sec), c'est à dire sans changements dans la régulation métabolique de la production de chaleur ou de la perte de chaleur par évaporation. La zone thermiquement neutre (ZTN) sera donc différente lorsque l'isolant, la posture ou le métabolisme de base varie* » ([IUPS 2001](#)). La régulation de la perte de chaleur correspond à une perte par conduction, convection ou radiation ([Incropera et coll. 2007](#)). En 1966, Craig and Dvorak ([Craig et coll. 1966](#)) définirent une ZTN dans l'eau. Celle-ci correspond à une température de l'eau de 34-35°C.

L'immersion en eau froide entraîne une augmentation similaire du volume d'éjection systolique et du débit cardiaque ([Pendergast 1988](#)) que lors de l'immersion dans la ZTN. Les changements induits par le froid sont principalement dus à une augmentation de l'activité du système sympathique ([Sramek et coll. 2000](#)). Dans l'eau froide, la vasoconstriction cutanée est initiée par la diminution de la température de la peau qui active le système sympathique augmentant lui-même la vasoconstriction périphérique ([O'Brien et coll. 2000](#)). Il fut démontré que le monoxyde d'azote (NO) est impliqué dans la régulation thermique ([Simon 1998](#)) ; d'ailleurs il est réduit dans les gaz expirés pendant l'exposition au froid ([Pendergast et coll. 1999](#)).

Le froid a également pour effet de déplacer la courbe de dissociation de l'oxygène vers la gauche, augmentant l'affinité de celui-ci pour l'hémoglobine. Ceci a pour conséquence que moins d'oxygène pourra être prélevé dans le sang à la périphérie.

La vasoconstriction due au froid atteint également le muscle, y compris le muscle cardiaque, réduisant le débit cardiaque maximal et limitant la capacité à faire de l'exercice dans l'eau froide ([Pendergast 1988](#)) sans qu'il n'y ait de réduction du recrutement des fibres musculaires ([Coulange et coll. 2006](#)).

La profondeur a également un effet significatif sur le stress thermique car la pression hydrostatique comprime la combinaison du plongeur et augmente la conductivité thermique, aggravant la perte de chaleur ([Bardy et coll. 2006](#)).

En plus de tous les stress physiologiques sus-mentionnés, nous retrouvons une diminution significative des performances cognitives dans l'eau froide ([Davis et coll. 1975](#)).

La plupart des mers du monde sont en dessous de la température thermiquement neutre de l'humain et comme elles sont combinées à une plus grande conductance thermique, elles présentent un danger d'hypothermie pour les plongeurs, qu'ils soient professionnels ou de loisirs, en SCUBA ou en apnée.

1.1.3. L'EXPOSITION HYPERBARE

LOI D'HENRY

*A température constante et à saturation,
la quantité de gaz dissout dans un liquide est proportionnelle
à la pression qu'exerce ce gaz sur le liquide.*

La loi d'Henry stipule que la quantité de gaz dissoute dans un fluide est proportionnelle à la pression partielle du gaz en contact avec le fluide. Parce que l'azote n'est pas métabolisé dans le corps, il se dissout jusqu'à ce qu'un équilibre entre la pression d'azote dans les poumons et dans les tissus soit atteint ([Doolette et coll. 2001](#)). Quand la P_{N_2} du sang ou des tissus est plus grande que la pression partielle ambiante en N_2 , le plongeur est dit sursaturé et la formation de bulles peut s'observer. Celles-ci pourraient blesser les tissus dans lesquels ils apparaissent comme un corps étranger qui abîme l'endothélium vasculaire ([Marabotti et coll. 1999](#); [Nossum et coll. 2002](#); [Nossum et coll. 1999](#); [Warren et coll. 1973](#)). Les bulles sont souvent observées pendant la décompression après une plongée SCUBA dans l'eau ([Germonpre et coll. 2009](#)) ou en chambre hyperbare ([Blatteau et coll. 2008](#)). En 2005, Brubakk et coll. ont rapporté une dysfonction endothéliale après la plongée à l'air, mettant notamment en cause une éventuelle action des bulles de décompression ([Brubakk et coll. 2005](#)).

La production d'embolies gazeux fut questionnée pour les plongeurs en apnée puisqu'ils plongent sur une simple respiration et ne sont pas supplémentés en gaz pressurisé pendant la plongée comme le sont les plongeurs SCUBA ([Hooker et coll. 2012](#)). Il peut donc être attendu que dans le cas où il n'y a pas ou peu de bulles, la dysfonction endothéliale sera absente ou limitée.

Le terme « maladie de décompression » (MDD) se réfère à tout problème qui se passe durant la décompression ([Lemaitre et coll. 2009](#)). La quantité de gaz inertes est très limitée pendant l'apnée impliquant que le risque de MDD chez les apnéistes est clairement plus faible qu'en plongée à l'air ([Alaimo et coll. 2010](#); [Moon et coll. 2010](#)). Néanmoins, avec une série d'apnées successives, l'accumulation d'azote dans les tissus et le sang pourrait provoquer un accident de décompression ([Dujic et coll. 2012](#)).

LOI DE BOYLE-MARIOTTE

*À température constante, le volume d'un gaz
est inversement proportionnel
à la pression qu'il reçoit.*

La loi de Boyle-Mariotte n'entraînera pas de grands changements physiologiques chez les plongeurs SCUBA puisqu'ils compensent le volume de gaz diminué en gonflant leur gilet de stabilisation et l'air comprimé respiré par le détendeur permet aux poumons de se remplir complètement. A la remontée, le plongeur SCUBA devra bien faire attention de ne pas garder sa respiration afin de laisser s'échapper l'air qui augmente de volume et éviter la surpression pulmonaire.

Si cette loi n'est pas un gros problème pour les plongeurs SCUBA, c'est loin d'être le cas pour les apnéistes. En effet, les animaux marins ont une cage thoracique très COMPLIANTE et des voies respiratoires supérieures rigides. Ceci est une adaptation qui permettrait à la cage thoracique de se comprimer avec l'augmentation de pression, poussant l'air dans les voies respiratoires supérieures. De ce fait, les échanges gazeux seraient fortement limités en profondeur réduisant la quantité d'azote pendant les apnées. L'homme quant à lui à une cage thoracique rigide ne lui permettant pas de se comprimer suffisamment pour supprimer les échanges gazeux. Néanmoins, de très rares cas d'accidents de décompression ont été retrouvés chez les apnéistes ([Alaimo et coll. 2010](#); [Moon et coll. 2010](#)).

Les deux facteurs qui induisent des modifications importantes de l'apnée sont la profondeur et le temps de l'apnée volontaire. Ces deux paramètres sont en constante évolution avec des records à 214 m de profondeur en « no limit » et des apnées statiques

de 11 minutes et 35 secondes (www.aida-international.org). Les apnées de compétition ont dépassé la profondeur maximale prédite par le ratio physiologique entre la capacité pulmonaire totale et le volume résiduel ([Lindholm et coll. 2005](#)). Dans le but d'éviter un collapsus pulmonaire pendant la descente, les plongeurs utilisent le pompage buccal avant leurs plongées pour amener le volume pulmonaire au-dessus de la capacité totale du poumon ([Lindholm et coll. 2005](#)). Ceci a comme avantage d'obtenir un volume de stockage de l'oxygène plus important, d'avoir du volume supplémentaire pour l'équilibration de l'oreille moyenne pendant la descente et d'augmenter la performance des apnées ([Dujic et coll. 2012](#)). Par contre, le pompage buccal augmente la pression intrathoracique, diminue le retour veineux, compromet le pompage cardiaque et diminue la pression artérielle, ce qui peut entraîner le plongeur en apnée à une hypotension symptomatique ou une syncope appelée « packing blackout » ([Ferrigno et coll. 1986](#); [Potkin et coll. 2007](#))

LOI DE DALTON

$$Pp_{\text{gaz}} = F_{\text{gaz}} \times P_{\text{abs.}}$$

Avec Pp_{gaz} = pression partielle du gaz (en Pa), F_{gaz} = fraction (en %) du gaz dans le mélange, $P_{\text{abs.}}$ = pression ambiante absolue (en Pa.)

La notion de pression partielle est importante pour définir les seuils de toxicité des gaz. L'oxygène représente un danger pour les plongeurs à partir d'une pression partielle de 1,6 bar. Lors d'une plongée à l'air contenant 21% d'oxygène, cette valeur critique est atteinte à la profondeur de 66 m ($P_{\text{abs.}} = 1,6 / 0,21 = 7,6$ bars). Afin de limiter l'accumulation d'azote dans les tissus, certains plongeurs respirent un mélange enrichi en oxygène (Nitrox) mais sont donc limités en profondeur à cause du plus grand pourcentage d'oxygène contenu dans leur mélange.

En dehors du fait que l'oxygène soit toxique à une certaine profondeur, ce gaz est également responsable de stress oxydant, déséquilibre entre la génération des radicaux libres dérivés de l'oxygène (ROS) et de la capacité de l'organisme à les neutraliser. Le stress oxydant joue un rôle important dans les pathologies cardio-vasculaires ([Kojda et coll. 1999](#)) et est la conséquence d'une augmentation de la génération de molécules pro-oxydantes et/ou d'une diminution de l'activité des systèmes antioxydants ([de Dios et](#)

[coll. 2010](#)). Les ROS et les radicaux libres dérivés de l'azote (RNS) incluent l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le radical hydroxyle ($OH^{\cdot}$), le monoxyde d'azote (NO) et le peroxynitrite ($ONOO^{\cdot}$). Ces molécules sont des régulateurs spécialement importants des états d'oxydo-réduction des cellules. Ces ROS et RNS sont des métabolites de l'oxygène et/ou de l'azote qui peuvent soit oxyder (enlever un électron), soit réduire (donner un électron), soit réagir et devenir part d'autres molécules ([Harrison et coll. 2009](#))

L'hyperoxie maintenue durant la plongée à l'air entraîne une augmentation de ROS connus pour avoir un effet sur la fonction endothéliale. L'hyperoxie entraîne également des altérations du système nerveux autonome pendant la respiration hyperoxique et après le retour à la normoxie ([Gole et coll. 2011](#)).

Durant la plongée en apnée, la pression partielle en oxygène augmente durant la phase de descente mais pour une période limitée. La question de l'effet de l'hyperoxie intermittente sur le système vasculaire en apnée reste donc ouverte.

1.1.4. L'HYPOXIE/HYPERCAPNIE

Le terme hypercapnie désigne une pression partielle plasmatique en dioxyde de carbone (CO_2) supérieure à 45 mm Hg. Nous pouvons la retrouver en cas d'hypoventilation alvéolaire, lors d'insuffisance respiratoire chronique ou dans le réflexe d'apnée (réflexe d'inspiration lorsque le taux de CO_2 plasmatique devient important) via les neurones du centre respiratoire du tronc cérébral. L'hypercapnie en plongée SCUBA peut se retrouver lorsque les détendeurs offrent de grandes résistances à la respiration augmentant la rétention de CO_2 . Celle-ci peut apparaître sans qu'il n'y ait de signe de dyspnée ([Warkander et coll. 1992](#)). La rétention au CO_2 induite par la plongée peut provoquer une narcose au CO_2 induisant des convulsions. Ces mécanismes restent sombres mais impliquent peut-être la sensibilité au CO_2 ([Lanphier et coll. 1999](#)).

Lors de l'apnée, l'hyperoxie en début de plongée laisse progressivement place à une hypoxie et une acidose hypercapnique secondaire à l'anaérobie. Ces facteurs peuvent causer une perte de conscience à la remontée, des barotraumatismes et maladies de décompression ([McCrorry et coll. 2004](#)). Cela est d'autant plus vrai lorsque les plongeurs pratiquent l'hyperventilation. En effet, la fin de l'apnée se signe par une élévation importante du taux de CO_2 et des contractions réflexes du diaphragme entraînant un

besoin de respirer et donc la remontée. A la remontée le plongeur subit une baisse brutale de la PO₂ (hypoxie importante). A la fin de la plongée, l'apnéiste est en hypoxie/hypercapnie où la pression partielle alvéolaire en oxygène peut être inférieure à 20-30 mmHg avec une saturation artérielle en oxygène aux alentours de 50% ([Overgaard et coll. 2006](#)). Si le plongeur pratique l'hyperventilation avant la plongée afin d'augmenter son temps maximal d'apnée, il réduit la pression partielle en CO₂ avant de descendre et retarde le signal d'alarme pour remonter. L'hyperventilation augmente donc le risque d'accident hypoxique durant la plongée en apnée.

1.1.5. L'EXERCICE PHYSIQUE

De nombreuses études ont observé les effets de l'exercice avant la plongée ([Blatteau et coll. 2005](#); [Gennser et coll. 2012](#); [Jurd et coll. 2011](#); [Loiset et coll. 2006](#); [Pendergast et coll. 2012](#)) ou durant la décompression ([Madden et coll. 2013](#)) ainsi que des effets de l'entraînement physique sur la formation de bulles de décompression ([Pontier et coll. 2009](#)) ou sur la fonction cardio-vasculaire ([Gole et coll. 2009a](#); [Mourot et coll. 2009](#)). Dans ce paragraphe, nous nous limiterons aux effets de l'exercice dans l'eau.

Bouger dans l'eau est nettement plus difficile que bouger dans l'air car la densité de l'eau est significativement différente. Le travail externe (mouvements de l'eau) et interne (charge cardio-vasculaire) sont tous les 2 augmentés ([Pendergast et coll. 2003a](#)). Lorsque le sujet fait de l'exercice dans l'eau, sa fonction circulatoire est altérée avec une augmentation du volume d'éjection systolique, du débit cardiaque, de la perfusion des tissus non-musculaires, une réduction de la fréquence cardiaque et des résistances périphériques ([Hlastala 1996](#)). Tous ces changements ne facilitent pas l'effort dans l'eau. Le coût énergétique de la locomotion sous-marine est fortement dépendant de la technique et varie donc d'un sujet à l'autre de plus ou moins 25% ([Pendergast et coll. 2009](#)). Le débit cardiaque maximal, la fréquence cardiaque, le débit sanguin, le transport d'oxygène, le seuil anaérobie et la puissance sont environ 15% plus faibles dans l'eau que dans l'air, même dans une eau à température thermiquement neutre ([Pendergast 1988](#)). Durant la nage sous-marine avec palmes, la consommation d'oxygène maximale est significativement plus basse que dans l'air et que durant la nage en surface ([Capelli et coll. 1998](#)). Parallèlement, le coût énergétique de la nage sous-marine avec palmes est influencé par le type de palmes ([Pendergast et coll. 2003b](#)). L'exercice à une profondeur de 27 et 36 mètres n'affecte pas la puissance maximale mais réduit la consommation

d'oxygène de 9,5%, la fréquence cardiaque de 7% et la ventilation maximale minute de 41% (Claybaugh et coll. 1997).

1.1.6. TABLEAU GÉNÉRAL DES CONTRAINTES ENVIRONNEMENTALES SCUBA ET APNÉE

	SCUBA	Apnée
Immersion	"Réflexe du plongeur"	
<i>Cardiaque</i>	↗ Précharge par déplacement sanguin vers le thorax (risque d'oedème pulmonaire) ↗ Postcharge par vasoconstriction périphérique ↘ Fréquence cardiaque (FC) (activité du nerf vague) ↘ Volume d'éjection systolique (VES) ↘ Débit cardiaque (car $DC = FC \times VES$)	
<i>Vasculaire</i>	Vasoconstriction périphérique pour ↘ la consommation d'oxygène (due à une ↗ de l'activité sympathique)	↘ Retour veineux car hyperpression thoracique Relâchement d'érythrocytes par la rate (effet de l'apnée)
<i>Respiratoire</i>	<u>Pas de compression thoracique</u> mais limitation de la ventilation par : - ↗ Résistances respiratoires - Limitation par l'équipement - ↗ Densité des gaz	<u>Hyperpression thoracique</u> entraîne: - ↗ Pression des capillaires pulmonaires compromettant la barrière air-sang - Hypoventilation alvéolaire → risque d'hypercapnie - ↘ Volume pulmonaire < volume résiduel (VR) - Risque de collapsus pulmonaire → pompage buccal mais risque de syncope
<i>Nerveux</i>	↗ Système nerveux sympathique → vasoconstriction périphérique Activité du nerf vague → bradycardie	
Hyperoxie	<u>Continue</u> : - ↗ Radicaux libres dérivés de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS) - Altérations cardio-vasculaires - Altérations du système nerveux autonome	<u>Intermittente</u> : - Durant la phase de descente - L'apnée stimule les défenses antioxydantes
Hypoxie Hypercapnie	- Normalement pas d'hypoxie en plongée SCUBA - Hypercapnie possible dans le cas de grandes résistances à la respiration → Narcose au CO ₂ (convulsions)	- Hypoxie + hypercapnie lors de la remontée - L'hypercapnie induit une déviation de la courbe de dissociation de l'Hb vers la droite → ↘ affinité de l'Hb pour l'O ₂ → plus d'O ₂ peut être prélevé à la périphérie (= effet Bohr) sans ↘ de la PO ₂ . - L'hyperventilation pré-apnée ↘ taux de CO ₂ → retarde le signal de remontée → risque d'hypoxie et d'inconscience avant la surface
Froid	↗ Activité du système nerveux sympathique → vasoconstriction périphérique Déplacement de la courbe de dissociation de l'Hb vers la gauche → ↗ affinité de l'Hb pour l'O ₂ → O ₂ plus difficile à prélever du sang ↘ DC max → effort plus difficile	
Emboles gazeux (Bulles)	- Descente et montée lente - Saturation en azote → risque de bulles → risque de maladie de décompression (MDD)	- Descente et montée rapide - Pas de saturation en azote sur 1 apnée → peu ou pas de bulles → peu ou pas de risque de MDD - Accumulation possible d'azote après des apnées successives mais risque de MDD faible.

TABLEAU 1 - TABLEAU GENERAL REPRENANT UNE COMPARAISON DES EFFETS DE L'IMMERSION, DE L'HYPEROXIE, DE L'HYPOXIE ET HYPERCAPNIE, DU FROID ET DES EMBOLS GAZEUX SUR LE PLONGEUR DANS LE CAS D'UNE PLONGEE SCUBA OU DE L'APNEE.

1.2. L'ENDOTHELIUM

1.2.1. SES CARACTÉRISTIQUES

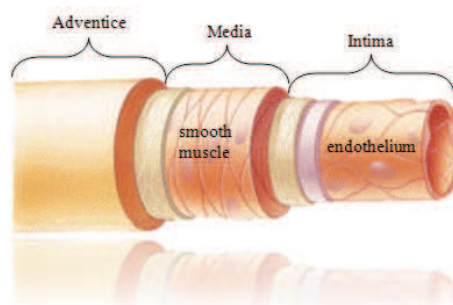


FIGURE 1 - REPRESENTATION D'UNE ARTERE. L'ENDOTHELIUM EST LA COUCHE LA PLUS INTERNE.

Image : Société FLOMEDI

L'endothélium est une simple couche continue de $1 \text{ à } 6 \times 10^{13}$ cellules formant la surface la plus interne de tous les vaisseaux du corps. Il forme une séparation entre le sang et les tissus de $1 \text{ à } 7 \text{ m}^2$ ([Cines et coll. 1998](#); [Galley et coll. 2004](#)) pesant +/- 1kg.

1.2.2. LA FONCTION ENDOTHÉLIALE

Depuis la découverte par Furchgott and Zawadzki ([Furchgott et coll. 1980](#)) de l'importance qu'a l'endothélium dans la régulation du tonus vasculaire, il est maintenant considéré comme un organe dynamique exerçant d'importantes fonctions autocrines et paracrines et comme un acteur majeur du maintien de l'homéostasie. L'endothélium vasculaire sécrète de nombreux facteurs qui régulent les interactions plaquettaires et leucocytaires, la perméabilité vasculaire, l'agrégation et la thrombogénèse. Dans les conditions physiologiques, les cellules endothéliales maintiennent également un niveau bas de stress oxydant et d'inflammation.

1.2.3. LA DYSFONCTION ENDOTHÉLIALE

Le manque de fonction endothéliale normale est appelé dysfonction endothéliale. Celle-ci a été associée à un nombre important de pathologies cardio-vasculaires ([Brunner et coll. 2005](#)) et est un prédicteur des risques cardio-vasculaires ([Schachinger et coll. 2000](#)). Beaucoup de pathologies comme l'hypertension, l'hypercholestérolémie et le diabète sont caractérisées par une dysfonction endothéliale indiquée par une vasodilatation endothélium-dépendante réduite ([Andriantsitohaina et coll. 2012](#)). L'âge

est également associé à un déclin progressif de la vasodilatation endothélium-dépendante ([Ungvari et coll. 2010](#)).

La dysfonction endothéliale est caractérisée par une réduction de la biodisponibilité du NO. Celle-ci peut être due à une production réduite de NO par l'endothelial nitric oxide synthase (eNOS), ou plus fréquemment par une plus grande inactivation de l'enzyme par le NO lui-même ou les ROS ([Vanhoutte 1989](#)). Ce stress oxydant prononcé est du en partie à une augmentation de l'expression de la NADPH oxydase, enzyme génératrice d'anions superoxydes dans la paroi artérielle([Griendling et coll. 2003](#)). Les anions superoxydes réagissent avec le NO, réduisant ainsi sa biodisponibilité et donc ses effets protecteurs du système vasculaire.

Lorsque la disponibilité du NO est significativement réduite, l'endothélium active diverses voies de compensation physiologique telles que la production d'endothelium-derived hyperpolarizing factors (EDHF) et prostacyclines ([Versari et coll. 2009](#)). L'endothélium devient alors une source de médiateurs qui attaquent la paroi vasculaire, comme l'endothéline-1 (ET-1), le Thromboxane A₂ (TXA₂), les prostaglandines et les ROS ([Taddei et coll. 2003](#)). La production d'endothelium-dependent contracting factors (EDCF) retrouvée, et dans l'âge, et dans l'hypertension, est associée à une diminution de la biodisponibilité du NO ([Versari et coll. 2009](#)).

La dysfonction endothéliale est évaluée le plus souvent par la vasomotricité endothélium-dépendante ([Corretti et coll. 2002](#)).

1.2.4. CE A QUOI IL EST SENSIBLE

L'endothélium est sensible à certains stimuli ou substances qu'il ne produit pas. Parmi les stimuli, on note l'anoxie qui entraîne une vasoconstriction. L'hypoxie diminue l'expression de l'eNOS et donc réduit la quantité de NO produit, ce qui augmente également la vasoconstriction ([Han et coll. 2013](#)). Il est sensible à des stimuli nerveux via les récepteurs membranaires. Parmi les stimuli physiques, les contraintes de cisaillement provoquent la libération de NO et entraînent une vasodilatation. L'endothélium est également sensible à des médiateurs locaux tels que la thrombine, l'adénosine di-phosphate (ADP), l'acétylcholine (ACh), la bradykinine, la sérotonine, les catécholamines et le Platelet Activating factor (PAF) qui provoquent une vasodilatation.

1.2.5. CE QU'IL PRODUIT

Les actions de l'endothélium résultent de la balance entre les différentes substances vasoactives, incluant les facteurs vasoconstricteurs (endothelium-dependent contracting factors (EDCFs) et relaxants (endothelium-dependent relaxing factors (EDRFs)). Un déséquilibre entre ces facteurs ou un défaut dans leur cascade de signalisation peut apparaître dans de nombreuses situations amenant à une dysfonction endothéliale.

1.2.5.1. ACTIONS PRO-ATHÉROGÈNES

Les actions pro-athérogènes de l'endothélium comprennent la vasoconstriction, des actions pro-inflammatoires, pro-agrégantes et pro-oxydantes. Dans des conditions pathologiques comme l'hypertension, les cellules endothéliales, en réponse à un nombre d'agents ou de stimuli physiques deviennent des sources de production d'endothelium-derived contracting factors (EDCFs), incluant l'endotheline-1 (ET-1), l'angiotensine II (AT II) les facteurs dérivés de la COX (TXA₂ et prostaglandines) et les anions superoxydes (O₂⁻) ([Viridis et coll. 2010](#)). Ces derniers ont été les premiers identifiés comme responsables de la dysfonction endothéliale.

L'ET-1 est le principal EDCF, décrite par Yanaginasawa et coll. en 1988 ([Yanagisawa et coll. 1988](#)). Son expression est augmentée par les facteurs inflammatoires, l'insuline et l'angiotensine II, et diminuée par le NO et les prostacyclines (PGI₂). Le NO et l'ET-1 ont une influence inhibitrice réciproque, c'est-à-dire que le NO est un puissant inhibiteur de la libération d'ET-1 dans l'endothélium et vice versa, ce qui les rend fonctionnellement étroitement interdépendants. La dysfonction endothéliale associée à l'âge et aux risques cardio-vasculaires est au moins en partie attribuable à un dérèglement du tonus vasculaire induit par un déséquilibre entre NO et ET-1.

La dysfonction endothéliale induite par **l'angiotensine II** inclut les réponses contractiles endothélium-dépendantes à l'ACh ([Kane et coll. 2010](#)) qui impliquent la formation COX-dépendante d'EDCF agissant sur les récepteurs du TXA₂ localisés dans les cellules du muscle vasculaire lisse ([Andriantsitohaina et coll. 2012](#))

La rénine est une enzyme qui clive l'angiotensinogène, produit principalement par le foie, en angiotensine I. Celle-ci est à son tour clivée en angiotensine II (AT II) sous l'action de l'enzyme de conversion. La fixation de l'AT II sur ses récepteurs spécifiques,

couplés à une protéine G entraîne la contraction du muscle lisse. Le principal déterminant de la quantité d'AT II produite est la concentration plasmatique de rénine produite par le rein.

Deux isoforms des récepteurs de l'AT II ont été identifiés dans les cellules du muscle vasculaire lisse : le récepteur de type 1 et de type 2 ([Kambayashi et coll. 1993](#); [Murphy et coll. 1992](#)). Le récepteur de type 2 est surexprimé dans certaines conditions pathologiques telles que l'hypertension, les lésions vasculaires ou l'inflammation ([Akishita et coll. 2000](#)). Le récepteur de type 2 de l'AT II favorise la relaxation des artères résistantes isolées et de l'aorte chez le rat ([Widdop et coll. 2003](#); [You et coll. 2005](#)) via l'activation de la cascade vasodilatatrice incluant la bradykinine, le NO et la guanosine monophosphate cyclique (cGMP), contrecarrant la contraction induite par le récepteur de type 1 ([Siragy et coll. 1996, 1997](#)). Le récepteur de type 2 de l'AT II stimule également la production de NO ([Abadir et coll. 2003](#)). Une étude récente démontra le rôle de la voie AT II receptor/Akt/NO dans la réduction de contraction vasculaire chez les rats hyperthyroïdiens ([Carrillo-Sepulveda et coll. 2013](#)).

D'autres études ([Goto et coll. 2000a, b](#); [Kansui et coll. 2002](#); [Onaka et coll. 1998](#)) montrent que les inhibiteurs du système rénine-angiotensine améliorent la détérioration de l'hyperpolarisation médiée par les endothelium-derived hyperpolarizing factors (EDHF) chez les rats hypertendus ou âgés.

Des études expérimentales ont identifié 2 principaux EDCF dérivés de la COX qui sont le **Thromboxane A2** et les **prostaglandines** ([Luscher et coll. 1992](#); [Vanhoutte 1989](#)) qui se lient à un récepteur spécifique dans les cellules du muscle lisse et entraînent une vasoconstriction. Ces facteurs vasoconstricteurs dérivés de la COX jouent un rôle important dans la dysfonction endothéliale. L'acide arachidonique, précurseur des produits dérivés de la COX est capable d'induire une contraction endothélium-dépendante dans les artères et les veines et celle-ci est inhibée par les bloqueurs de la COX ([Katusic et coll. 1988](#); [Miller et coll. 1985](#)). Les facteurs dérivés de la COX sont libérés par des stimulations de l'endothélium par l'Ach ([Konishi et coll. 1983](#)) ou par des contraintes de cisaillement (shear stress) ([Huang et coll. 2000](#)).

Dans des conditions pathologiques comme l'hypertension, l'endothélium est capable de produire des **anions superoxydes** par la NADPH-oxydase et l'eNOS lorsque celle-ci est

découplée. Ceux-ci piègent le NO, ce qui le rend moins disponible et entraîne une diminution de la vasodilatation endothéliale dépendante ([Versari et coll. 2009](#)).

1.2.5.2. ACTIONS ANTI-ATHEROGENES

Les actions anti-athérogènes de l'endothélium comprennent la vasodilatation, des actions anti-inflammatoires, anti-agrégantes et antioxydantes.

Les facteurs impliqués dans ces actions sont les EDRF. Ceux-ci comprennent principalement les endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF), la prostacycline (PGI_2) et le monoxyde d'azote (NO) ([Heylen et coll. 2008](#)).

L'importance des **EDHF** dans le contrôle local du tonus vasculaire, spécialement dans les petites artères est maintenant bien reconnu ([Shimokawa et coll. 1996](#)). Il fut démontré que l'hypertension et l'âge diminuent l'hyperpolarisation médiée par les EDHF et ainsi la relaxation du muscle lisse ([Fujii et coll. 1993](#); [Fujii et coll. 1992](#)). Les EDHF ont donc pour rôle d'hyperpolariser le muscle lisse, ce qui entraîne sa relaxation ([Edwards et coll. 2010](#)). L'implication des EDHF dans la régulation du tonus vasculaire est définie comme étant la réponse qui persiste en présence d'une inhibition combinée du monoxyde d'azote par le L-NAME et des COX par l'indométhacine. L'importance des EDHF dans la relaxation vasculaire est croissante quand la taille du vaisseau diminue ([Shimokawa et coll. 1996](#)). Leur contribution est donc prédominante dans les petites artères alors que le NO sera prédominant dans les gros vaisseaux. Néanmoins dans les grosses artères, les EDHF peuvent jouer un rôle compensatoire important dans la vasodilatation endothéliale-dépendante lorsque le NO est moins disponible. La nature chimique des EDHF n'est pas totalement claire. Cependant, les réponses médiées par les EDHF sont liées à une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire, l'ouverture des canaux à potassium et l'hyperpolarisation des cellules endothéliales. D'autres substances dérivées de l'endothélium peuvent également agir comme les EDHF. C'est le cas notamment du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), du NO lui-même et de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC).

La **prostacycline (PGI_2)** est la prostaglandine (PG) prédominante produite par les cellules endothéliales ([Mitchell et coll. 2008](#)). Sa synthèse débute par l'activation calcium-dépendante de la phospholipase A2 (PLA2) avec libération d'acide arachidonique ([Wheeler-Jones 2008](#)). Par la suite, la cyclooxygénase (COX) catalyse la

transformation de l'acide arachidonique en prostaglandine H₂ (PGH₂), qui sera métabolisée en PGI₂ via l'action enzymatique de la prostacyclin synthétase (PGIS). La cyclo-oxygenase est présente sous 2 isoformes: COX-1 and COX-2. Dans les cellules endothéliales saines, la COX-1 prédomine. Les cellules endothéliales contiennent beaucoup de COX-1 et de PGIS, c'est pourquoi quand la phospholipase A₂ est activée, la prostacyclin est le métabolite le plus produit. La PGI₂ est une prostaglandine fortement vasculoprotectrice. Son rôle de protection cardio-vasculaire est dû à sa capacité d'inhiber l'adhésion des plaquettes et lymphocytes à l'endothélium, à promouvoir la vasodilatation, limiter la prolifération et la migration des cellules du muscle lisse vasculaire et de contrecarrer la production de facteurs de croissance. La PGI₂ s'oppose aux effets vasoconstricteurs du TXA₂ métabolites de l'acide arachidonique, dotés de puissants effets vasoconstricteur et agrégant plaquettaire ([Morrison et coll. 1978](#)).

Le monoxyde d'azote (NO) fait l'objet du point suivant.

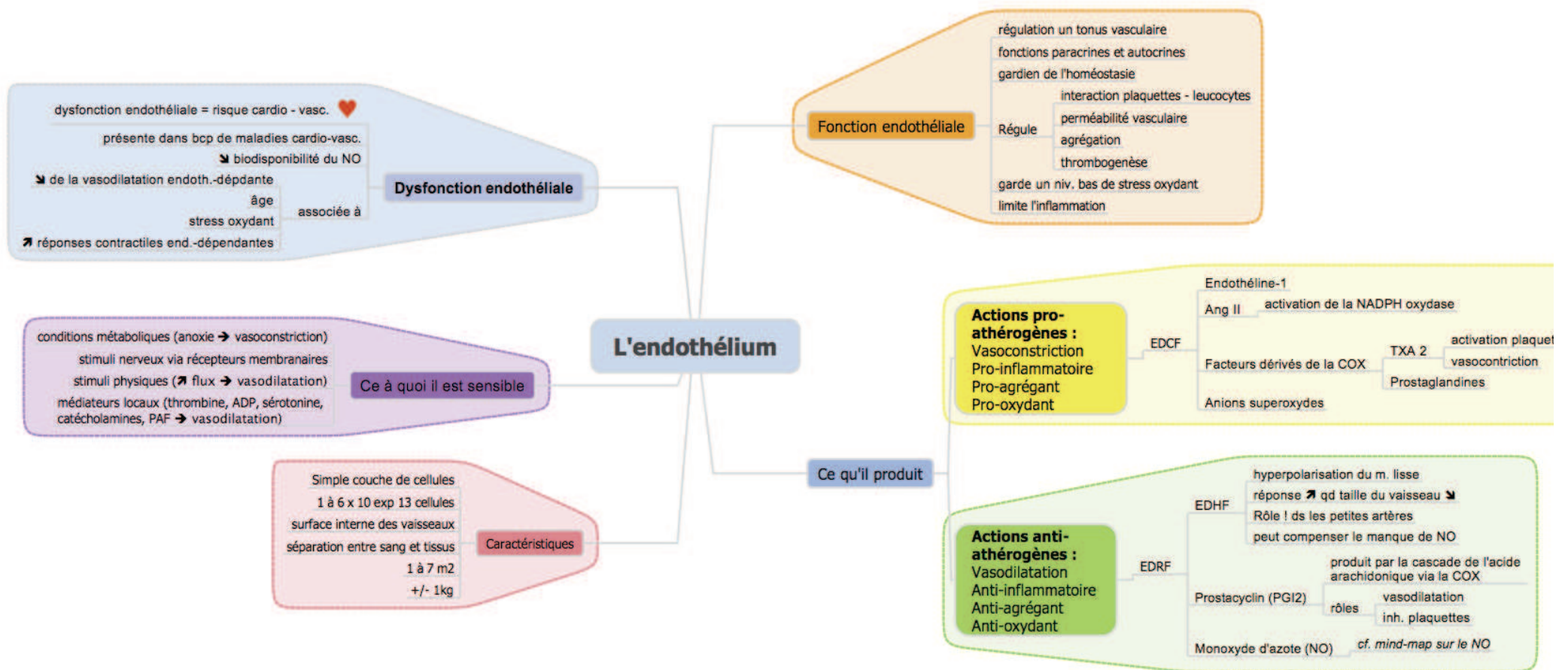


FIGURE 2 – CARTE MENTALE RESUMANT LES PRINCIPALES CARACTERISTIQUES DE L'ENDOTHELIUM, CE A QUOI IL EST SENSIBLE, CE QU'IL PRODUIT, SES ACTIONS, LA FONCTION ET DYSFONCTION ENDOTHELIALE.

1.3. LE MONOXYDE D'AZOTE

1.3.1. CARTE D'IDENTITÉ

Le monoxyde d'azote (NO) est un gaz hautement diffusible qui fut découvert en 1980 ([Walford et coll. 2003](#)). Il peut se retrouver sous 3 formes rédox : NO⁺, NO⁻ et NO radical libre ([Stamler et coll. 1992](#)). Ses effets sont dose-dépendants : peu de NO va lui donner une qualité d'antioxydant en réduisant la quantité de radicaux libres alors qu'une dose importante de NO va induire sa transformation en peroxynitrites (ONOO⁻) engendrant un stress oxydant ([Shen et coll. 1998](#)).

1.3.2. PRODUCTION DU MONOXYDE D'AZOTE

Le monoxyde d'azote résulte d'une oxydation en 5 étapes de la L-arginine en L-citrulline avec production concomitante de NO. Sa production nécessite l'action d'une nitric oxide synthétase (NOS). Les NOS sont de 3 types : inductible (iNOS), neuronale (nNOS) et endothéliale (eNOS). L'iNOS est exprimée dans une variété de tissus en réponse à des stimuli inflammatoires ([Rigamonti et coll. 2013](#)). La nNOS est principalement impliquée dans les désordres neuronaux et joue un rôle mineur dans la vascularisation. Elle fut d'ailleurs impliquée dans la réponse vasculaire à l'O₂ pendant la crise hyperoxique. Son inhibition protège contre les convulsions hyperoxiques ([Oury et coll. 1992](#)). L'eNOS, qui nous intéresse tout particulièrement dans ce travail, catalyse l'oxydation de la L-arginine en L-citrulline avec production concomitante de NO. Cette réaction nécessite l'action de co-facteurs que sont les protéines de choc thermique (HSP90), le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH), la tétrahydrobiopterine (BH₄), le flavine adénine dinucléotide (FAD) et le flavine mononucléotide (FMN) ([Bredt et coll. 1994](#)). Le domaine oxygénase de la NOS lie l'arginine, l'hème et un cofacteur : la BH₄. Le domaine réductase possède un site de liaison pour les flavines (FAD, FMN) et pour le NADPH. Ces deux domaines sont connectés par le domaine de la flavine, qui permet le transfert des électrons du NADPH au fer de l'hème. La BH₄ permet à la NOS d'être active. La liaison de l'HSP90 avec l'eNOS en réponse à l'histamine, le vascular endothelial growth factor (VEGF) ou les forces de cisaillement (shear stress) augmente l'activité de l'eNOS par la facilitation de déplacement de la calmoduline de l'eNOS ([Gratton et coll. 2000](#)).

L'expression de l'eNOS est favorisée par les forces de cisaillement (shear stress) ([Nishida et coll. 1992](#)) obtenues lorsque le débit sanguin est augmenté par exemple par

l'exercice ou lors du relâchement d'un brassard occlusif comme dans la mesure de la dilatation flux-dépendante (FMD). Son expression est par contre défavorisée par le Tumor Necrosis Factor α (TNF α) ([Nishida et coll. 1992](#)), l'érythropoïétine (EPO) ([Wang et coll. 1999](#)), l'hypoxie ([McQuillan et coll. 1994](#)) et de grandes concentrations en LDL ([Laufs et coll. 1998](#)).

L'activité de l'eNOS dépend de seconds messagers activateurs ou inhibiteurs. Parmi les activateurs, nous distinguons les substances nutritionnelles, telles que les polyphénols contenus dans le cacao, les baies, le vin rouge ou le thé vert ([Andriantsitohaina et coll. 2012](#)) des messagers physiologiques tels que la protéine kinase A (PKA), la protéine kinase B (Akt), le calcium (Ca⁺⁺) et la protéine kinase dépendante de l'AMP (AMPK). Lorsque les cellules endothéliales sont stimulées par des activateurs de seconds messagers comme le vascular endothelial growth factor (VEGF), l'insuline ou les forces de cisaillement (shear stress), l'Akt phosphoryle l'eNOS sur la sérine – 1177, ce qui augmente l'activité de l'eNOS ([Dimmeler et coll. 1999](#)) et stimule la production de NO par l'intermédiaire de mécanismes dépendants de la phosphatidylinositol-3-OH-kinase (PI3K) ([Papapetropoulos et coll. 1997](#); [Zeng et coll. 1996](#)). L'Acétylcholine produit exactement les mêmes effets que le VEGF et le PAF ([Sanchez et coll. 2006](#)). L'inhibition de l'activité de l'eNOS peut résulter de différents facteurs. Parmi ceux-ci, nous retrouvons l'hypoxie ([Han et coll. 2013](#)), le taux de NO lui-même, le froid ([Hodges et coll. 2006](#)), un déficit en substrats ou en co-facteurs provoquant un découplage de l'eNOS qui produira alors des anions superoxydes (O₂⁻) à la place du NO ([Pou et coll. 1992](#)). Les S-nitrosylations font également partie des réactions qui diminuent l'activité de l'eNOS ([Piantadosi 2012](#)). Un inhibiteur souvent utilisé dans les expériences afin d'isoler les effets indépendants de l'eNOS est le L-NAME. Enfin, l'asymmetric dimethylarginine (ADMA) est un inhibiteur naturel de l'eNOS ([Vallance et coll. 1992](#)).

1.3.3. ACTIONS DU MONOXYDE D'AZOTE

L'action principale du NO qui nous intéressera tout au long de ce travail est son effet vasodilatateur. Le NO produit par l'eNOS active la guanylate cyclase soluble (sGC), enzyme catalysant la formation de cGMP, second messenger de la relaxation vasculaire ([Pellegrin et coll. 2009](#)). Le NO peut également inhiber les canaux calcium-dépendants, diminuant ainsi la libération de Ca^{++} , ce qui diminue la vasoconstriction. Une autre action du NO qui nous intéresse est son effet antioxydant. Le NO peut en effet réduire la quantité de ROS de plusieurs manières. (1) Il peut augmenter l'activité de la superoxyde dismutase (SOD), ce qui a pour effet de transformer les anions superoxydes ($\text{O}_2^{\cdot-}$) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). (2) Il augmente l'activité de l'hème-oxygénase, ce qui réduit également le taux d' $\text{O}_2^{\cdot-}$ (3) Le NO stabilise les $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, ce qui a pour effet d'inhiber les NF κB et réduire la quantité de ROS par les leucocytes. (4) Le NO peut se lier aux $\text{O}_2^{\cdot-}$ pour former des peroxynitrites (ONOO^-).

Le NO participe également dans l'inhibition de l'adhésion, l'agrégation et le recrutement plaquettaire, l'inhibition de l'adhésion des leucocytes, il possède des propriétés anti-inflammatoires, il favorise l'angiogenèse, augmente la perméabilité des macromolécules et réduit l'oxydation des LDL.

1.3.4. INACTIVATION DU MONOXYDE D'AZOTE

La voie d'inactivation essentielle du NO est le stress oxydant. Celui-ci est un déséquilibre entre la production de ROS et RNS et la capacité de l'organisme à les neutraliser ([Kojda et coll. 1999](#)). Une des causes de stress oxydant est la production d' $\text{O}_2^{\cdot-}$. Ceci est la conséquence d'une augmentation des systèmes pro-oxydants (augmentation de l'activité de la NADPH oxydase, responsable de la production des $\text{O}_2^{\cdot-}$ ou altération de la fonction mitochondriale) et/ou d'une réduction de l'activité des systèmes antioxydants (diminution de l'activité de la SOD et de l'hème-oxygénase). L'hémoglobine (Hb) piège également le NO en le fixant à l'oxyhémoglobine.

Les caractéristiques, la production, les actions et l'inactivation du monoxyde d'azote sont représentées dans la figure 3.

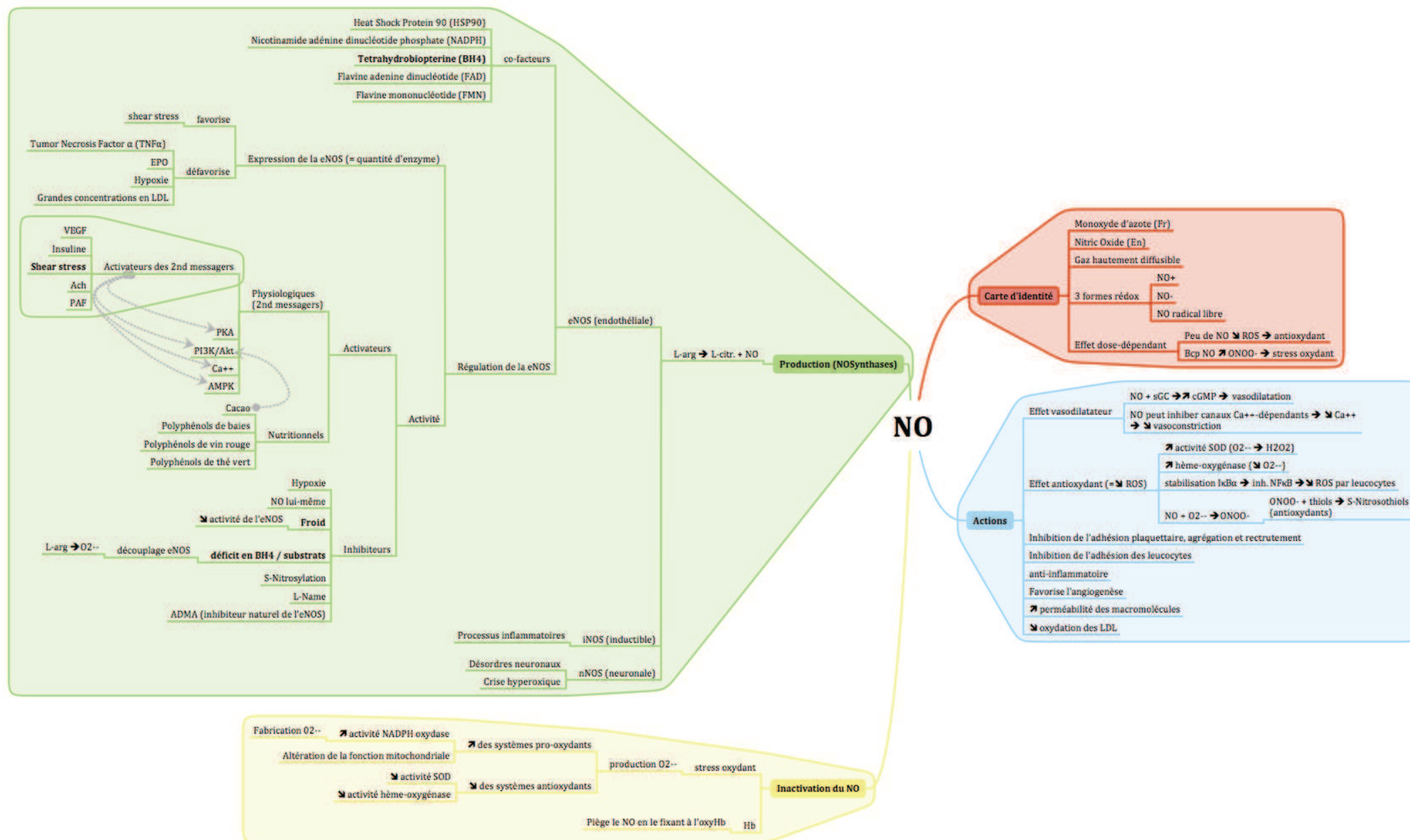


FIGURE 3 – CARTE MENTALE REPRESENTANT LA CARTE D'IDENTITE DU MONOXYDE D'AZOTE, SA PRODUCTION, SON INACTIVATION ET SES ACTIONS.

1.4. LES ANTIOXYDANTS

1.4.1. ORIGINE DES ANTIOXYDANTS

Les antioxydants sont des substances capables, à faibles concentrations, de retarder ou d'empêcher l'oxydation des substrats ([Gutteridge et coll. 2010](#)). Les antioxydants agissent en piégeant les ROS ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $OH^{\cdot}$, ...), en prévenant leur formation ou en réparant les dommages qu'ils auraient occasionnés. Nous distinguons les **antioxydants endogènes** qui élèvent nos défenses antioxydantes et autres systèmes protecteurs contre les dommages tissulaires causés par le stress oxydant des **antioxydants exogènes** apportés par la nourriture.

1.4.1.1. ANTIOXYDANTS ENDOGENES

A) SYSTEMES ANTIOXYDANTS ENZYMATIQUES

Les trois principaux antioxydants enzymatiques sont la catalase, la superoxyde dismutase et la glutathione peroxydase ([Tessier et coll. 1995](#)).

La **catalase** contenant du fer, est particulièrement concentrée dans le foie et les érythrocytes alors qu'elle se trouve en faible quantité dans les muscles squelettiques, le coeur et le cerveau ([Tessier et coll. 1995](#)). Elle neutralise les H_2O_2 , tout comme la glutathione peroxydase mais est plus efficace que cette dernière lorsque la quantité d' H_2O_2 est élevée ([Chance et coll. 1979](#)).

La **superoxyde dismutase** (SOD), découverte par McCord et Fridovich ([McCord et coll. 1969](#)) est capable de neutraliser 80% des anions superoxydes fournis par la mitochondrie, les transformant en H_2O_2 ([Nohl et coll. 1979](#)). Son activité antioxydante sur les $O_2^{\cdot-}$ produit donc d'autres radicaux libres ([Jenkins 1988](#)). La SOD se retrouve sous 3 isoformes : Les 2 premiers sont la SOD-1, Cu/Zn-dépendante et la SOD-2, Manganèse-dépendante. Toutes 2 sont présentes dans les cellules endothéliales et les cellules du muscle lisse vasculaire. La SOD-3 est Cu/Zn-dépendante ([Rush et coll. 2005](#))

La **glutathione peroxydase** (GPx) est plus compliquée. Elle fonctionne avec le sélénium comme co-facteur. Elle fait partie d'un système antioxydant composé de glutathion, de peroxydase et de réductases NADPH-dépendantes qui permettent la resynthèse du glutathion réduit (GSH). La GPx s'occupe de l'élimination des H_2O_2 dans les érythrocytes selon l'équation $H_2O_2 + 2 GSH \rightarrow 3 GSSG + 2 H_2O$ ([Burk 1991](#)).

B) SYSTEMES NON-ENZYMATIQUES

La **vitamine E** est une vitamine liposoluble antioxydante majeure, essentielle au fonctionnement des cellules ([McCay 1985](#)). Elle est présente dans toutes les membranes dont elle préserve l'intégrité en protégeant les acides gras polyinsaturés contre les attaques des ROS ([Tessier et coll. 1995](#)).

La **vitamine C** est le cofacteur de plusieurs enzymes et joue le rôle d'agent réducteur. Cette vitamine est capable de réagir directement avec les anions superoxydes, hydroxyles et l'oxygène ([Machlin et coll. 1987](#)).

Le **β -carotène** est un antioxydant à de faibles pressions partielles en oxygène mais devient pro-oxydant lorsque la PO_2 augmente ([Burton et coll. 1984](#)).

Le **co-enzyme Q10**, ou ubiquinone, peut agir comme un antioxydant liposoluble ([Beyer 1992](#)) et stimule le recyclage de la Vitamine E ([Kagan et coll. 2000](#)).

Enfin, les **minéraux** tels que le cuivre ou le fer peuvent également réagir avec les H_2O_2 pour former du $OH^\cdot$. Le zinc et le sélénium sont une partie constituante des enzymes comme la SOD ou la GPx.

Les **thiols** peuvent également jouer un rôle d'antioxydants. En effet, lorsque le NO réagit avec les $O_2^{\cdot-}$, il produit des peroxynitrites ($ONOO^-$). Ceux-ci peuvent réagir avec les thiols pour former des S-nitrosothiols ([Radi et coll. 1991a](#)). Le $ONOO^-$ est un oxydant puissant et peut participer à la modification des protéines et des lipides ([Radi et coll. 1991b](#)). Les S-nitrosothiols sont relativement stables dans les conditions physiologiques et servent de réservoir pour le NO disponible ([Stamler et coll. 1992](#)).

ANTIOXYDANTS EXOGENES

Les polyphénols sont des antioxydants que l'on trouve principalement dans les aliments et boissons dérivés des plantes (vin rouge, thé vert, cacao). Ceux-ci leur donne leur couleur et participent à la défense des plantes contre les radiations UV, les agents pathogènes et les agressions physiques ([Andriantsitohaina et coll. 2012](#)).

La famille des polyphénols est divisée en simples phénols, flavonoïdes, non-flavonoïdes, saponin, curcumin et tannins. Les flavonoïdes peuvent être eux-mêmes divisés en flavonols (catéchines et épicatechines, quercetin, myricetin et kaempferol), anthocyanidines, flavones, flavanones et chalcones. Ce sont principalement les flavonoïdes qui nous intéresseront dans ce travail.

1.4.2. LES EFFETS PROTECTEURS DES ANTIOXYDANTS

De nombreuses études vantent les effets protecteurs des antioxydants contre les cancers, les maladies cardio-vasculaires, métaboliques et neurodégénératives ([Chuang et coll. 2011](#); [Middleton et coll. 2000](#)). Les effets bénéfiques des polyphénols sur le système cardio-vasculaire ont été attribués à une amélioration des profils lipidiques, des effets anti-athérosclérotiques, anti-hypertenseurs et anti-inflammatoires ainsi qu'une action directe sur les cellules endothéliales ([Andriantsitohaina et coll. 2012](#)).

La relaxation endothélium-dépendante causée par certains vins et jus de fruits fut observée pour la 1^{ère} fois par Fitzpatrick et coll. en 1993 ([Fitzpatrick et coll. 1993](#)). D'autres études ont par la suite confirmé que des sources riches en polyphénols comme des extraits de vins rouges, de thé vert ou noir et certaines plantes provoquaient en effet une relaxation endothélium-dépendante dans les grosses artères, les artérioles et les veines. Celle-ci était par contre prévenue par la guanylyl cyclase et des inhibiteurs compétitifs l'eNOS ([Fitzpatrick et coll. 1993](#); [Schini-Kerth et coll. 2010](#)).

L'action stimulante des polyphénols sur l'eNOS suggèrent l'existence d'une voie de signalisation sensible au statut rédox intra-cellulaire ([Duarte et coll. 2004](#)). Donc la vasodilatation par les polyphénols est réduite par les analogues de la superoxyde dismutase (SOD) et augmentée par les analogues de la catalase ([Madeira et coll. 2009](#)). L'exposition aux polyphénols de cellules endothéliales en culture augmente la formation des ROS ([Ndiaye et coll. 2005](#)). Ceux-ci peuvent activer l'Akt, ce qui entraîne la phosphorylation de l'eNOS sur la Serine 1177 augmentant ainsi son activité en réponse aux polyphénols ([Anselm et coll. 2007](#); [Ndiaye et coll. 2005](#)).

Rappelons que la dysfonction endothéliale est associée à du stress oxydant prononcé, du en partie à une augmentation de l'expression de la NADPH oxydase, enzyme génératrice d'anions superoxydes. Les polyphénols exercent également des activités antioxydantes sur les cellules endothéliales non seulement en réduisant l'expression de la NADPH oxydase mais également en diminuant son activité, augmentant l'expression d'enzymes antioxydantes comme la catalase ([Steffen et coll. 2008](#)) . La dysfonction endothéliale induite par l'AT II inclut les réponses contractiles à l'Ach ([Kane et coll. 2010](#)) qui impliquent la production d'EDCF par la COX. Ceux-ci agissent sur les récepteurs de la TXA₂ localisées dans les cellules du muscle lisse vasculaire entraînant une

vasoconstriction. L'expression de la COX et la formation d'EDCF est significativement réduite par les polyphénols du vin rouge ([Kane et coll. 2010](#)). Donc, les polyphénols préviennent la dégradation du NO par les ROS et réduisent la vasoconstriction et les réponses pro-inflammatoires.

1.4.3. LE CHOCOLAT NOIR

Le chocolat noir procure un grand apport d'antioxydants et plus particulièrement de polyphénols. Il est capable de réduire l'inhibition de l'eNOS ou de l'activer ([Karim et coll. 2000](#)), augmentant ainsi la capacité antioxydante du plasma et diminuant l'oxydation plasmatique des lipides ([Wang et coll. 2000](#)). Plusieurs études ont montré qu'un apport de chocolat noir en aigu ([Kris-Etherton et coll. 2002](#); [Vlachopoulos et coll. 2005](#); [Wang et coll. 2000](#)) ou en chronique ([Engler et coll. 2004](#); [Kris-Etherton et coll. 2002](#)) réduisait la rigidité artérielle et était donc bénéfique pour le système cardiovasculaire. Il fut également démontré que l'accumulation de radicaux libres intracellulaires était atténuée par un prétraitement contenant des procyanidines de cacao ([Cho et coll. 2009](#)). Le cacao pur contient entre 12 et 18% de polyphénols. La prise de 38 à 125 g de chocolat par jour augmente significativement le diamètre de l'artère brachial ([Kris-Etherton et coll. 2002](#); [Vlachopoulos et coll. 2005](#)). L'apport d'une petite quantité de chocolat noir riche en polyphénols dans l'alimentation réduit l'hypertension artérielle et favorise la formation de NO vasodilatateur ([Taubert et coll. 2007](#)).

Le cacao du chocolat noir contient une grande quantité d'antioxydants et plus particulièrement de flavonoïdes dont le resvératrol et le quercétin ([Cherniack 2011](#)).

Tous deux réduisent le stress oxydant à leur manière. Le resvératrol augmente la synthèse de BH₄ en augmentant l'expression de la guanosine triphosphate (GTP) cyclohydrolase 1. De plus, il diminue la quantité d'anions superoxydes et de peroxynitrites diminuant dès lors l'oxydation de la BH₄ ([Xia et coll. 2010](#)). Rappelons qu'un manque de BH₄, co-facteur de l'eNOS est la cause majeure du découplage de l'eNOS la faisant basculer d'une enzyme productrice de NO à une enzyme productrice d'anions superoxydes ([Forstermann et coll. 2006](#); [Li et coll. 2009](#)).

Le resvératrol induit une vasodilatation par relâchement de NO depuis les cellules endothéliales ([Cruz et coll. 2006](#)) et/ou en améliorant la biodisponibilité du NO ([Zhang et coll. 2009](#)). Il augmente l'ARN messager (ARNm) de l'eNOS ([Nicholson et coll. 2010](#)) et

l'expression des protéines ([Appeldoorn et coll. 2009](#)) entraînant une phosphorylation rapide de l'eNOS sur la Sérine 1177 (site activateur de l'enzyme), augmentant alors son activité ([Klinge et coll. 2008](#)). En parallèle, le resveratrol augmente la biodisponibilité du NO en diminuant le stress oxydant *per se* ([Pearson et coll. 2008](#)). Ces actions combinées amènent le resvératrol à la formation de cGMP, à l'activation de la protéine kinase G et à la vasodilatation ([Murad 2006](#)).

La quercetine, quant à elle, est un puissant piègeur de l'anion superoxyde et des peroxynitrites. Elle inhibe également la production des $O_2^{\cdot -}$ en supprimant l'activité de la xanthine oxydase ([Hanasaki et coll. 1994](#)) et en inhibant le système mitochondrial NADH/NAD⁺ ([Wilms et coll. 2008](#)).

Elle est également responsable de la vasodilatation endothélium-dépendante par production de NO ([Perez-Vizcaino et coll. 2006](#); [Perez-Vizcaino et coll. 2009](#)). Celle-ci peut-être due à une augmentation de la phosphorylation de l'eNOS ([Khoo et coll. 2010](#)) et/ou à une hyperpolarisation empêchant l'entrée de Ca^{++} dans les cellules endothéliales ([Kuhlmann et coll. 2005](#)). La vasodilatation est inhibée par les inhibiteurs de l'eNOS et la charybdotoxine, montrant bien que les effets de la quercetine sont dépendants et de la voie NO/cGMP, et des EDHF ([Khoo et coll. 2010](#)).

Tout comme le resveratrol, à des doses physiologiques, la quercetine augmente l'expression de l'ARNm de l'eNOS, diminue celle de l'ARNm de l'endotheline-1 par les H_2O_2 et réduit donc son relâchement dans les cellules endothéliales ([Nicholson et coll. 2010](#)). Tous 2 inhibent également la protéine kinase C ([Romero et coll. 2009](#)).

Les polyphénols contenus dans le chocolat noir ont donc le pouvoir d'améliorer la santé vasculaire, par exemple en stimulant la formation de facteurs vasoprotecteurs comme le NO ou les EDHF, entraînant une vasodilatation. Ils améliorent également la fonction du muscle lisse vasculaire en réduisant le stress oxydant par des changements de niveau d'expression des enzymes pro et antioxydantes. La réduction du stress oxydant devrait réduire la dégradation du NO par les anions superoxydes et donc prévenir la vasoconstriction.

C'est pour cette raison que nous allons observer l'effet du chocolat noir en plongée dans les chapitres suivants.

1.5. L'ENDOTHELIUM PLONGE

Dans cette partie, nous avons questionné la banque de données PubMed en utilisant les termes suivants : « Diving and FMD », « Diving and endothelium », « SCUBA diving and oxidative stress », « breath-hold diving and oxidative stress », « SCUBA diving and antioxidants », « breath-hold diving and antioxidants » et enfin « diving and chocolate ». Aucune restriction de langue n'a été imposée. Après avoir éliminé les revues et les études se recoupant, 23 articles ont été sélectionnés afin de retracer l'évolution des recherches concernant l'endothélium, le stress oxydant et la plongée SCUBA et en apnée. Ceux-ci sont repris dans le tableau 2.

Le début de l'histoire de l'endothélium en plongée remonterait à 1999 où Marabotti et coll. ([Marabotti et coll. 1999](#)) furent les premiers à suggérer que les bulles de décompression attaquent l'endothélium pulmonaire et activent des systèmes de défense du corps. Cette hypothèse fut approfondie par l'équipe de Brubakk en 2005 ([Brubakk et coll. 2005](#)) qui trouva une dysfonction endothéliale par mesure de la dilatation flux-dépendante (FMD) après une plongée à l'air. Plus tard, Madden et coll. émettent l'hypothèse que la dysfonction endothéliale pourrait être due à des dommages mécaniques de l'endothélium ([Madden et coll. 2010](#)). Celle-ci fut donc considérée comme un facteur de risque pour l'accident de décompression. Afin de diminuer les processus inflammatoires associés à cette attaque mécanique, Blatteau et coll. observèrent que l'administration de fluoxétine à des souris diminuait l'incidence des maladies de décompression ([Blatteau et coll. 2012](#)).

Les recherches se sont alors tournées vers toute une série de pré-conditionnements pouvant réduire la quantité de bulles et la dysfonction endothéliale post-plongée. Parmi ceux-ci, une supplémentation aigüe ([Obad et coll. 2007a](#)) ou chronique ([Obad et coll. 2007b](#)) en antioxydants, 30 minutes de sauna ([Blatteau et coll. 2008](#)) ou de vibrations ([Germonpre et coll. 2009](#)) ou un entraînement physique couplé à des plongées successives ([Pontier et coll. 2009](#)). La dysfonction endothéliale post-plongée est atténuée par les antioxydants ([Obad et coll. 2007a](#); [Obad et coll. 2007b](#)). Le sauna réduit les bulles et augmente la FMD. Les vibrations et l'entraînement physique couplé à des plongées répétées n'ont pas d'effet sur la fonction endothéliale mais réduisent les bulles. La FMD étant NO-dépendante, les chercheurs se sont alors tournés vers le monoxyde d'azote. Puisque l'eNOS a besoin de BH₄ pour fonctionner, Glavas et coll. ont donné aux

plongeurs une supplémentation en vitamine C. et BH₄ mais cela n'a pas eu d'effet sur la fonction cardio-vasculaire ([Glavas et coll. 2009](#)). Récemment, Blatteau et coll. ont administré à des rats du sidénafile (Viagra) qui agit sur la signalisation du NO et ont observé que celui-ci n'avait pas d'effet sur les bulles, il diminuait le nombre de plaquettes sanguines mais augmentait le nombre d'accidents de décompression ([Blatteau et coll. 2013](#)).

L'hyperoxie associée à la plongée augmente la rigidité artérielle, diminue les résistances périphériques ([Marinovic et coll. 2012](#)), entraîne du stress oxydant et celui-ci stimule l'activité pro- et antioxydante ([Ferrer et coll. 2007](#); [Morabito et coll. 2011](#); [Sureda et coll. 2009](#)) qui restent altérées jusqu'à 3 jours après la plongée ([Obad et coll. 2007a](#)) et au cours de plongées répétitives ([Obad et coll. 2010](#)). La présence de stress oxydant avait déjà été observée par Joulia et coll. sur les plongeurs en apnée ([Joulia et coll. 2002](#)). En réalité, il était étudié chez les animaux marins depuis 1996 ([Storey 1996](#)). Les chercheurs émettaient déjà l'hypothèse que du stress oxydant était également présent en apnée.

Dans ce travail, le but est de voir l'effet du chocolat noir sur le stress oxydant et la fonction endothéliale après une plongée SCUBA et en apnée. Avec les termes « Diving and chocolate », nous remarquons qu'aucune étude n'apparaît dans PubMed. A nous donc de vous conter son histoire...

TABLEAU 2 : LISTE DES ARTICLES SELECTIONNES A PARTIR DE LA BANQUE DE DONNEES PUBMED RETRAÇANT L'EVOLUTION DES RECHERCHES CONCERNANT L'ENDOTHELIUM, LE STRESS OXYDANT ET LA PLONGEE SCUBA ET EN APNEE.

La recherche PubMed a été effectuée sur base des termes suivants : « Diving and FMD », « Diving and endothelium », « SCUBA diving and oxidative stress », « breath-hold diving and oxidative stress », « SCUBA diving and antioxidants », « breath-hold diving and antioxidants » et « diving and chocolate ».

<u>Nom du 1er auteur</u>	<u>Année</u>	<u>N</u>	<u>Sujets</u>	<u>Type de plongée</u>	<u>Gaz utilisé</u>	<u>Intervention</u>	<u>Conclusions</u>
Marabotti [1]	1999	20	Plongeurs SCUBA	1 plongée - 30m / 30 min	air	/	Les bulles "silencieuses" peuvent attaquer l'endothélium pulmonaire et activer les systèmes réactifs du corps
Joulia [2]	2002	18	Apnéistes élités 7-10 ans d'expérience versus novices	3 protocoles pour des apnéistes entraînés vs novices: 1) apnées statiques 2) 2x1min d'exercices dynamiques avec les av.-bras 3) apnées dynamiques	air	/	Les sujets entraînés en apnée ont la capacité de réduire l'acidose et le stress oxydant post-apnée et post-exercice, à l'image des animaux marins
Brubakk [3]	2005	21	Plongeurs	Chambre hyperbare - 280kPa - 80 min versus Nitrox 60 normoxique - 80 min	air vs Nx 60	/	La plongée à l'air peut amener une dysfonction endothéliale aiguë
Rousseau [4]	2006	20	sujets masculins	Plongées dynamiques à 1,80m de profondeur à 90% de la distance max. du sujet en apnée dynamique versus un groupe contrôle assis hors de l'eau	Apnée vs air	/	La glutathione-peroxydase plasmatique et la GSH pourraient être utilisés comme biomarqueurs pour évaluer le stress oxydant pendant l'hypoxie en apnée
Ferrer [5]	2007	7	Plongeurs SCUBA	Plongée SCUBA 40m / 25 min vs HBO 100% O ₂ à 2,2 ATA / 60 min en chambre hyperbare	air vs 100% O ₂	/	L'hyperoxie associée à la plongée SCUBA entraîne du stress oxydant qui stimule la production de H ₂ O ₂ , de NO et les adaptations des enzymes antioxydantes
Obad [6]	2007a	7	Plongeurs SCUBA	Mer - 30m / 30 min au fond	air	Vitamine C et E 2h avant plongée	La dysfonction endothéliale est atténuée par les antioxydants. Les changements cardio-vasculaires, eux, restent encore altérés jusqu'à 3 jours après la plongée
Obad [7]	2007b	8	Plongeurs SCUBA professionnels	Mer - 1 plongée 30m	air	Vitamine C et E pendant 4 semaines	Un pré-traitement à long terme d'une faible dose d'antioxydants s'arrêtant 3-4h avant la plongée réduit la dysfonction endothéliale post-plongée
Blatteau [8]	2008	16	Plongeurs	Chambre hyperbare - 30m / 25 min Plongée contrôle et plongée test séparées de 5 jours	air	30 min de sauna à 65°C finissant 1h avant plongée	Le sauna augmente la FMD. Le sauna 1h pré-plongée diminue les bulles. Cet effet protecteur peut être dû à la déshydratation, aux HSP et/ou à la voie du NO
Germonpré [9]	2009	14	Plongeurs SCUBA	30m / 30 min Plongée contrôle et plongée test séparées d'une semaine	air	30 minutes de vibrations 1h avant la plongée	Les vibrations diminuent les bulles mais n'ont pas d'effet sur la FMD. Les mécanismes associés au NO ne sont pas impliqués dans la diminution des bulles
Vince [10]	2009	6	Sujets sans expérience en plongée	2 plongées à 2,8 ATA / 78 min en chambre hyperbare une à l'air et l'autre à 100% O ₂ une semaine plus tard	air vs 100% O ₂	/	Le stress oxydant est corrélé aux VCAM-1 ⁺ + Microparticules donc ces dernières peuvent être un biomarqueur potentiel de maladie de décompression
Glavas [11]	2009	8	Plongeurs SCUBA	Mer - 30m / 30 min au fond 3 plongées séparées de 3 jours	air	1) Placebo 2) Vit. C 2h pré plongée 3) Vit. C + BH4 2h pré plongée	Supplémentation en vit. C et BH ₄ n'a pas d'effet sur la fonction cardio-pulmonaire
Pontier [12]	2009	22	Plongeurs SCUBA	Chambre hyperbare - 30m / 30 min	air	Entraînement physique + plongées répétées pendant 90 jours avant la plongée test	Les plongées répétées et l'entraînement physique réduisent le nombre de bulles Pas de changement au niveau de la fonction endothéliale
Xu [13]	2009	/	Cellules cérébrales endothéliales microvasc. de rats	5 ATA pendant 10, 20, 30, 60 et 120 minutes	air	/	L'HBO induit une augmentation de l'expression de l'eNOS dans les cellules cérébrales microvasculaires mais son effet dans la vasodilatation est limité
Sureda [14]	2009	7	Plongeurs SCUBA	40m / 25 min	air	/	La plongée SCUBA induit une réponse antioxydante dans le plasma et les érythrocytes ainsi qu'une production de NO associée à son rôle vasodilatateur
Madden [15]	2010	5	Volontaires sains	Chambre hyperbare - 1 plongée à l'air et une plongée avec 100% O ₂ à 283kPa (18m) / 60 min au fond. Les 2 plongées étaient séparées d'une semaine	air vs 100% O ₂	/	La décompression à l'air cause probablement des dommages mécaniques à l'endothélium résultant en une dysfonction endothéliale et des microparticules

<u>Nom du 1er auteur</u>	<u>Année</u>	<u>N</u>	<u>Sujets</u>	<u>Type de plongée</u>	<u>Gaz utilisé</u>	<u>Intervention</u>	<u>Conclusions</u>
Obad [16]	2010	7	Plongeurs SCUBA	6 plongées en 6 jours consécutifs - 55 à 80m	Trimix	/	La fonction endothéliale et l'activité pro- et antioxydante restent altérées au cours des plongées répétitives indiquant de possibles effets cumulatifs
Morabito [17]	2011	6	Plongeurs SCUBA	30m / 20 min 4 plongées séparées de 2 semaines	air	Pré-oxygénation : 1) air 20 min 2) 100% O2 au niv. mer 3) 100% O2 à 6m 4) 100% O2 à 12m	Une pré-oxygénation, surtout à 12m peut augmenter l'activité antioxydante des lymphocytes et réduire le taux de radicaux libres
Vázquez-Medina [18]	2011	6	Eléphants de mer âgés de 11 semaines	Apnées au repos et volontaires sous l'eau. Prise de sang à 1, 3, 7 et 9 minutes pendant et 1, 3 et 5 minutes après l'apnée	air	/	Les apnées volontaires des éléphants de mer stimulent les réponses adaptatives à l'hypoxie et au stress oxydant pour faire face à leurs effets négatifs
Garbella [19]	2011	6	Apnéistes élités	10m / 25 min temps total d'apnée	Apnée (air)	/	La diminution de la capacité pulmonaire de diffusion du CO et du NO reflète un stress alvéolo-capillaire (oedème interstitiel)
Marinovic [20]	2012	10	Plongeurs SCUBA	2x3 jours - 2 semaines entre les séries - 18m - 47 min	Nx 36 vs air	/	La plongée au Nitox et à l'air augmentent la rigidité artérielle (plus le Nitrox que l'air) mais diminuent les résistances périphériques. La FMD ne suit pas le NO
Blatteau [21]	2012	91	Souris	Caisson hyperbare - 90m / 45 min - remontée rapide	air	Fluoxetine (anti-dépresseur & anti-inflammatoire) 18h avant plongée vs pas de traitement	La fluoxétine diminue l'incidence des maladies de décompression et augmente la récupération motrice par limitation des processus inflammatoires
Sureda [22]	2012	9	Plongeurs SCUBA	50m / 35 min temps total	air	/	La plongée profonde augmente les systèmes antioxydants contre le stress ox. La diminution d'ET-1 et le NO produit contribuent à la vasodilatation
Fismen [23]	2012	/	Cellules endothéliales humaines	Stress thermique + plongée simulée à 20 et 40kPa d'oxygène	air	/	Le stress thermique diminue l'activité de la NOS. L'hyperoxie toute seule ou associée à une plongée à 20 ou 40kPa n'affecte pas l'activité de la NOS

- Marabotti C, Chiesa F, Scalzini A, Antonelli F, Lari R, Franchini C, et al. Cardiac and humoral changes induced by recreational scuba diving. *Undersea Hyperb Med.* Fall 1999;26(3):151-158.
- Joulia F, Steinberg JG, Wolff F, Gavarry O, Jammes Y. Reduced oxidative stress and blood lactic acidosis in trained breath-hold human divers. *Respir Physiol Neurobiol.* Oct 23 2002;133(1-2):121-130.
- Brubakk AO, Duplancic D, Valic Z, Palada I, Obad A, Bakovic D, et al. A single air dive reduces arterial endothelial function in man. *J Physiol.* Aug 1 2005;566(Pt 3):901-906.
- Rousseau AS, Richer C, Richard MJ, Favier A, Margaritis I. Plasma glutathione peroxidase activity as a potential indicator of hypoxic stress in breath-hold diving. *Aviat Space Environ Med.* May 2006;77(5):551-555.
- Ferrer MD, Sureda A, Batle JM, Tauler P, Tur JA, Pons A. Scuba diving enhances endogenous antioxidant defenses in lymphocytes and neutrophils. *Free Radic Res.* Mar 2007;41(3):274-281.
- Obad A, Palada I, Valic Z, Ivancev V, Bakovic D, Wisloff U, et al. The effects of acute oral antioxidants on diving-induced alterations in human cardiovascular function. *J Physiol.* Feb 1 2007;578(Pt 3):859-870.
- Obad A, Valic Z, Palada I, Brubakk AO, Modun D, Dujic Z. Antioxidant pretreatment and reduced arterial endothelial dysfunction after diving. *Aviat Space Environ Med.* Dec 2007;78(12):1114-1120.
- Blatteau JE, Gempp E, Balestra C, Mets T, Germonpre P. Pre-dive sauna and venous gas bubbles upon decompression from 400 kPa. *Aviat Space Environ Med.* Dec 2008;79(12):1100-1105.
- Germonpre P, Pontier JM, Gempp E, Blatteau JE, Deneweth S, Lafere P, et al. Pre-dive vibration effect on bubble formation after a 30-m dive requiring a decompression stop. *Aviat Space Environ Med.* Dec 2009;80(12):1044-1048.
- Vince RV, McNaughton LR, Taylor L, Midgley AW, Laden G, Madden LA. Release of VCAM-1 associated endothelial microparticles following simulated SCUBA dives. *Eur J Appl Physiol.* Mar 2009;105(4):507-513.
- Glavas D, Bakovic D, Obad A, Palada I, Breskovic T, Valic Z, et al. Effects of tetrahydrobiopterin on venous bubble grade and acute diving-induced changes in cardiovascular function. *Clin Physiol Funct Imaging.* Apr 2009;29(2):100-107.
- Pontier JM, Guerrero F, Castagna O. Bubble formation and endothelial function before and after 3 months of dive training. *Aviat Space Environ Med.* Jan 2009;80(1):15-19.
- Xu X, Wang Z, Li Q et al. Endothelial nitric oxide synthase expression is progressively increased in primary cerebral microvascular endothelial cells during hyperbaric oxygen exposure. *Oxid Med Cell Longev.* Jan-Mar 2009;2(1):7-13.
- Vazquez-Medina JP, Zenteno-Savin T, Tift MS, Forman HJ, Crocker DE, Ortiz RM. Apnea stimulates the adaptive response to oxidative stress in elephant seal pups. *J Exp Biol.* Dec 15 2011;214(Pt 24):4193-4200.
- Madden LA, Christmas BC, Mellor D, Vince RV, Midgley AW, McNaughton LR, et al. Endothelial function and stress response after simulated dives to 18 msw breathing air or oxygen. *Aviat Space Environ Med.* Jan 2010;81(1):41-45.
- Obad A, Marinovic J, Ljubkovic M, Breskovic T, Modun D, Boban M, et al. Successive deep dives impair endothelial function and enhance oxidative stress in man. *Clinical physiology and functional imaging.* Nov 2010;30(6):432-438.
- Morabito C, Bosco G, Pilla R et al. Effect of pre-breathing oxygen at different depth on oxidative status and calcium concentration in lymphocytes of scuba divers. *Acta Physiol (Oxf).* May 2011;202(1):69-78.
- Vazquez-Medina JP, Zenteno-Savin T, Tift MS, Forman HJ, Crocker DE, Ortiz RM. Apnea stimulates the adaptive response to oxidative stress in elephant seal pups. *J Exp Biol.* Dec 15 2011;214(Pt 24):4193-4200.
- Garbella E, Piarulli A, Fornai E, Pingitore A, Prediletto R. Preliminary observations on the effect of hypoxic and hyperbaric stress on pulmonary gas exchange in breath-hold divers. *Diving Hyperb Med.* Jun 2011;41(2):97-100.
- Marinovic J, Ljubkovic M, Breskovic T, Gunjaca G, Obad A, Modun D, et al. Effects of successive air and nitrox dives on human vascular function. *Eur J Appl Physiol.* Jun 2012;112(6):2131-2137.
- Blatteau JE, Barre S, Pascual A, Castagna O, Abraini JH, Risso JJ, et al. Protective effects of fluoxetine on decompression sickness in mice. *PLoS One.* 2012;7(11):e49069.
- Sureda A, Batle JM, Ferrer MD, Mestre-Alfaro A, Tur JA, Pons A. Scuba diving activates vascular antioxidant system. *Int J Sports Med.* Jul 2012;33(7):531-536.
- Fismen L, Hjelde A et al. Differential effects on nitric oxide synthase, heat shock proteins and glutathione in human endothelial cells exposed to heat stress and simulated diving. *Eur J Appl Physiol.* Jul 2012;112(7):2717-2725.

1.6. OBJECTIFS DE LA THESE

Malgré plusieurs années de recherche, la cause des maladies de décompression reste nébuleuse. Les noyaux gazeux d'azote ont été pointés du doigt comme facteur de risques mais certains accidents de décompression se déclarent sans présence de bulles. Inversement, un nombre non restreint de plongeurs présentent des bulles circulantes à l'échographie cardiaque après la plongée sans pour autant développer de symptômes d'accident de décompression. En 2003, Brubakk et son équipe publiait un article présentant une augmentation des accidents de décompression concomitante à une augmentation de bulles chez les rats après administration de L-NAME, inhibiteur de l'eNOS ([Wisloff et coll. 2003](#)). En 2005, ces mêmes auteurs observent une réduction de la dilatation flux-dépendante (FMD) après une plongée à l'air qui fut interprétée comme une dysfonction endothéliale ([Brubakk et coll. 2005](#)). Cette dysfonction pourrait s'ajouter à la liste des facteurs de risque d'accidents de décompression. Une des explications avancées pour la dysfonction endothéliale était la présence de bulles. Néanmoins, ici aussi, elle a l'air de se systématiser chez les plongeurs SCUBA sans pour autant corrélér avec le développement de symptômes d'accident de décompression. Toutefois, une dysfonction endothéliale est un facteur de risque des maladies cardiovasculaires.

Depuis quelques années, la plongée est également associée à du stress oxydant. Ce dernier pouvant avoir une action au niveau vasculaire. Le but de ce travail est donc dans un premier temps d'observer si la dysfonction endothéliale est présente chez les plongeurs SCUBA et en apnée, si elle est liée ou non au stress oxydant et enfin de trouver un moyen de prévention, autant chez les plongeurs SCUBA que chez les apnéistes par une supplémentation en chocolat noir avant la plongée.

Chapitre 2 - MATERIELS ET OUTILS METHODOLOGIQUES

2.1. EXPLORATION DE LA FONCTION ENDOTHELIALE

2.1.1. LA DILATATION FLUX-DÉPENDANTE

Dans les années 1990 naquit la technique de vasodilatation flux dépendante de l'endothélium (FMD) grâce à l'imagerie par ultrasons à haute fréquence de l'artère brachiale. Cette technique provoque la libération de monoxyde d'azote (NO), résultant une vasodilatation qui peut être quantifiée comme un index de la fonction vasomotrice.

La fonction endothéliale artérielle a été évaluée par la mesure de la Flow-Mediated Dilation ([Raitakari et coll. 2000b](#)) selon un protocole standardisé ([Corretti et coll. 2002](#)). Pour ce faire, une sonde de 5-10 mhz a été utilisée (Mindray DP 6600, Mindray, China). Le diamètre de l'artère brachiale a été mesurée sur base des images longitudinales avec la jonction lumen-intima visible sur les bords antérieur et postérieur du vaisseau. Les limites pour la mesure du diamètre ont été déterminées automatiquement grâce à un programme d'analyse de la FMD (FMD-I software, FLOMEDI, Belgium), et contrôlées visuellement par un expérimentateur.

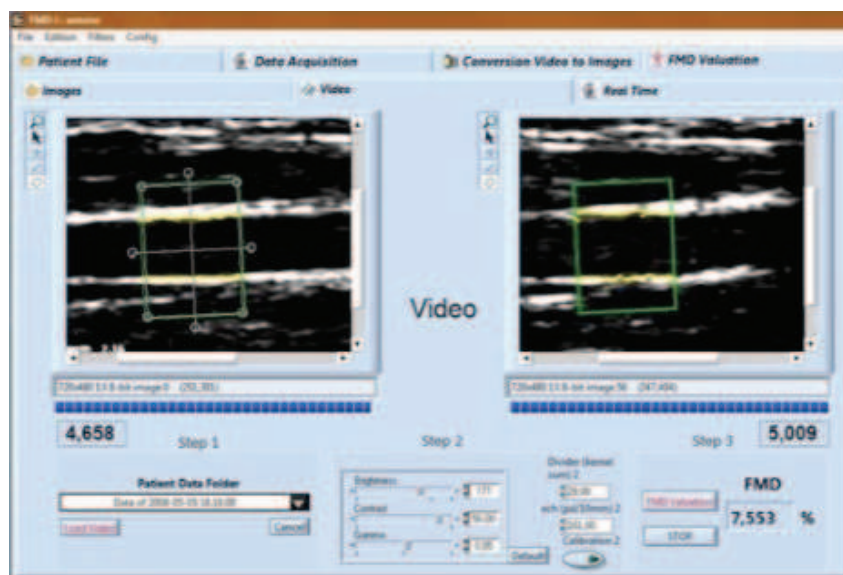


FIGURE 4 - PROGRAMME D'ANALYSE DE LA DILATATION FLUX-DEPENDANTE (FMD) PAR LA MESURE DES DIAMETRES DE L'ARTERE BRACHIALE AVANT ET APRES 5 MINUTES D'OCCUSION (FMD-I SOFTWARE, FLOMEDI, BELGIUM).

La FMD correspond au pourcentage du diamètre post occlusion divisé par le diamètre pré-occlusion multiplié par 100.

Une fois les diamètres basaux obtenus, un sphgmomanomètre fut placé au-dessus de la sonde et gonflé à 50 mmHg au-dessus de la pression systolique et maintenu gonflé pendant 5 minutes. La levée de l'occlusion de 5 minutes provoque une dilatation transitoire de l'artère attribuable majoritairement à la synthèse de monoxyde d'azote (NO) ([Lieberman et coll. 1996](#)). Après ischémie, le manchon fut rapidement dégonflé et l'artère brachiale monitorée pendant les 4 minutes suivantes. Un investigateur expérimenté analysa toutes les données. La FMD fut calculée comme étant le pourcentage de variation entre le diamètre de l'artère brachiale avant et après les 5 minutes d'occlusion, au pic de dilatation.

2.1.2. L'HYPERHÉMIE POST-OCCLUSIVE

La dilatation relative des petites artères a été mesurée par hyperhémie réactive post-occlusive (PORH). Cette technique s'est récemment montrée efficace pour la mesure des vaisseaux périphériques ([Kuznetsova et coll. 2011](#)). La photopléthysmographie est une mesure fonctionnant à l'aide d'une lampe infra-rouge de 940nm de longueur d'onde illuminant la peau et mesurant dès lors la quantité de lumière réfléchie à l'arrière d'une photodiode qui la convertit en signal électrique. Les changements d'absorption mesurés reflètent la longueur du trajet que la lumière doit parcourir dans le sang et donc le degré de dilatation de l'artère.

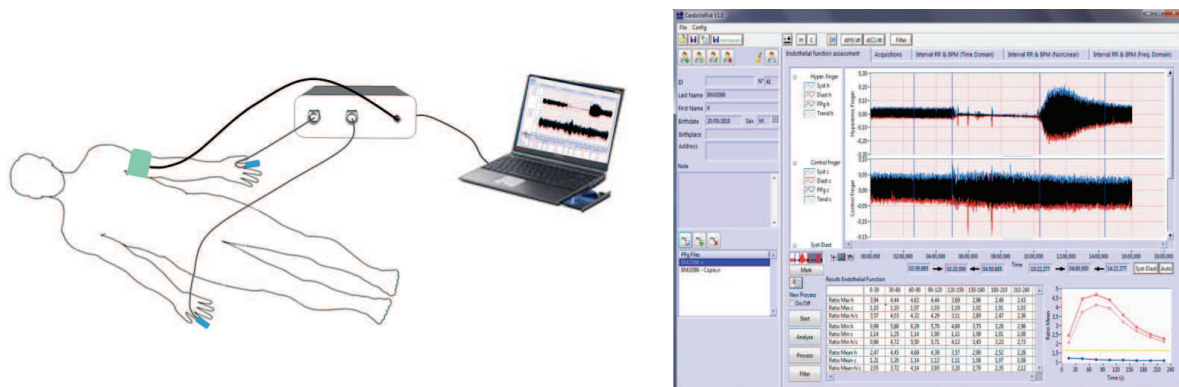


FIGURE 5 – REPRESENTATION DE LA MESURE DE L'HYPERHEMIE REACTIVE POST-OCCLUSIVE (PORH) MESUREE PAR PHOTOPLETHYSMOGRAPHIE AU BOUT DU DOIGT.

Image de gauche : mise en place du brassard occlusif et des 2 capteurs infrarouges. Image de droite : programme d'analyse de la PORH. Images : Société FLOMEDI

Pour ce faire, une sonde pléthysmographique (Cardiovarisc, FLOMEDI company, Bruxelles) fut placée sur l'index de chaque main afin d'enregistrer l'amplitude des 2

doigts pendant toute la durée de la FMD. Dans le bras qui subit l'hyperhémie, l'amplitude de base était mesurée. Le débit sanguin fut arrêté durant l'occlusion grâce au brassard occlusif et restauré après le dégonflement (période hyperémique). Dans le doigt contralatéral, le flux était régulier, amenant des changements minimes. L'amplitude de la réponse fut calculée en divisant l'amplitude maximale post-occlusive de l'onde de pouls par sa valeur de base (avant l'occlusion). Dans le but de minimiser les interférences environnementales, les variations mesurées dans le doigt hyperémique furent normalisées en les divisant par les valeurs obtenues dans le doigt non-hyperémique, comme décrit dans Kuznetsova et coll. ([Kuznetsova et coll. 2011](#)).

2.1.3. LA RIGIDITÉ ARTÉRIELLE

La rigidité artérielle des grosses artères fut estimée à partir de l'onde de pouls obtenue au doigt grâce à un capteur infra-rouge (photopléthysmographe – Pulse Trace PCA 2 – Micro Medical, UK). Cette méthode est extrêmement facile à utiliser, est non-invasive et non-expérimentateur dépendante ([Allen 2007](#)). La vitesse avec laquelle l'onde de pouls voyage le long du réseau artériel est directement reliée à la rigidité artérielle.

La forme de l'onde de pouls dépend du tonus vasculaire du réseau artériel dans son ensemble. Son contour présente 2 pics. Le premier est formé par la pression transmise le long du trajet direct depuis le ventricule gauche vers le doigt. Le second pic est formé en partie par la pression transmise le long de l'artère aorte et des grosses artères ([Millasseau et coll. 2002](#)). Le temps entre les 2 pics (peak-to-peak time – PPT), est le temps que l'onde de pouls prend pour se propager le long de l'aorte et des grosses artères vers le site principal de réflexion dans la partie inférieure du corps et à l'arrière de la racine de l'artère sous-clavière. Le volume de l'onde de pouls dans le doigt est donc directement relié au temps nécessaire à celle-ci pour traverser le réseau artériel. Ce PPT est proportionnel à la taille du sujet, donc l'index de rigidité artérielle (Stiffness index – SI) est calculée par Taille/PPT où la Taille correspond à la taille du sujet exprimée en mètres et où le PPT est le temps entre les 2 pics de l'onde de pouls, exprimé en secondes. La rigidité des grosses artères diminue le temps pris par l'onde de pouls reflétée dans la circulation périphérique pour revenir à l'aorte. Les ondes de réflexion arrivent plus tôt dans le cycle cardiaque et peuvent en partie expliquer les changements de forme de l'onde de pouls ([Nicholas et coll. 1990](#)).

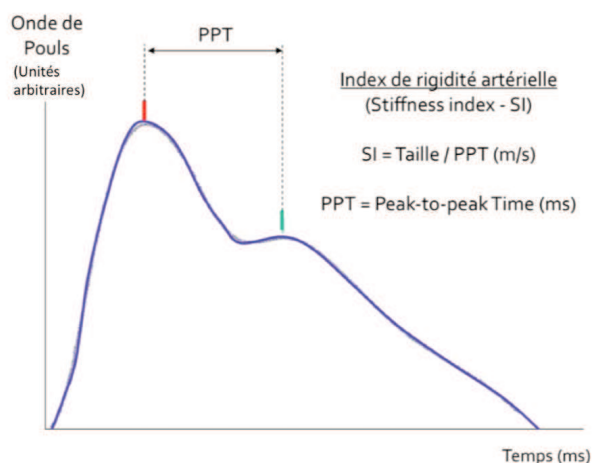


FIGURE 6 – SCHEMA DE L'ONDE DE POULS OBTENUE PAR PHOTOPLETHYSMOGRAPHIE DIGITALE.

L'index de rigidité artérielle est calculé en divisant la taille du sujet par le temps entre les 2 pics (PPT) de l'onde de pouls.

2.2. PARAMETRES HEMATOLOGIQUES

2.2.1. LE MONOXYDE D'AZOTE

Tous les échantillons sanguins ont été obtenus avant et après les différentes plongées de manière à observer les changements relatifs. Les prélèvements ont été collectés dans un tube EDTA, puis centrifugés à 1400g ($1400 \times 9,81\text{m/s}^2$) pendant 10 minutes à 4°C et conservés à - 80°C. Toutes les analyses ont été faites dans les 6 mois suivant les expérimentations.

Les taux de nitrites et nitrates plasmatiques, métabolites du monoxyde d'azote (NO), ont été déterminés par kits colorimétriques. (Fluka, Industriestrasse 25CH-9471 Buchs, Suisse ou Cayman, Ann Arbor, MI, USA) en suivant les protocoles établis par les fournisseurs.

Pour plus de facilité de lecture, nous parlerons tout au long de ce travail des taux de NO plutôt que des taux plasmatiques en nitrites et nitrates.

2.2.2. LES PEROXYNITRITES

Les peroxynitrites ont été mesurés grâce au kit ELISA OxiSelect™ Nitrotyrosine. La protéine nitrotyrosine contenue dans l'échantillon plasmatique a été déterminée en comparant sa concentration à une courbe standard préparée à partir de BSA standards

nitratés prédéterminés, comme décrit par le protocole du kit.

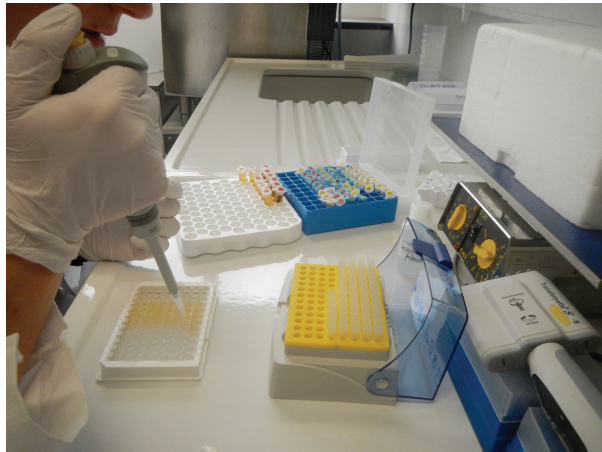


FIGURE 7 – ANALYSE DES ECHANTILLONS SANGUINS PAR COLORIMETRIE

2.2.3. LES GROUPEMENTS THIOLS

Les thiols sont des antioxydants extrêmement puissants, capables de protéger les lipides, protéines et acides nucléiques cellulaires contre des attaques peroxydatives grâce à leur grande capacité de réduction et leur habileté à réagir avec les radicaux libres ([Wlodek 2002](#)). La mesure de concentration des thiols dans le plasma a été effectuée selon le protocole de microanalyse de Ellman ([Ellman et coll. 1979](#)).

2.3. VALIDITE ET LIMITES METHODOLOGIQUES

La dilatation flux-dépendante (FMD) représente un outil important pour augmenter la compréhension des mécanismes physiologiques qui altèrent la fonction endothéliale et vasculaire ([Thijssen et coll. 2011](#)). Plusieurs vasodilatateurs sont relâchés par l'endothélium en réponse à des forces de cisaillement (shear stress), incluant le monoxyde d'azote (NO), les prostaglandines (PGI₂) et les facteurs hyperpolarisant dérivés de l'endothélium (EDHF) ([Busse et coll. 2002](#); [Joannides et coll. 1995](#)). Le NO intéresse beaucoup les chercheurs car sa réduction de biodisponibilité peut jouer un rôle dans la pathogenèse des maladies cardio-vasculaires ([Cooke et coll. 1997](#)). Leur but est donc de provoquer une contrainte de cisaillement qui produit une réponse NO-dépendante afin d'utiliser la FMD pour mesurer sa disponibilité. Celle-ci est la combinaison de la production du NO par l'endothélium et de sa destruction par les ROS. La FMD est une technique non-invasive qui permet donc des mesures répétées dans le temps afin d'étudier l'efficacité de différentes interventions susceptibles d'affecter la

santé vasculaire. Cependant, malgré son utilisation répandue, cette technique possède certaines limites techniques et d'interprétation. C'est pour ces raisons que des lignes de conduite précises ont été établies pour la standardiser au maximum et augmenter sa validité et sa reproductibilité ([Corretti et coll. 2002](#); [Harris et coll. 2010](#)).

Des changements mineurs dans la méthodologie peuvent influencer l'ampleur de la réponse de la FMD ([Doshi et coll. 2001](#); [Mullen et coll. 2001](#)).

Parmi ceux-ci, le temps de l'ischémie et le placement du brassard occlusif ont été fort discutés ([Berry et coll. 2000](#); [Betik et coll. 2004](#); [Doshi et coll. 2001](#); [Mullen et coll. 2001](#)).

Le temps d'occlusion a été examiné par plusieurs auteurs ([Corretti et coll. 1995](#); [Mullen et coll. 2001](#)). La réponse post-occlusive de changement de diamètre de l'artère brachiale augmente quand la durée de l'occlusion s'incrémente de 30 secondes à 5 minutes. Après 10 minutes, le changement de diamètre est le même qu'après 5 minutes. En 2001, Mullen et co. ([Mullen et coll. 2001](#)) trouvent que la dilatation après 5 minutes d'occlusion était abolie avec l'infusion de L-NAME, inhibiteur de la NOS, indiquant que la FMD est NO-dépendante. Cependant, après 15 minutes d'occlusion, qui résulte en un pic de même amplitude que 5 minutes mais une hyperhémie réactive plus longue, ni le L-NAME, ni l'inhibition de la cyclooxygénase (COX) n'avait d'effet sur la réponse de la FMD. (Rappelons que la COX est l'enzyme qui catalyse la transformation de l'acide arachidonique en PGH₂, qui sera métabolisée en PGI₂, vasodilatateur). De même, après un stress de cisaillement prolongé, la FMD n'était pas non plus affectée par l'inhibition de la NOS ou de la COX. Ceci sous-entend que la réponse de la FMD lors de l'augmentation prolongée (supérieure à 5 minutes) des contraintes de cisaillement n'est médiée ni par le NO, ni par le PGI₂ ([Mullen et coll. 2001](#)). Dans ce cas, les mécanismes primaires responsables de la vasodilatation ne sont apparemment pas les mêmes que lors de courtes ischémie ([Pyke et coll. 2005](#)) mais ils sont, à notre connaissance, encore inconnus.

Pour toutes ces raisons, l'occlusion de 5 minutes, mieux tolérée, est typiquement utilisée ([Corretti et coll. 2002](#)).

Un autre paramètre étudié fut l'endroit du placement du brassard occlusif. L'occlusion placée dans la partie supérieure du bras étant plus tolérable par le sujet que lorsque le manchon est placé sur l'avant-bras, nous l'avons placé dans la partie proximale du membre supérieur. Ceci pourrait avoir eu un effet sur nos résultats étant donné que la

FMD varie selon que l'occlusion est faite sur la partie proximale du membre supérieur ou sur sa partie distale ([Berry et coll. 2000](#); [Betik et coll. 2004](#); [Corretti et coll. 2002](#)). En effet, une augmentation similaire du pic de débit sanguin dans l'avant-bras est suivie d'une FMD significativement plus grande et plus longue pour une occlusion faite au niveau proximal du bras que lorsque celle-ci est placée sur l'avant-bras ([Betik et coll. 2004](#)). Néanmoins, toutes nos mesures sont prises en relatif de manière à ce que chaque sujet soit son propre contrôle. La variation des résultats de FMD liée au placement du manchon d'occlusion est donc négligeable par le fait que le manchon a tout le temps été placé au même endroit sur le bras.

Depuis quelques années, une importance de plus en plus grande a été donnée à la quantification des contraintes de cisaillement (shear stress) pendant la FMD ([Padilla et coll. 2008](#); [Pyke et coll. 2005, 2007](#)). Sur base de la relation entre la contrainte de cisaillement (shear stress) et la FMD ([Betik et coll. 2004](#); [Padilla et coll. 2008](#); [Pyke et coll. 2007](#)) les chercheurs ont commencé à normaliser la dilatation flux-dépendante en la divisant par la vitesse de cisaillement (shear rate) ([Padilla et coll. 2008](#)); Thijssen, 2009). Mais cette méthode n'est valable que si (1) la relation entre les paramètres est linéaire, (2) le point d'intersection entre l'axe des y et la pente de régression de la relation passe par 0, (3) la distribution des données est gaussienne et (4) les variances sont similaires entre les groupes ([Atkinson et coll. 2009](#)). Si ces conditions ne sont pas remplies, l'application de la normalisation de la FMD peut amener à une mauvaise interprétation et de fausses conclusions ([Atkinson et coll. 2009](#); [Thijssen et coll. 2009](#)).

De plus, pour cette technique, le bras devait être placé sur un portoir, dans une gouttière, l'amplitude de l'ischémie devait être mesurée à l'aide du near-infrared spectrometry (NIRS). Tout du matériel coûteux, encombrant et difficilement accessible sur le terrain.

Pour toutes ces raisons, et parce que la technique n'était pas encore disponible au moment de nos expériences, nous n'avons donc pas fait de normalisation de la FMD.

Ceci est loin de poser problème puisque dans un but de pouvoir comparer les résultats, les variations prises dans nos études sont prises avant et après la plongée ou après la prise de chocolat sur le même sujet, ce qui limite fortement l'influence des forces de cisaillement dans nos mesures. Dans ce cas, il n'était donc pas nécessaire de normaliser nos résultats de FMD en fonction des forces de cisaillement.

La mesure de la FMD prend en compte les variations et de l'endothélium, et du muscle

lisse. Il aurait évidemment été intéressant d'utiliser des donneurs de NO tel que le glycéryl nitrate ou des bloqueurs de la NO-synthétase comme le L-NAME pour dissocier les effets de l'endothélium de celui du muscle lisse. Mais il fut démontré que l'administration de donneurs de NO modifie la formation de bulles ([Mollerlokken et coll. 2006](#); [Wisloff et coll. 2004](#)) et l'administration de L-NAME chez les rats a montré une augmentation dramatique du nombre de bulles détectées et un temps de survie significativement réduit ([Wisloff et coll. 2003](#)). Ces auteurs ont spéculé que l'administration de L-NAME pouvait rendre l'endothélium plus hydrophobe, augmentant l'adhérence des précurseurs des bulles. Pour toutes ces raisons, nous avons choisi de faire la FMD sans ajout de donneur ou de bloqueur de NO afin de ne pas modifier les conditions expérimentales de la plongée. De plus, nous voulions mesurer le NO en même temps que la FMD pour observer son évolution. Nous ne pouvions donc pas administrer de molécules risquant de modifier la production ou la libération du NO ainsi que la fonction endothéliale.

Concernant les analyses sanguines, la quantité de nitrite/nitrate mesurée est évidemment influencée par l'alimentation du sujet au moment des expériences. Pour ce faire, nous avons demandé aux sujets de manger normalement au dernier repas, sans y ajouter d'aliments riches en nitrates ([Engan et coll. 2012](#)). Il est évident que les concentrations en nitrites et nitrate avant plongée sont très variables entre les régimes alimentaires. De plus, les expériences ont été réalisées en Belgique, en France et en Italie avec des populations différentes. C'est pourquoi, une fois de plus, tous nos résultats ont été comparés en relatifs où chaque sujet était son propre contrôle afin de limiter les influences extérieures à celles occasionnées par la plongée elle-même.

Concernant l'analyse des échantillons, tous ont été mis sur la même microplaque, y compris les courbes standard nous assurant que les échantillons plasmatiques ont bien été analysés dans les mêmes conditions.

2.4. ANALYSES STATISTIQUES

Toutes les analyses statistiques ont été effectuées sur ordinateur à l'aide du programme GraphPad Prism 5 (La Jolla, CA, USA). Avant tout test, la normalité des échantillons a été vérifiée grâce au test de Kolmogorov-Smirnov. Plusieurs types d'analyses ont alors été effectués. Le seuil de signification a pour tous les tests été pris à $p < 0,05$.

2.4.1. COMPARAISON ENTRE L'ÉVOLUTION D'UN PARAMÈTRE ET 100%.

Ceci s'applique typiquement aux résultats pre-post (avant – après plongée, avant-après chocolat). Pour ce faire, les résultats ont été préalablement mis en pourcentage des valeurs initiales, c'est à dire en divisant les résultats post test par les pré tests correspondants et en multipliant le tout par 100. Le résultat obtenu correspond donc au pourcentage des valeurs initiales. Un résultat égal à 100% correspondra à « aucune évolution » alors qu'un résultat significativement supérieur ou inférieur traduira respectivement une augmentation ou une diminution des paramètres après la plongée ou l'ingestion de chocolat par rapport à avant. La différence entre le pourcentage d'évolution et le 100% a été analysée grâce au *t* test de Student à un échantillon (paramétrique) si les résultats passaient le test de normalité ou le test des rangs de Wilcoxon (non-paramétrique) le cas échéant.

2.4.2. COMPARAISON ENTRE LES GROUPES OU LES PARAMÈTRES.

La comparaison entre les plongeurs à l'air et en apnée, entre l'évolution de la FMD et de celle de la pléthysmographie ne sont que des exemples de comparaisons pour lesquelles le *t* test non pairé (paramétrique) ou le test de Mann-Withney (non-paramétrique) a été utilisé.

Chapitre 3 - LA DYSFONCTION ENDOTHELIALE APRES UNE PLONGEE A L'AIR OU EN APNEE, DEUX MECANISMES DIFFERENTS DE VARIATION DU MONOXYDE D'AZOTE ?

L'article publié dans l'*Undersea and Hyperbaric Medicine Journal* se trouve en Annexe 1.

Theunissen S, Guerrero F, Sponsiello N, Cialoni D, Pieri M, Germonpre P, Obeid G, Tillmans F, Papadopoulou V, Hemelryck W, Marroni A, De Bels D & Balestra C. (2013). Nitric oxide-related endothelial changes in breath-hold and scuba divers. *Undersea Hyperb Med* **40**, 135-144.

Cet article fut cité dans « New pearls of wisdom in the diving and hyperbaric medicine literature » présenté par Jose Evangelista et Davut Savaser dans l'UHMS conference (Orlando, FL).

3.1. OBJECTIFS

La fonction endothéliale des plongeurs à l'air (SCUBA) a été comparée à celle des apnéistes pour investiguer l'influence des différents types d'hyperoxie (continue ou intermittente) sur le système vasculaire.

3.2. PROTOCOLE

3.2.1. POPULATION ÉTUDIÉE

Après avoir signé un consentement éclairé, 9 plongeurs masculins expérimentés en plongée à l'air (Certifiés minimum « plongeurs autonomes » selon les normes ISO 24801-2 avec au moins 50 plongées) et 5 apnéistes (au moins 4 ans d'expérience) ont participé de manière volontaire à cette étude pilote. Ils ont été sélectionnés parmi une large population de plongeurs de manière à obtenir un groupe homogène en âge, composition corporelle et état de santé : non-fumeur avec une activité physique régulière mais pas excessive (exercice aérobie une à trois fois par semaine). Avant de rentrer dans l'étude, ils devaient être aptes à la plongée. Aucun sujet ne pouvait présenter d'antécédent d'accident de plongée, d'anormalité cardio-vasculaire et aucun d'entre eux ne pouvait être sous médication cardio-active.

3.2.2. PROFIL DES PLONGÉES ET MESURES

Toutes les mesures ont été faites dans une piscine calme dédiée à la plongée sous-marine (Nemo33, Bruxelles, Belgique) où la température de l'eau était de 33°C, ne nécessitant dès lors pas le port d'une combinaison thermique. Il fut demandé à tous les participants de ne pas faire d'exercice intense durant les 48h précédant les tests. L'alimentation des sujets fut également contrôlée évitant la nourriture riche en nitrates ([Engan et coll. 2012](#)). Tous les tests ont été effectués le matin et le dernier repas était environ 10h auparavant.

Chaque plongeur à l'air a effectué une plongée à 25 mètres durant 25 minutes. Ce profil tombe dans les plongées dites « sans décompression » ([NAVSEA 2008](#)). La vitesse de descente était de 15 mètres par minute et la remontée de 10 mètres par minute jusqu'à la surface, sans palier de décompression (non requis selon les tables USN utilisées).

Chaque apnéiste a effectué une série de plongées successives à 20 mètres de profondeur jusqu'à ce qu'il cumule 25 minutes de temps total d'immersion. Les apnéistes plongeaient par paires afin que chaque plongeur serve de plongeur sécurité à son binôme.

La fonction endothéliale artérielle fut mesurée avant et après chaque plongée à l'air ou série de plongées successives en apnée par la mesure de la FMD au niveau de l'artère brachiale et par la PORH. Le NO fut également mesuré par prise de sang avant et 15 minutes après la plongée.

3.3. RESULTATS

Si l'on compare les plongeurs à l'air et les apnéistes, concernant leur âge ($40,1 \pm 5,8$ ans vs $34,4 \pm 9,9$ ans), taille ($180,2 \pm 5,2$ cm vs $182,6 \pm 3,4$ cm) et poids ($82,9 \pm 10,3$ kg vs $78,5 \pm 9,8$ kg), les 2 groupes étaient comparables. Aucune différence significative n'a été observée entre les 2 groupes pour les données anthropométriques. ($p > 0,05$).

Etant donné le protocole de l'étude, la structure de l'immersion était différente entre les 2 groupes. En effet, les apnéistes ont effectué une série de plongées successives de manière à cumuler 25 minutes de temps total d'immersion. Le nombre moyen de plongées en apnée fut de $10 \pm 0,84$ plongées avec un temps d'immersion total moyen de 25,6 minutes $\pm$ 58 secondes. Le temps moyen de récupération fut $4,91 \pm 1,31$ min. La

variation de ce temps de récupération est compréhensible puisque les apnéistes plongeaient par deux permettant à chacun d'être le plongeur sécurité de son binôme. Tous les plongeurs ont terminé l'étude et aucun d'entre eux n'a développé de symptôme de maladie de décompression.

3.3.1. DIAMÈTRE BASAL DE L'ARTÈRE BRACHIALE ET FMD

Dans le groupe plongée à l'air, le diamètre basal moyen (pré-occlusion) de l'artère brachiale fut significativement réduit après la plongée par rapport au diamètre avant plongée ($85,76 \pm 14,60$ % des valeurs avant plongée ; $p = 0.019$). De même, une réduction de la FMD fut observée après une plongée à l'air ($94,26 \pm 7,33$ % des valeurs avant plongée, ce qui correspond à une réduction de $5,74$ % ; $p = 0.047$).

Dans le groupe des plongeurs en apnée, aucune différence dans les diamètres basaux a été observée, entre avant et après plongée ($86,56 \pm 24,19\%$ des valeurs pré plongée; $p > 0.05$). Parallèlement, une réduction de la FMD fut également observée en apnée ($95,43 \pm 3,51\%$ des valeur pré plongée, ce qui correspond à une réduction de 4.57 % ; $p = 0.043$). Aucune différence entre les 2 groupes n'a été observée. Les résultats de la FMD sont présentés dans la Fig 1.

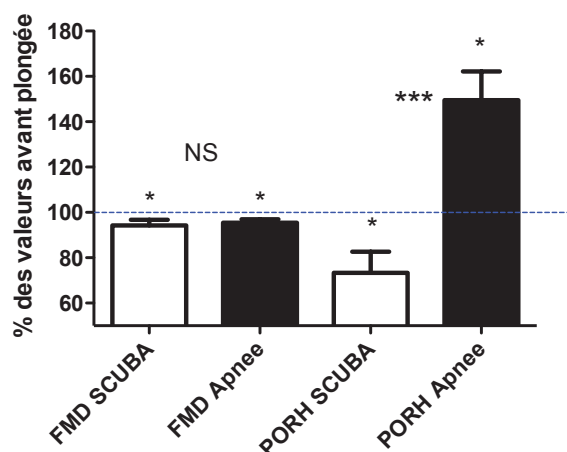


FIGURE 8 - DILATATION FLUX-DEPENDANTE (FMD) ET HYPERHEMIE REACTIVE POST-OCCLUSIVE (PORH) AVANT ET APRES LA PLONGEE.

Les résultats sont présentés en pourcentage des valeurs avant plongée ($p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).*

3.3.2. HYPERHÉMIE RÉACTIVE POST-OCCLUSIVE

Une réduction de la PORH fut observée après la plongée à l'air ($73,38 \pm 26,33$ % des valeurs avant plongée, ce qui correspond à une réduction de 26,62 % ; $p = 0,024$), alors qu'une augmentation de celle-ci fut observée après la série de plongées en apnée ($149,5 \pm 28,37$ % des valeurs avant plongée, ce qui correspond à une augmentation de 49,5 % ; $p = 0,017$). Une différence très hautement significative est observée pour la PORH entre les apnéistes et les plongeurs à l'air ($p = 0,0004$) (Fig. 1).

3.3.3. LE MONOXYDE D'AZOTE CIRCULANT

Aucune différence de concentration en monoxyde d'azote (NO) ne fut trouvée entre avant et après une plongée à l'air à 25 mètres de profondeur pendant 25 minutes ($100,5 \pm 35,33$ % des valeurs avant plongée ; $p > 0,05$). Par contre, celui-ci augmente significativement après une série de plongées successives en apnée ($154,4 \pm 21,9$ % des valeurs avant plongée ; $p = 0,005$). Alors que la FMD n'a montré aucune différence significative entre les 2 groupes ($p > 0,05$), le pourcentage d'évolution du NO circulant entre avant et après la plongée dans le groupe apnée fut significativement plus élevé que dans le groupe de plongeurs à l'air ($p = 0,008$) (Fig. 2).

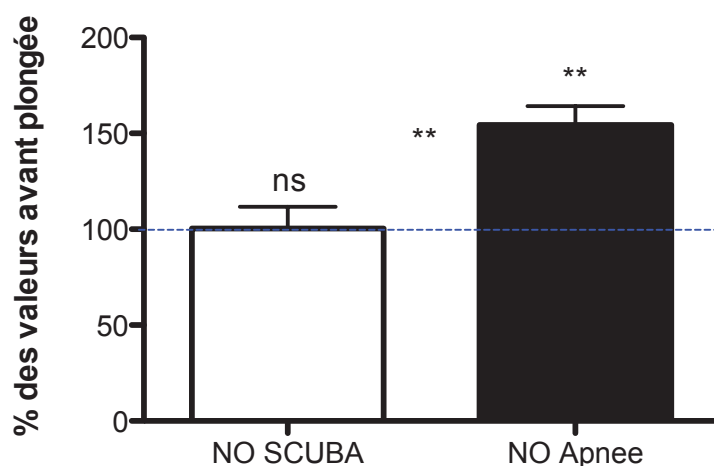


FIGURE 9 – EVOLUTION DU MONOXYDE D'AZOTE CIRCULANT (NO) APRES UNE PLONGEE EN APNEE (N = 5) OU A L'AIR (N = 9).

Les résultats sont présentés en pourcentage des valeurs avant plongée ($p < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$).*

3.4. DISCUSSION

Dans cette étude, des signes de dysfonction endothéliale, indiqués par la réduction de FMD, ont été trouvés aussi bien pour les plongeurs à l'air (SCUBA) que pour les apnéistes et aucune différence entre les groupes n'a été observée. Dans le groupe SCUBA, la réduction de FMD est confirmée par d'autres auteurs ([Brubakk et coll. 2005](#); [Obad et coll. 2010](#); [Obad et coll. 2007a](#); [Obad et coll. 2007b](#)). Par contre, dans le groupe des plongeurs en apnée, la réduction de FMD est associée à une augmentation du NO circulant, alors que ce n'est pas le cas après une plongée à l'air.

Les causes de dysfonction endothéliale après une plongée à l'air restent obscures. Le stress oxydant induit par l'hyperoxie fut évoqué puisque l'hyperoxie provoque une vasoconstriction ([Beckman et coll. 1996](#); [Demchenko et coll. 2000](#)). L'hypothèse généralement acceptée est que l'augmentation de la pression partielle en oxygène promeut du stress oxydant qui est à l'origine de la dysfonction endothéliale ([Demchenko et coll. 2000](#)). Et cette hypothèse se base sur la démonstration que l'hyperoxie augmente la production d'anion superoxyde ([Jamieson et coll. 1986](#)), un puissant radical libre dérivé de l'oxygène (ROS) qui interagit avec le NO, le détruisant pour produire du peroxynitrite (ONOO-) ([Sureda et coll. 2009](#)). En effet, la réduction de FMD après une plongée à l'air est partiellement prévenue par l'administration de vitamines C et E pendant 4 semaines avant la plongée ([Obad et coll. 2010](#); [Obad et coll. 2007a](#); [Obad et coll. 2007b](#)). Les ROS ne s'attaquent pas uniquement au NO lui réduisant sa biodisponibilité, ils oxydent également la tétrahydrobiopterine (BH₄), un cofacteur majeur de l'endothelial Nitric Oxide Synthétase (eNOS), la transformant en dihydrobiopterine (BH₂) ce qui entraîne une réduction de la libération de NO par découplage de l'eNOS ([Forstermann 2010](#)). Une bioactivité altérée de la BH₄ est impliquée dans la dysfonction endothéliale induite par l'hypertension ([Guerrero et coll. 2012](#); [Landmesser et coll. 2003](#)). Donc, si un cofacteur de l'eNOS est altéré, une réduction de FMD va également être observée. De plus, le stress oxydant cause une diminution de l'activité de l'eNOS, ce qui entraîne une diminution de la production de NO ([Ilan et coll. 2005](#)). La dilatation NO-dépendante se verra dès lors réduite, comme évalué par la réduction du diamètre basal pré-occlusion de l'artère brachiale et par la dilatation flux-dépendante.

Comme présenté dans la Figure 3, la dilatation flux-dépendante (FMD) et le monoxyde d'azote circulant (NO) furent mesurés avant et après la plongée à l'air. Aucune variation de NO n'a été observée. Notre hypothèse est qu'une plongée à 25 mètres pendant 25 minutes entraîne une hyperoxie augmentant la quantité d'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) qui réagit avec le NO pour former du $ONOO^-$. Le NO est donc moins disponible pour participer à la FMD. C'est pourquoi une FMD réduite est observée après une plongée à l'air.

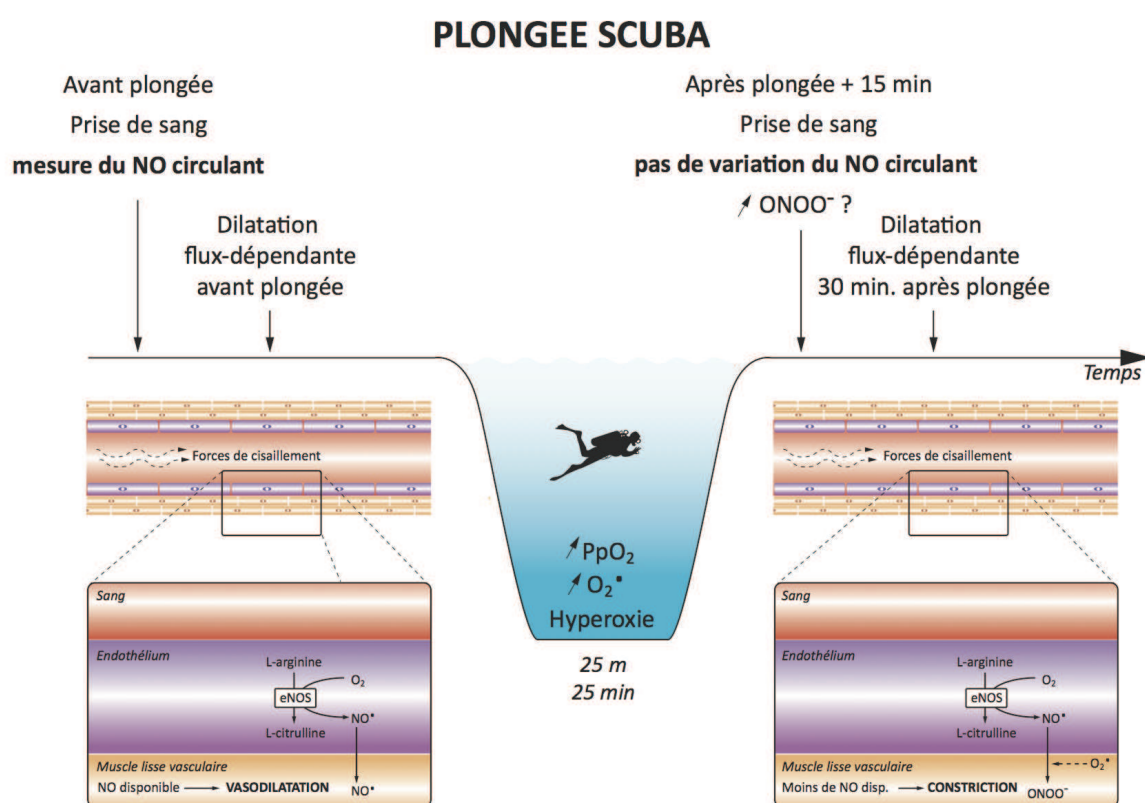


FIGURE 10 – RESUME DES MECANISMES PROPOSES PENDANT UNE PLONGEE A L'AIR (SCUBA).

Veuillez vous référer au texte pour plus d'explications.

Nos résultats montrent également une fonction endothéliale altérée dans la microcirculation après une plongée à l'air, comme indiqué par la PORH. Cependant, le manque de variation des taux de nitrite/nitrate entre avant et après la plongée supporte l'hypothèse que la réduction de FMD n'est pas due à des changements de synthèse/libération de NO mais plus à une réduction de sa disponibilité. Celle-ci peut être due à une inactivation par le stress oxydant plus importante et/ou à des activités sympathique et parasympathique comme conséquence de l'hyperoxie. Cette dernière

entraîne d'ailleurs des altérations de la fonction cardio-vasculaire et du système nerveux autonome pendant l'exposition à l'hyperoxie et même après le retour à une respiration normoxique ([Gole et coll. 2011](#)). De plus, une diminution de la volémie et de la pré-charge cardiaque ont été rapportées après immersion ([Mourot et coll. 2004](#)) ou plongée ([Boussuges et coll. 2006](#)). Egaleme nt, nous pouvons émettre l'hypothèse que l'augmentation de PO₂ durant la plongée à l'air va modérément augmenter les résistances vasculaires périphériques comme démontré pendant la respiration de mélanges gazeux hyperoxiques ([Gole et coll. 2011](#); [Gole et coll. 2009b](#); [Rossi et coll. 2005](#)). Une réduction du volume d'éjection cardiaque et du débit cardiaque ainsi qu'une diminution de la fraction éjectée ont été rapportés pendant la plongée à l'air ([Boussuges et coll. 2012](#); [Marabotti et coll. 1999](#)). Tout ceci est concomitant avec la réduction de FMD observée après une plongée à l'air.

En plongée en apnée, une réduction de la FMD fut également observée après une série d'apnées successives. A notre connaissance, ce sont les premiers résultats rapportés sur les plongeurs en apnée. La réduction de FMD semble indiquer que la plongée en apnée agit sur la fonction endothéliale. Curieusement, les effets sont opposés sur les grosses artères et sur la circulation périphérique. De plus, la réduction de FMD est accompagnée d'une augmentation du NO circulant. Etant donné que les vaisseaux périphériques sont plus petits, les forces de cisaillement (shear stress) y sont plus importantes que dans des vaisseaux comme l'artère brachiale. De plus, il existe une relation inverse entre la taille des artères et l'amplitude de la dilatation endothéliale ([Raitakari et coll. 2000a](#)). Les grosses artères comme l'artère brachiale sont moins sensibles au stress de cisaillement. Il n'est donc pas inhabituel de trouver une réaction différente entre la fonction endothéliale des grosses artères et l'hyperhémie réactive post-occlusive dans le doigt ([Cornelissen et coll. 2012](#)).

Il est accepté que la FMD est modulée par le NO produit par les cellules endothéliales ([Mullen et coll. 2001](#); [Pyke et coll. 2005](#)). Une explication pour l'augmentation du NO circulant après une plongée en apnée pourrait être que ce type de plongée requière un effort physique plus important que la plongée avec bouteille. En effet, à la surface, l'apnéiste possède une flottabilité positive. Pour descendre, il doit effectuer un effort durant les premiers mètres. Et lorsqu'il revient à la surface, l'apnéiste doit palmer depuis le fond jusqu'à ce qu'il retrouve une flottabilité neutre. D'un autre côté, les

plongeurs SCUBA sont plus lourds et donc descendent facilement sans faire d'effort. Et pour revenir à la surface, ils utilisent généralement leur gilet de flottabilité, ce qui leur permet également de remonter sans fournir d'effort physique.

Il a été prouvé que l'exercice physique augmente la production de NO ([Wang et coll. 1993](#)) et dans des conditions normales, l'entraînement améliore la fonction endothéliale, ce qui est directement lié à une augmentation de la biodisponibilité du NO dans le muscle lisse ([de Moraes et coll. 2008](#)). Dans cette étude sur les apnéistes, nous n'avons pas pu trouver cet effet. Nous avons dès lors émis l'hypothèse que malgré l'augmentation de la production de NO, l'exercice physique produisait du stress oxydant ([Davies et coll. 1982](#); [Duthie et coll. 1990](#)). L'exercice et/ou l'hyperoxie intermittente (du moins en partie) et l'hypoxie subséquente ([McQuillan et coll. 1994](#)) pendant la plongée, qui tous les deux entraînent une réduction de la disponibilité du NO peuvent expliquer cette réponse endothéliale réduite. En effet, un stress oxydatif plus important augmente le taux d'anions superoxydes (O_2^-) qui interagissent rapidement avec le NO pour former des peroxynitrites, réduisant ainsi la disponibilité du NO dans le muscle lisse vasculaire (voir Figure 4). L'augmentation de PO_2 durant la plongée en apnée est si brève qu'il semble difficile de la considérer significative ; néanmoins, il a été démontré que pour des plongeurs en apnée, une exposition hyperoxique (même brève) ([Balestra et coll. 2006](#)) ou hypoxique ([de Bruijn et coll. 2008](#)) agit comme un puissant déclencheur pour des réponses physiologiques suite à des plongées successives. Il semble donc que le NO est inactivé pendant la plongée, même si l'hyperoxie est intermittente. Nous émettons l'hypothèse qu'il y a du stress oxydant pendant la plongée en apnée entraînant une dysfonction endothéliale. Dans une prochaine étude, il serait intéressant de mesurer les marqueurs de stress oxydant (comme les peroxynitrites) et d'estimer la quantité de ROS produits lors de ce type d'activité. Bien sûr, d'autres facteurs concomitants peuvent être présents comme nous savons que les embolies gazeuses endommagent l'endothélium. ([Nossum et coll. 2002](#); [Nossum et coll. 1999](#)). Mais cette hypothèse nous paraît moins probable car les apnéistes plongent sur une seule inhalation ([Hooker et coll. 2012](#)) et l'air atmosphérique n'est pas vraiment enclin à provoquer une sursaturation d'azote. C'est pourquoi, bien que l'exercice physique peut être responsable de la production de NO, l'hyperoxie concomitante semble avoir neutralisé le NO, résultant en plus de métabolites circulants mais tout en réduisant la biodisponibilité du NO à participer à la vasodilatation.

PLONGEE EN APNEE

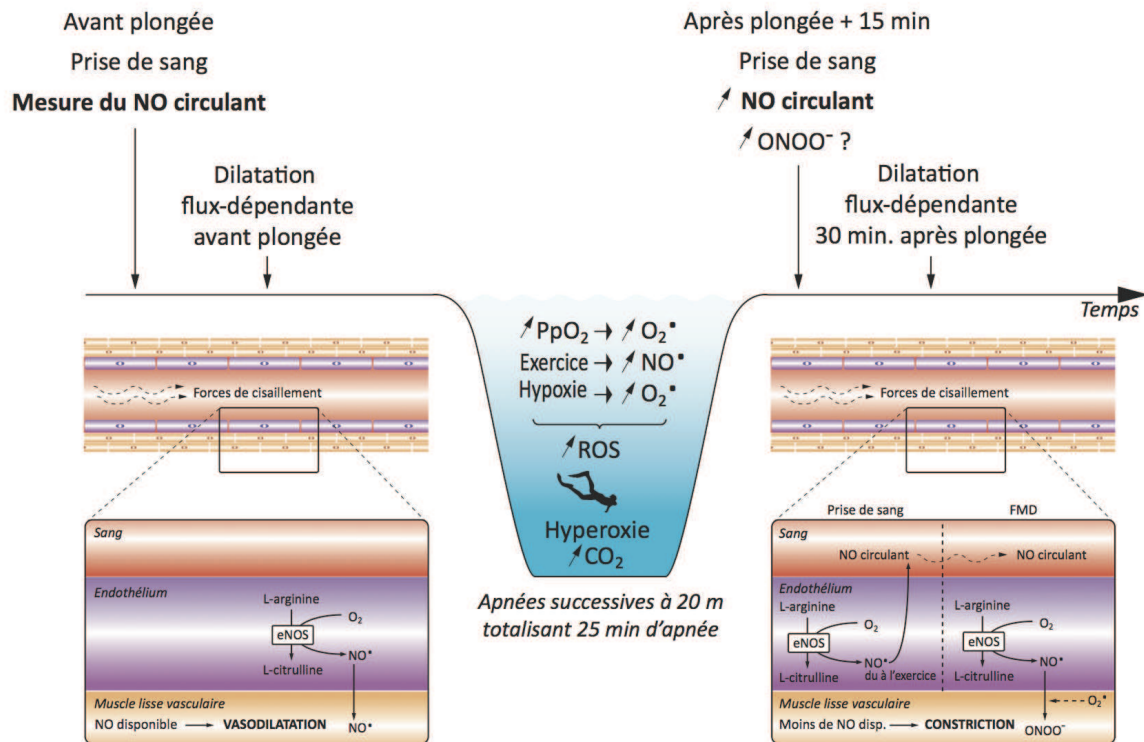


FIGURE 11 – RESUME DES MECANISMES PROPOSES DURANT LA PLONGEE EN APNEE.

Le monoxyde d'azote (NO) et la dilatation flux-dépendante (FMD) furent mesurés avant et après la plongée. Les apnéistes devaient effectuer une série de plongées successives en apnée les amenant à un total de 25 minutes d'immersion. Une augmentation du NO accompagnée d'une réduction de la FMD fut observée après la série de plongées en apnée. Nous avons émis l'hypothèse qu'il y a une augmentation de stress oxydant du à l'exercice physique ou (du moins en partie) à une augmentation transitoire de PO₂ pendant la plongée et/ou à une inhibition de l'eNOS par l'hypoxie subséquente, qui tous diminuent la disponibilité du NO. C'est pourquoi une FMD réduite fut observée après la série d'apnées successives.

Contrairement à la plongée à l'air, la réduction du diamètre basal de l'artère brachiale entre avant et après la plongée ne fut pas significative. Vu que l'amplitude de la PORH augmente après la plongée en apnée, cela suggère une réduction des résistances vasculaires périphériques, contrairement à la FMD qui, elle, diminue. Comme le taux de NO circulant après la plongée en apnée augmente, nous pouvons considérer que la réponse au NO circulant est plus grande dans les petites artères comme les artères digitales ([Coffman 1994](#)) que dans les grosses artères, choisies pour la mesure de la

FMD. En effet, Noon et coll. ([Noon et coll. 1996](#)) ont suggéré que la production endogène de NO pouvait avoir un effet plus important sur la régulation du flux sanguin micro-vasculaire dans des régions comme le bout des doigts.

3.5. CONCLUSION

Aussi bien après une plongée à l'air qu'en apnée, une réduction de FMD est observée. Simultanément, une augmentation du NO circulant est observée dans le groupe apnée alors qu'aucune variation du NO ne se retrouve pour les plongeurs à l'air. Comme démontré dans plusieurs études, la plongée SCUBA induit une augmentation du stress oxydant qui réduit la vasodilatation flux-dépendante. Celle-ci n'est pas liée à une libération de NO puisqu'aucune variation de NO n'est observée après une plongée à l'air. Elle peut donc être due à une inactivation du NO, probablement par du stress oxydant.

Durant la plongée en apnée, une réduction similaire de FMD est observée malgré des taux de NO plasmatiques élevés. A partir du moment où les conditions environnementales sont comparables entre les plongeurs à l'air et en apnée, nous pouvons considérer que la réduction de FMD dans les 2 groupes est due à une diminution de la disponibilité du NO au niveau du muscle lisse vasculaire et que l'augmentation du NO circulant dans le groupe des plongeurs en apnée est principalement due à un exercice physique plus important que dans le cas d'une plongée SCUBA. La réponse à l'exercice est plus importante que l'effet de l'hyperoxie dans les petites artères proches du muscle, entraînant des effets opposés dans les grosses artères et la circulation périphérique.

La réduction du NO disponible semble être due soit à l'hyperoxie transitoire et/ou à l'hypoxie subséquente modérée dans le groupe des plongeurs en apnée. Nous concluons que la plongée SCUBA et en apnée réduisent la FMD mais que les mécanismes NO-dépendants sont différents. Néanmoins, cette étude a été faite avec un petit nombre d'apnéistes, et même si les tests statistiques prennent en compte ce nombre restreint de mesures, les résultats sont à prendre avec précaution. Il serait donc intéressant de refaire cette expérience avec plus d'apnéistes.

Chapitre 4 - LE STRESS OXYDANT APRES UNE SERIE D'APNEES SUCCESSIVES

L'article publié dans le *Diving and Hyperbaric Medicine Journal* se trouve en Annexe 2.

Theunissen S, Sponsiello N, Rozloznik M, Germonpré P, Guerrero F, Cialoni D & Balestra C. (2013). Oxidative stress in breath-hold divers after repetitive dives. *Diving Hyperb Med* **43**, 63-66.

Ce poster reçu le Musimu Award au congrès de l'EUBS à Belgrade.

4.1. OBJECTIFS

Etant donnée la dysfonction endothéliale trouvée dans le chapitre précédent après une série de plongées en apnée, cette étude a pour but d'analyser les variations des marqueurs plasmatiques de stress oxydant après une série d'apnées successives.

4.2. PROTOCOLE

4.2.1. POPULATION ETUDIÉE

Après signature du consentement éclairé, 13 apnéistes masculins non-fumeurs expérimentés (ayant au moins 4 ans d'expérience) ont participé de manière volontaire à l'étude. Avant de commencer les expérimentations, un médecin de plongée a vérifié qu'ils étaient aptes à la plongée. Aucun sujet ne pouvait présenter d'antécédent d'accident de plongée, d'anormalité cardio-vasculaire et aucun d'entre eux ne pouvait être sous médication cardio-active. Il fut demandé à tous les participants de ne pas faire d'exercice intense durant les 48h précédant les tests. L'alimentation des sujets fut également contrôlée par un médecin nutritionniste évitant la nourriture riche en nitrates ([Engan et coll. 2012](#)). Tous les échantillons sanguins ont été pris au niveau de la veine antécubitale, le matin. Le dernier repas était environ 10h auparavant.

4.2.2. PROFIL DES PLONGÉES ET MESURES

Chaque plongeur en apnée a effectué une série d'apnées successives en mer jusqu'à 20 mètres de profondeur lui permettant de totaliser 20 minutes d'apnée. Les plongées étaient organisées par paires de manière à ce que chaque apnéiste puisse servir de plongeur sécurité pour son binôme. Le temps total d'immersion était d'environ une

heure. Toutes les apnées (après une grande inspiration d'air) ont été faites en mer (Santa Maria di Leuca, Italy). La température de l'eau à la surface était approximativement de 30°C, et 18°C au fond. La température de l'air était d'environ 35°C. Les apnéistes portaient une combinaison humide de 3 mm. Les échantillons sanguins furent collectés une heure avant la plongée dans le centre de plongée (à 15 min en bateau du site de plongée) et immédiatement après les séries d'apnées.

Le monoxyde d'azote, les peroxynitrites et les groupements thiols furent mesurés avant et après la série de plongées successives.

4.3. RESULTATS

Treize apnéistes ont participé à l'étude ($29 \pm 4,7$ ans, $176,5 \pm 4,4$ cm, $73,9 \pm 4,6$ kg). La moyenne des plongées était de 9 ± 2 apnées avec un temps d'immersion moyen de $20,6 \pm 1,5$ minutes. Le temps moyen d'immersion dans l'eau était de $61,47 \pm 8,17$ minutes.

Le temps moyen de récupération entre les apnées successives était de $4,5 \pm 1,45$ min. Les apnéistes plongeaient par deux permettant à chacun d'être le plongeur sécurité de son binôme. La variation du temps de récupération est donc compréhensible. Tous les plongeurs ont terminé l'étude et aucun d'entre eux n'a développé de symptôme de maladie de décompression.

4.3.1. NITRATE/NITRITE PLASMATIQUE

Le taux plasmatique de nitrate et nitrite, marqueurs du NO circulant, a significativement augmenté après les séries d'apnées successives ($169,1 \pm 58,26$ % des valeurs avant plongée, ce qui correspond à une augmentation de 69,1 % ; $p < 0,001$).

4.3.2. MARQUEURS DE STRESS OXYDANT : LA NITROTYROSINE ET LES GROUPEMENTS THIOLS

La nitrotyrosine, un marqueur du taux de peroxynitrites a significativement doublé après les séries d'apnées successives. ($207,2 \pm 78,31$ % des valeurs initiales ; $p = 0,0012$).

Les groupements thiols ont quant à eux significativement diminué après les séries de plongées ($69,88 \pm 19,23$ % of pre-dive values ; $p < 0,001$).

Les valeurs relatives sont présentées dans la figure 12.

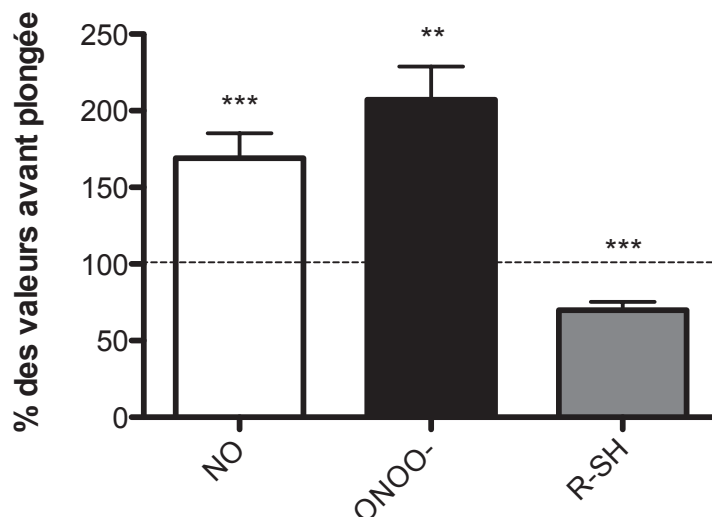


FIGURE 12 – EVOLUTION DU MONOXYDE D’AZOTE (NO), DES PEROXYNITRITES (ONOO-) ET DES GROUPEMENTS THIOLS (SH) APRES UNE SERIE DE PLONGEES SUCCESSIVES A 20 METRES DE PROFONDEUR POUR UNE DUREE TOTALE D’IMMERSION DE 20 MINUTES.

*Les résultats sont présentés en pourcentage des valeurs avant plongée (** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$).*

4.4. DISCUSSION

Nous avons observé une augmentation du NO circulant et des peroxynitrites (ONOO-) en même temps qu’une diminution des thiols (R-SH). Le NO vient de la transformation de la L-arginine en L-citrulline et NO grâce à la NOS. Cette réaction nécessite cinq électrons et est dépendante de la NADPH comme donneur d’électrons. C’est le plus important vasoprotecteur identifié jusqu’à présent. Une partie du NO formé dans les cellules endothéliales est relâché dans la circulation. Et par son affinité pour l’hémoglobine (Hb) des érythrocytes, le NO circulant subit de multiples réactions avec l’Hb qui tendent à lui réduire sa biodisponibilité dans le compartiment vasculaire ([Piantadosi 2012](#)).

Le NO réagit et interagit avec les ROS et ces réactions peuvent également avoir un effet significatif sur la fonction cardiaque ([Khan et coll. 2004](#)). A notre connaissance, les résultats sur les altérations vasculaires au cours du temps après une plongée en apnée sont limités ([Dujic et coll. 2012](#)). En plongée à l’air, une diminution du volume intravasculaire et de la pré-charge cardiaque ont été communément rapportés après la plongée ([Boussuges et coll. 2006](#)). Ceci est concomitant avec une augmentation modérée des résistances vasculaires qui peut être due à une inactivation du NO, probablement par du stress oxydant ([Gole et coll. 2011](#)). En effet, le nitrite plasmatique et les

marqueurs de stress oxydant restent altérés pendant les 15 minutes de récupération suivant l'hyperoxie ([Modun et coll. 2012](#)).

Les résultats obtenus dans cette étude confirment ceux obtenus dans le chapitre précédent, montrant une augmentation du taux de NO après une série d'apnées successives. Ceci peut être expliqué par l'exercice aigu modéré, connu pour augmenter la production de NO ([Jenkins et coll. 2009](#)). En effet, à la surface, les apnéistes possèdent une flottabilité positive. Pour descendre, ils doivent la contrebalancer en effectuant un effort durant les premiers mètres. Et lorsqu'ils reviennent à la surface, les apnéistes doivent palmer depuis le fond jusqu'à ce qu'ils retrouvent une flottabilité neutre.

Le stress oxydant est associé à la génération de ROS incluant l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$). Ce radical libre réagit avec le NO pour générer des peroxynitrites ($ONOO^-$), ce qui occasionne un stress oxydant additionnel et une inactivation des enzymes antioxydantes ([Wolin et coll. 2005](#)). Dans cette étude, nous avons observé plus de $ONOO^-$ et moins de thiols (R-SH), ce qui montre bien que du stress oxydant est présent pendant la plongée en apnée.

A notre connaissance, c'est la première fois que des changements de $ONOO^-$ et R-SH sont rapportés sur des plongeurs en apnée. L'hyperoxie rencontrée pendant la phase descendante de l'apnée et au fond augmente le taux de production de l'anion superoxyde qui est converti en peroxyde d'hydrogène ou eau oxygénée (H_2O_2), ou réagit avec le NO pour former des $ONOO^-$, puissant oxydant ([Jamieson et coll. 1986](#); [Sureda et coll. 2009](#)). Réagissant rapidement avec le NO, les anions superoxydes extracellulaires peuvent réduire sa biodisponibilité ([Demchenko et coll. 2002](#)). La disponibilité réduite du NO causée par les $O_2^{\cdot-}$ tend à la vasoconstriction et nuit à la vasodilatation NO-dépendante, ce qui est concomittant avec les récents résultats sur les plongeurs en apnée observés dans le chapitre 3 et dans la littérature ([Zhilyaev et coll. 2003](#)). Bien que l' H_2O_2 est un faible oxydant et relativement inerte avec la plupart des molécules, il oxyde les groupements thiols-cystéine (R-SH groups) au sein de la protéine. Cette réaction réversible modifie leur structure et fonction ([Angermuller et coll. 2009](#)). Quand des ROS sont présents en quantité physiologique, le NO réagit avec les protéines pour former des groupements R-SH. Mais un taux élevé d'anions superoxydes facilite l'interaction de ceux-ci (les $O_2^{\cdot-}$) avec le NO pour former des $ONOO^-$, à la place des groupements R-SH ([Ferdinandy et coll. 2000](#)). La quantité totale de groupements R-SH se voit dès lors

réduite, comme observé dans cette étude. L'anion superoxyde tend aussi à réagir avec lui-même. Ce phénomène s'appelle la dismutation et a pour conséquence une production d'eau et d'oxygène par l'action de la superoxyde dismutase (SOD).

Les plongeurs entraînés augmentent l'activité de la SOD pendant leur apnée et des changements aigus dans l'activité de leurs enzymes antioxydantes suggèrent qu'ils puissent être protégés de la perte d'antioxydants due à l'exercice et du stress oxydant causé par la plongée en apnée ([Bulmer et coll. 2008](#)). D'ailleurs, le stress oxydant après apnée est supprimé par une concentration plus élevée de substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique (TBARS) après trois mois d'entraînement ([Joulia et coll. 2003](#)). En parallèle, une activation du système antioxydant plasmatique contre le stress oxydant a été rapporté chez les phoques et en plongée en scaphandre autonome ([Sureda et coll. 2012](#); [Vazquez-Medina et coll. 2011](#)).

L'augmentation de la PO_2 pendant l'immersion en apnée est tellement courte qu'il semble difficile de considérer qu'elle joue un rôle significatif. Néanmoins, il fut montré que même des courtes expositions hyperoxiques ou hypoxiques agissent comme un déclencheur puissant de réponses physiologiques ([De Bels et coll. 2012](#); [de Bruijn et coll. 2008](#)). Donc, il semble que les $ONOO^-$ soient générés pendant ce genre de plongée, même si l'hyperoxie est intermittente. Cette production entraîne une inactivation du NO, réduisant sa biodisponibilité pour participer à la vasodilatation. Ceci peut être un facteur contribuant à la dysfonction endothéliale observée après la plongée en apnée (Chapitre 3).

4.5. CONCLUSION

Après la plongée en apnée, plus de NO circulant a été observé avec une augmentation des $ONOO^-$ et une réduction des R-SH. Le NO peut être produit par l'exercice physique occasionné par ce type de plongée. L'exercice physique, l'hyperoxie transitoire suivie d'une hypoxie et d'une accumulation de dioxyde de carbone (CO_2) augmentent le niveau des anions superoxydes ($O_2^{\cdot-}$). Ceci facilite l'interaction des $O_2^{\cdot-}$ avec le NO pour former des $ONOO^-$, en opposition à la production de R-SH. Du stress oxydant est donc bel et bien présent en plongée en apnée.

Chapitre 5 - LES EFFETS DU CHOCOLAT NOIR ET BLANC SUR LA FONCTION ENDOTHELIALE DE L'HOMME SAIN

5.1. OBJECTIFS

Avant de donner du chocolat aux plongeurs, il est nécessaire de connaître quel type de chocolat administrer et combien de temps avant la plongée. Le but de cette étude est de comparer les effets du chocolat noir et blanc sur des sujets sains ainsi que le moment où l'effet vasculaire est maximal.

5.2. PROTOCOLE

5.2.1. POPULATION ÉTUDIÉE ET MESURES

Cette étude s'est déroulée en 2 temps. Premièrement, 9 sujets sains non-fumeurs (5 hommes and 4 femmes) ont subi une mesure de FMD avant ingestion de 30g de chocolat noir et 30, 60, 90, 120, 150 et 180 minutes après la prise de chocolat afin de connaître le pic de FMD.

Dans un second temps, quarante sujets sains non fumeurs ont été divisés en 2 groupes, un groupe « chocolat blanc » (20 sujets, 11 hommes et 9 femmes) et un groupe « chocolat noir » (20 sujets, 7 hommes et 13 femmes). La FMD et la rigidité artérielle ont été mesurées pour chaque groupe avant et 120 minutes après ingestion de 30g de chocolat noir ou blanc.

Il fut demandé à tous les participants de ne pas faire d'exercice intense durant les 48h précédant les tests ainsi que de prendre un petit déjeuner normal sans nourriture additionnelle riche en antioxydants ([Engan et coll. 2012](#)).

5.3. RESULTATS

5.3.1. EVOLUTION DANS LE TEMPS

La dilatation flux-dépendant maximale fut observée 2h après ingestion de 30g de chocolat noir. Les résultats de l'évolution de la FMD au cours du temps sont présentés dans le tableau 3.

FMD n=9	Avant chocolat	Post 30 min	Post 60 min	Post 90 min	Post 120 min	Post 150 min	Post 180 min
Moyenne (%)	109,6	108,3	107,6	107,6	115,7	109,9	109,7
Ecart-type	7,7	5,1	6,1	6,8	7,4	6,7	7,9
T test entre avant et après chocolat		ns	ns	ns	*	ns	ns

TABLEAU 3 - EVOLUTION DE LA DILATATION FLUX-DEPENDANTE AVANT INGESTION DE 30G DE CHOCOLAT NOIR ET 30, 60, 90, 120, 150 ET 180 MINUTES APRES LA PRISE DE CHOCOLAT.

*Les résultats sont présentés en moyennes et écart-types. Le t test de Student compare les valeurs de FMD avant l'ingestion de chocolat noir et celles prises 30, 60, 90, 120, 150 et 180 minutes après la prise de chocolat (ns p>0,05 ; * p<0,05).*

5.3.2. CHOIX DU CHOCOLAT

Aucune variation du diamètre de l'artère brachiale n'a été observée dans le groupe chocolat blanc alors qu'une augmentation significative de celui-ci fut observée après ingestion de 30g de chocolat noir (respectivement 100,7 +/- 5,5% ; p>0,05 et 108,3 +/- 18,0 % du diamètre basal avant ingestion de chocolat ; p< 0,05). La FMD ne montre pas d'évolution après ingestion de chocolat blanc (96,73 +/- 7,0 % de la FMD pré-chocolat ; p=0,051) alors qu'ici aussi, une augmentation significative de la FMD apparaît après la prise de chocolat noir (102,43 +/- 4,2 % des FMD avant chocolat ; p=0,017). La différence entre la FMD des groupes chocolat blanc et noir est significative (p<0,01). L'index de rigidité artérielle mesuré par l'onde de pouls digitale n'a pas évolué, ni dans le groupe chocolat blanc (105,6 +/-18,0 % des index de rigidité artérielle pré-chocolat ; p>0,05), ni après ingestion de 30g de chocolat noir (98,26 +/- 10,8% des valeurs avant chocolat ; p>0,05). Les résultats en valeurs absolues sont présentés dans le tableau 3.

Chocolat blanc n=20	Avant chocolat		Après chocolat		t test
	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type	
Diamètre brachial pré-occlusion (mm)	3,7	0,5	3,7	0,5	ns
Dilatation flux-dépendante (%)	115,0	5,3	111,1	7,9	ns
Rigidité artérielle (m/s)	7,0	1,6	7,2	1,4	ns

Chocolat noir n=20	Avant chocolat		Après chocolat		t test
	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type	
Diamètre brachial pré-occlusion (mm)	3,6	0,7	3,8	0,7	*
Dilatation flux-dépendante (%)	109,5	7,2	112,1	7,6	*
Rigidité artérielle (m/s)	7,2	1,1	7,0	0,6	ns

TABLEAU 4 - RESULTATS EN VALEURS ABSOLUES DES DIAMETRES PRE-OCCLUSION DE L'ARTERE BRACHIALE, DE LA DILATATION FLUX-DEPENDANTE ET DE L'INDEX DE RIGIDITE ARTERIELLE AVANT ET APRES INGESTION DE 30G DE CHOCOLAT NOIR OU BLANC.

*Le t test de Student compare pour chaque groupe les valeurs avant et après l'ingestion de chocolat (ns p>0,05 ; * p<0,05).*

5.4. DISCUSSION

Contrairement au chocolat noir, le chocolat blanc n'a pas d'effet significatif sur le diamètre basal et la FMD.

Concernant le diamètre pré-occlusion, nous observons une augmentation de celui-ci après l'ingestion de chocolat noir alors qu'il n'y a pas de différence après 30g de chocolat blanc. Ceci contredit les observations d'Hermann et coll. ([Hermann et coll. 2006](#)) qui ne trouvent aucun changement du diamètre artériel basal dans les 2 groupes. Néanmoins, d'autres auteurs observent également une augmentation du diamètre de l'artère brachial après ingestion de chocolat noir ([Flammer et coll. 2007](#)).

L'absence d'effet du chocolat blanc sur la FMD corrobore les résultats de plusieurs études qui ne trouvent pas de différence de FMD après ingestion de chocolat blanc ([Grassi et coll. 2005](#); [Hermann et coll. 2006](#); [Shiina et coll. 2009](#)). Néanmoins, au vu de la p value égale à 0,051 pour la FMD, nous pourrions penser qu'il tend à réduire la vasodilatation d'origine endothéliale. En effet, le chocolat blanc est complètement exempt d'antioxydants et contient une part non négligeable de sucre et de corps gras. Et il fut démontré que l'hyperglycémie réduisait la fonction endothéliale, augmentait l'onde de réflexion, la pression artérielle et l'endothéline-1 ([Grassi et coll. 2012](#)). Ces phénomènes restent observés 1h et 2h après l'ingestion de chocolat blanc suite à un test de tolérance au glucose alors que la diminution de la fonction endothéliale suite à l'hyperglycémie est prévenue par l'ingestion de chocolat noir ([Grassi et coll. 2012](#)). Flammer et coll. ([Flammer et coll. 2007](#)) observent que la vasodilatation coronarienne ne change pas après l'ingestion de barres de chocolat blanc mais celles-ci avaient été fabriquées dans le but d'être le contrôle du chocolat noir et donc contenaient la même quantité de graisse et de carbohydrates que le chocolat noir donné. Les effets du chocolat blanc commercialisé ne sont donc pas démontrés dans cette étude. Même si d'autres expériences seront nécessaires pour connaître les effets du chocolat blanc à long terme, d'après nos résultats, il ne produit pas d'effets délétères dans les trois heures suivant son ingestion.

Le chocolat noir quant à lui, a plutôt un effet bénéfique sur la fonction vasculaire avec un pic à 2h qui montre une augmentation significative de la FMD par rapport aux valeurs avant la prise de chocolat noir. Cette augmentation aigue de FMD après ingestion de cacao/chocolat a été rapportée sur différentes populations telles que des sujets jeunes sains ([Schroeter et coll. 2006](#); [Vlachopoulos et coll. 2005](#)), des personnes âgées

([Monahan et coll. 2011](#)), des fumeurs ([Heiss et coll. 2007](#); [Heiss et coll. 2005](#); [Hermann et coll. 2006](#)), des sujets obèses ([Berry et coll. 2010](#); [Faridi et coll. 2008](#)) des patients coronariens ([Heiss et coll. 2003](#)) ou encore diabétiques ([Balzer et coll. 2008](#))

Le pic de FMD à 2h est confirmé par différents auteurs après ingestion de cacao. En effet, Baba et coll. ([Baba et coll. 2000](#)) trouvent des niveaux maximaux d'épicatechines plasmatiques 2h après ingestion de chocolat et Heiss et coll. ([Heiss et coll. 2005](#)) trouvent une augmentation de la FMD 2h après ingestion d'une boisson riche en flavonoïdes. Cette observation est confirmée par Balzer et coll. ([Balzer et coll. 2008](#)) qui observent également un pic de FMD 120 minutes après ingestion d'une boisson contenant du cacao. L'évolution ne montre pas de plateau, ce qui sous-entend que dans un but préventif pour nos plongeurs, la prise d'antioxydants devrait se faire autour des 90 minutes avant la plongée afin que l'effet du chocolat soit maximal pendant la plongée qui dure à peu près 30 minutes.

Concernant la quantité de chocolat ingérée, l'augmentation de FMD apportée dans la littérature est dose-dépendante ([Balzer et coll. 2008](#); [Heiss et coll. 2007](#); [Monahan et coll. 2011](#)). La quantité minimale de cacao nécessaire pour observer une augmentation de FMD semble devoir être supérieure à 2g et au plus 5g ([Monahan et coll. 2011](#)). Dans notre étude, nous avons donné à nos sujets 30g de chocolat noir contenant 86% de cacao. Ceci nous amène donc à une quantité bien au-delà des valeurs minimales observées. De plus amples expériences seraient nécessaires pour voir si une dose de chocolat équivalente à 5g de cacao, c'est à dire 5,8g de chocolat noir à 86% de cacao présente également une augmentation de FMD.

Dans la littérature, beaucoup d'auteurs rapportent les effets cardio-protecteurs du chocolat noir mais les mécanismes sous-jacents sont multiples. En effet, en aigu, le chocolat a des effets antioxydants ([Waterhouse et coll. 1996](#)) et anti-plaquettaires ([Holt et coll. 2002](#)) alors qu'en chronique, les auteurs attribuent ses bienfaits à une diminution de la pression artérielle ([Buijsse et coll. 2006](#)), à des propriétés anti-inflammatoires ([Monagas et coll. 2009](#)), à une action sur les lipides sanguins ([Baba et coll. 2007](#)) ou encore à une augmentation de la santé vasculaire ([Heiss et coll. 2003](#)). Les avis sur les mécanismes d'action des antioxydants sur la fonction vasculaire ne sont donc pas unanimes mais les explications tournent autour du concept que le cacao et/ou chocolat augmente la disponibilité du NO. Car (1) le chocolat/cacao augmente le nombre de métabolites circulants du NO ([Heiss et coll. 2003](#); [Heiss et coll. 2005](#); [Taubert et coll.](#)

[2007](#)), (2) l'augmentation de FMD après ingestion de flavonoïdes est compromise par l'inhibition de la NO synthétase (eNOS) ([Fisher et coll. 2003](#); [Heiss et coll. 2005](#)), (3) les flavonoïdes in vitro augmentent l'activité de l'eNOS ([Leikert et coll. 2002](#); [Ramirez-Sanchez et coll. 2010](#)), ce qui permet une meilleure conversion de la L-arginine en NO, (4) le cacao réduit l'activité de l'arginase vasculaire ([Schnorr et coll. 2008](#)) qui hydrolyse l'arginine en ornithine et urée, laissant dès lors une plus grande quantité d'arginine disponible comme substrat pour produire du NO par l'eNOS, (5) en présence de nourriture riche en flavonoïdes, l'activité de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I en angiotensine II responsable de la vasoconstriction est inhibée ([Actis-Goretta et coll. 2006](#)) et enfin (6) les réponses vasculaires à l'administration orale de nitroglycérine ne sont pas altérées par le chocolat/cacao ([Balzer et coll. 2008](#); [Heiss et coll. 2007](#); [Monahan et coll. 2011](#); [Vlachopoulos et coll. 2005](#)), ce qui prouve bien que l'augmentation de la FMD suite à la prise de chocolat n'est pas due à une augmentation de la réactivité du muscle lisse vasculaire. Toutes ces observations tendent à laisser croire que l'action des flavonoïdes sur la fonction endothéliale passe très probablement par la voie du NO. Dans une étude ultérieure, il serait donc intéressant de voir si les antioxydants du chocolat noir sont capables d'augmenter la FMD après une plongée à l'air ou en apnée.

Dans cette étude, les résultats de la rigidité artérielle ne présentent pas d'évolution, ni dans le groupe chocolat blanc, ni dans le groupe chocolat noir. Ceci va une fois de plus dans le même sens que les données récoltées lors des études des 2 chapitres précédents. La fonction endothéliale des grosses artères est plus réactive que celle des artères périphériques. Cette observation a également été rapportée par Cornelissen et coll. ([Cornelissen et coll. 2012](#)). Par contre, ces résultats ne coïncident pas avec ceux de Fisher et coll. ([Fisher et coll. 2003](#)) qui rapportent une meilleure vasodilatation post-ischémique évaluée par l'amplitude de l'onde de pouls digital après ingestion de cacao riche en flavonols sur une durée de 5 jours. Néanmoins, la PORH et la rigidité artérielle mesurées par photopléthysmographie digitale sont deux mesures différentes de l'endothélium périphérique. De plus, Fisher ([Fisher et coll. 2003](#)) travaille sur 5 jours alors que notre étude observe les effets du chocolat noir à court terme. La rigidité des troncs artériels comporte des modifications complexes de l'organisation structurale des différents composants de la paroi artérielle ([Zieman et coll. 2005](#)), qui conduisent à la

réduction de sa distensibilité et ceci ne peut pas se voir en aigu. Les modifications aiguës du tonus vasculaire dépendent principalement de l'endothélium (par la voie du NO) et non de la structure de la paroi vasculaire. La quantité de flavonoïdes contenus dans notre chocolat était peut-être également insuffisante pour montrer des résultats significatifs.

5.5. CONCLUSION

Le chocolat noir comprenant 86% de cacao peut améliorer la fonction endothéliale alors que le chocolat blanc n'a aucun effet à court terme sur la santé vasculaire de l'homme sain. De plus, les données temporelles montrent que l'effet maximal du chocolat noir se retrouve 120 minutes après son ingestion.

Chapitre 6 - LE CHOCOLAT NOIR PREVIENT LA DYSFONCTION ENDOTHELIALE APRES UNE PLONGEE A L'AIR

6.1. OBJECTIFS

Le but de cette étude est d'observer les effets de l'ingestion de 30g de chocolat noir avant une plongée à l'air étant donné qu'il a la capacité d'augmenter la FMD d'un sujet sain.

6.2. PROTOCOLE

6.2.1. POPULATION ÉTUDIÉE

Quarante-deux plongeurs masculins volontaires ont été divisés en 2 groupes de 21 sujets. La signature du consentement éclairé a été demandée et une visite médicale fut effectuée par un médecin hyperbare avant de commencer les expérimentations. Les sujets devaient être aptes à la plongée en scaphandre autonome et aucun sujet ne pouvait présenter d'antécédent d'accident de décompression, d'anomalie cardiovasculaire ni être sous médication cardio-active. Il fut demandé à tous les participants de ne pas faire d'exercice intense durant les 48h précédant les tests ainsi que de ne pas ajouter d'aliments riches en nitrates à leurs repas.

6.2.2. PROFIL DES PLONGÉES ET MESURES

La FMD maximale fut observée 2h après l'ingestion de chocolat noir. Dès lors, 30g de chocolat noir contenant 86 % de cacao a été offert à tous les sujets du « groupe chocolat » 90 minutes avant la plongée. Celle-ci était une plongée à 33 mètres de profondeur durant 20 minutes sans palier de décompression dans une piscine calme spécialisée pour la plongée sub-aquatique (Némo 33, Bruxelles, Belgique). La température de l'eau y était de 33°C et celle de l'air de 29°C.

La FMD, la rigidité artérielle, les concentrations plasmatiques en NO et en peroxynitrites furent mesurés avant et après la plongée pour chacun des 2 groupes.

6.3. RESULTATS

6.3.1. DIAMÈTRES DE L'ARTÈRE BRACHIALE ET DILATATION FLUX-DÉPENDANTE

Une augmentation du diamètre pré-occlusion de l'artère brachiale est observée après la plongée pour le groupe contrôle (104,5 +/- 9,31 % des valeurs avant plongée ; $p < 0,05$) alors que celui-ci ne varie pas dans le groupe chocolat (98,88 +/- 2,89% des valeurs avant plongée ; $p > 0,05$). La FMD quant à elle est significativement réduite après une plongée standard alors qu'elle se voit être significativement augmentée après une plongée avec une prise préalable de chocolat noir (respectivement 90,87 +/- 6,7% des valeurs avant plongée ; $p < 0,001$ versus 105,1 +/- 4,49% des valeurs avant plongée ; $p < 0,001$).

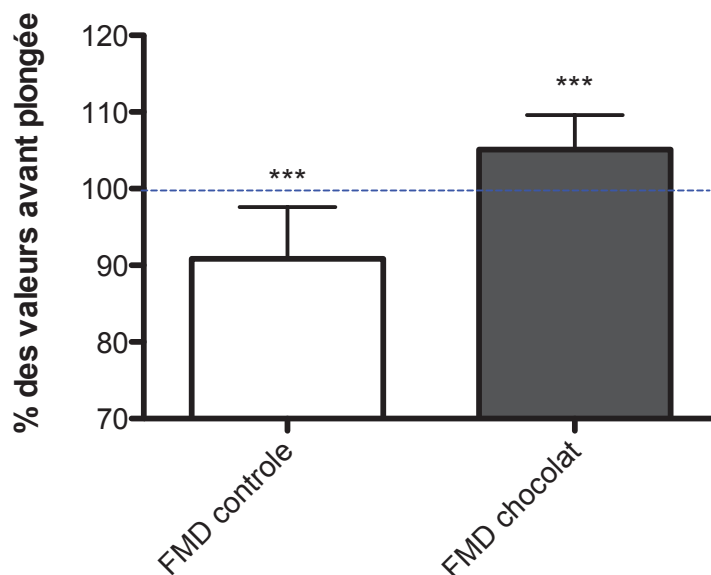


FIGURE 13 - EVOLUTION DE LA DILATATION FLUX-DEPENDANTE (FMD) APRES UNE PLONGEE CONTROLE DE 20 MINUTES A 33 METRES ET DE LA MEME PLONGEE PRECEDEE D'UN SUPPLEMENT DE 30G DE CHOCOLAT NOIR 1H30 AVANT LA PLONGEE.

*Les résultats sont présentés en pourcentage des valeurs avant plongée (*** $P < 0,001$).*

6.3.2. RIGIDITÉ ARTÉRIELLE

Au niveau périphérique, nous ne retrouvons aucune variation entre les valeurs avant et après plongée pour les deux groupes concernant le peak-to-peak time (PPT) (105,9 +/- 14,66% des valeurs avant plongée pour le groupe contrôle et 102,3 +/- 10,69% pour le groupe chocolat ; $p > 0,05$). Aucune variation non plus n'est observée pour l'index de

rigidité artérielle SI ($96,32 \pm 14,6\%$ des valeurs avant plongées après une plongée standard et $98,89 \pm 11,32\%$ après ingestion de chocolat noir ; $p>0,05$).

6.3.3. MONOXYDE D'AZOTE CIRCULANT ET PEROXYNITRITES PLASMATIQUES

Aucune variation des concentrations en monoxyde d'azote circulant n'est observée après une plongée standard ($102,6 \pm 18,06\%$ des valeurs avant plongée ; $p>0,05$) alors qu'une augmentation significative se retrouve après une plongée avec prise préalable de chocolat noir ($154,4 \pm 72,92\%$ des valeurs avant plongée ; $p<0,05$).

Concernant les marqueurs de stress oxydant, une diminution significative des concentrations plasmatiques en peroxydnitrites est observée après une plongée standard ($84,25 \pm 12,44\%$ des valeurs avant plongée ; $p<0,01$) alors qu'aucune variation des ONOO- se retrouve pour le groupe chocolat ($100,1 \pm 27,83\%$ des valeurs avant plongée ; $p>0,05$).

Les valeurs absolues des différents paramètres cités ci-dessus sont reprises dans la table 5.

Contrôle	Avant plongée		Après plongée		t test	n
	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type		
Diamètre brachial avant occlusion (mm)	4,8	0,6	5,0	0,5	ns ($p=0,06$)	21
Dilatation flux-dépendante (%)	110,4	10,6	99,9	7,1	***	21
Peak-to-Peak Time (PPT) (ms)	199,1	40,0	210,2	48,2	ns	21
Index de rigidité artérielle (SI) (m/s)	9,3	1,8	8,9	2,1	ns	21
Monoxyde d'azote (NO) (μM)	1,35	0,87	1,38	0,85	ns	10
Peroxydnitrites (ONOO-) (μM)	187,5	42,7	159,8	50,6	**	10

Chocolat noir	Avant plongée		Après plongée		t test	n
	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type		
Diamètre brachial avant occlusion (mm)	4,9	0,5	4,8	0,5	ns	21
Dilatation flux-dépendante (%)	107,2	4,0	112,6	4,9	***	21
Peak-to-Peak Time (PPT) (ms)	197,9	27,3	201,2	26,7	ns	21
Index de rigidité artérielle (SI) (m/s)	9,1	1,2	8,9	1,2	ns	21
Monoxyde d'azote (NO) (μM)	1,52	0,89	1,95	0,73	*	10
Peroxydnitrites (ONOO-) (μM)	192,3	48,4	190,0	59,5	ns	10

TABLEAU 5 – RESULTATS EN VALEURS ABSOLUES DES DIAMETRES PRE-OCCLUSION DE L'ARTERE BRACHIALE, DE LA DILATATION FLUX-DEPENDANTE, DES PARAMETRES PHOTOPLETHYSMOGRAPHIQUES ET SANGUINS AVANT ET APRES UNE PLONGEE DE 20 MINUTES A 33 METRES POUR LE GROUPE CONTROLE ET LE GROUPE CHOCOLAT

*Le t test de Student compare pour chaque groupe les valeurs avant et après plongée (ns $p>0,05$; * $p<0,05$; ** $p<0,01$ et *** $p<0,001$).*

6.4. DISCUSSION

Afin d'éviter les mécanismes physiologiques relatifs au froid, les expériences ont été effectuées dans des conditions thermiquement neutres, c'est-à-dire dans une eau à 33°C. L'hyperoxie associée à la plongée à l'air réduit le taux de tetrahydrobiopterine (BH₄) ([Fismen et coll. 2013](#)), co-facteur essentiel à l'activité de l'eNOS entraînant un découplage de l'enzyme qui produira alors des anions superoxydes à la place du NO. Les résultats du NO dans le groupe contrôle ne montrent pas d'évolution, ceci implique que sa production n'est pas modifiée. Il n'est donc ni plus ni moins produit par l'eNOS, ni plus ni moins éliminé par une éventuelle transformation en peroxynitrites. Parallèlement, d'autres études confirment que la plongée à l'air ne modifie pas le NO ([Marinovic et coll. 2012](#)). Ce sont également les résultats que nous avons obtenus dans le chapitre 3.

La réduction de peroxynitrites fait penser qu'il y a moins de stress oxydant après la plongée à l'air. Ces résultats sont en opposition avec ce qui est rapporté dans la littérature ([Obad et coll. 2010](#); [Vince et coll. 2009](#)). Les ONOO⁻ étant le résultat de la combinaison du NO avec les anions superoxydes (O₂⁻) et la quantité de NO n'étant pas modifiée, le taux de ce dernier n'est peut-être pas suffisant pour produire des ONOO⁻. De plus, la plongée active les systèmes antioxydants ([Ferrer et coll. 2007](#); [Sureda et coll. 2012](#)) qui peuvent peut-être les avoir éliminés en partie. La FMD réduite malgré que la quantité de NO n'ait pas été modifiée laisse penser que d'autres acteurs peuvent entrer en jeu comme éventuellement le système nerveux autonome ([Gole et coll. 2011](#)), une adaptation cardio-vasculaire ([Boussuges et coll. 2006](#)) et/ou une atteinte du muscle lisse ([Lambrechts et coll. 2013](#)).

Du côté du groupe chocolat, l'hypothèse émise est que la prise d'antioxydants a réduit la quantité disponible de radicaux libres dans le sang, anions superoxydes inclus. Ceci aurait comme conséquence un taux de BH₄ plus élevé et une activité enzymatique de l'eNOS plus grande. La production de NO s'en verrait dès lors augmentée. Celui-ci voudrait réagir avec les anions O₂⁻ pour former des peroxynitrites mais la quantité d'O₂⁻ étant réduite par les antioxydants du chocolat, celle des ONOO⁻ ne pourrait pas augmenter de manière significative. C'est pourquoi nous trouvons un taux de peroxynitrites non modifié.

Nous pouvons observer que la FMD est belle et bien augmentée par la prise de chocolat noir. Ceci signifie que les antioxydants sont capables de prévenir la dysfonction endothéliale observée après une plongée à l'air. L'augmentation de la quantité de NO après la plongée dans le groupe chocolat va de pair avec l'augmentation de la FMD, NO dépendante.

Au niveau périphérique, aucune différence de l'index de rigidité artérielle (SI) n'a été observée pour les 2 groupes. Etant donné la quantité de NO circulant et la FMD augmentées après la plongée, nous aurions pu nous attendre à une réduction de l'index de rigidité artérielle périphérique. Néanmoins, ces résultats corroborent ceux de Cornelissen et coll. qui observent une augmentation de la fonction endothéliale après un entraînement cardio-vasculaire lorsqu'elle est mesurée par la FMD mais pas par la mesure de l'onde de pouls par tonométrie ([Cornelissen et coll. 2012](#)).

6.5. CONCLUSION

La dysfonction endothéliale associée à la plongée semble être évitée par l'ingestion d'une quantité modérée de chocolat noir. La réduction de FMD alors que le NO n'est pas modifié pourrait être due à une activité du système nerveux autonome, à une adaptation cardiovasculaire et/ou à une atteinte du muscle lisse. Avec addition d'antioxydants, les taux de BH₄ sont plus élevés, activant la production de NO par l'eNOS. La FMD est donc plus importante.

Chapitre 7 - LE CHOCOLAT NOIR PREVIENT LA DYSFONCTION ENDOTHELIALE APRES LA PLONGEE EN APNEE

L'article publié dans l'*European Journal of Applied Physiology* se trouve en Annexe 3.

Theunissen S, Schumacker J, Guerrero F, Tillmans F, Boutros A, Lambrechts K, Mazur A, Pieri M, Germonpré P, Balestra C. (2013). Dark chocolate reduces endothelial dysfunction after successive breath-hold dives in cool water. *Eur J Appl Physiol*. 2013. Sep 28.

7.1. OBJECTIFS

Le but de cette étude fut d'observer les effets du chocolat noir sur la plongée en apnée par la mesure de la dilatation flux-dépendante (FMD) et de l'index de rigidité artérielle (SI).

7.2. PROTOCOLE

7.2.1. POPULATION ÉTUDIÉE

Vingt plongeurs en apnée ont participé bénévolement dans l'étude. Ils devaient être capables de plonger facilement à 20m en apnée, non-fumeurs en bonne santé et en bonne condition physique. Ils ont été divisés en un groupe contrôle (8 hommes et 2 femmes) et un groupe chocolat (9 hommes et 1 femme). Chaque groupe comptait 10 plongeurs en apnée.

7.2.2. PROFIL DES PLONGÉES ET MESURES

Les plongeurs en apnée ont réalisé une série de plongées successives à 20m de profondeur jusqu'à atteindre un temps total d'immersion de 20 minutes dans une piscine calme adaptée à la plongée en apnée (Conflans-Ste-Honorine - Paris, France). La température de l'air était de 30°C et celle de l'eau de 27°C. Les plongeurs étaient en maillot de bain. Le groupe chocolat a réalisé les mêmes plongées dans les mêmes conditions 1h après l'ingestion de 30g de chocolat noir (86% de cacao). La dilatation flux-dépendante (FMD) et photoplétysmographie digitale ont été mesurées avant et après chaque série de plongées successives en apnée. Tous les participants ont été invités à ne pas pratiquer d'exercice physique intense 48h avant l'étude et à ne pas plonger durant les 72 heures précédant les expériences. Le dernier repas devait être

« normal » : ni trop gras ni trop léger, en évitant les aliments riches en nitrates (Engan, 2012).

Les mesures effectuées comprennent l'évaluation de la fonction endothéliale par FMD et photopléthysmographie ainsi qu'une analyse du monoxyde d'azote (NO) et des peroxynitrites (ONOO-) sanguins.

7.3. RESULTATS

Aucune différence significative n'a été observée entre les deux groupes. Il a été demandé aux plongeurs en apnée de réaliser une série de plongées successives jusqu'à un temps total d'immersion de 20 minutes. Le nombre moyen de répétition était de 10 ± 2 plongées dans le groupe contrôle avec un temps d'immersion moyen de $19,57 \pm 2,41$ minutes et de 9 ± 2 répétitions avec une moyenne de $18,53 \pm 3,5$ minutes d'immersion pour le groupe chocolat. Le temps moyen de récupération entre les apnées était de $4,55 \pm 1,19$ min. Les apnéistes ont réalisé leurs plongées en paires de telle sorte que chaque plongeur garantissait la sécurité de l'autre. La variation du temps de récupération est dès lors compréhensible. Tous les plongeurs ont terminé l'étude et aucun n'a présenté de symptômes d'accident de décompression.

7.3.1. DIAMÈTRES DE L'ARTÈRE BRACHIALE ET DILATATION FLUX-DÉPENDANTE

Aucune augmentation du diamètre pré-occlusion de l'artère brachiale n'est observée après la plongée, ni pour le groupe contrôle ($102,1 \pm 5,5$ % des valeurs avant plongée ; $p > 0,05$), ni pour le groupe chocolat ($99,9 \pm 1,5$ % des valeurs avant plongée ; $p > 0,05$).

Par contre, une diminution de la FMD a été observée dans le groupe contrôle entre pré- et post-plongée ($95,3 \pm 2,9$ % des valeurs avant plongée ; $p = 0,0006$) alors que la FMD augmente dans le groupe chocolat ($104,1 \pm 2,9$ % des valeurs pré-plongée ; $p = 0,0017$).

Les résultats de la FMD sont présentés dans la figure 14.

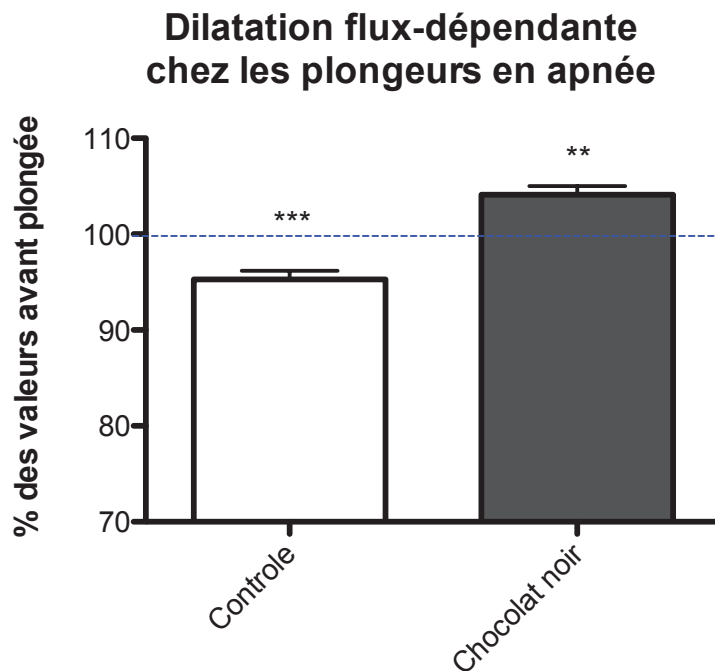


FIGURE 14 - EVOLUTION DE LA DILATATION FLUX-DEPENDANTE (FMD) APRES UNE SERIE DE PLONGEES SUCCESSIVES EN APNEE A 20 METRES TOTALISANT UN TEMPS CUMULE D'APNEE DE 20 MINUTES ET APRES LA MEME SERIE DE PLONGEES SUCCESSIVES PRECEDEE D'UN SUPPLEMENT DE 30G DE CHOCOLAT NOIR 1H AVANT LA PLONGEE.

*Les résultats sont présentés en pourcentage des valeurs avant plongée (** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$).*

7.3.2. PHOTOPLETHYSMOGRAPHIE DIGITALE

Au niveau périphérique, nous ne retrouvons aucune variation entre les valeurs avant et après plongée pour les deux groupes concernant le peak-to-peak time ($100,8 \pm 21,5$ % des valeurs avant plongée ; $p > 0,05$ pour le groupe contrôle et $108,7 \pm 25,1$ % ; $p > 0,05$ pour le groupe chocolat). Aucune variation non plus n'est observée pour l'index de rigidité artérielle SI ($103,1 \pm 20,9$ % des valeurs avant apnée ; $p > 0,05$ après une série de plongées successives et $96,2 \pm 20,6$ % ; $p > 0,05$ après la plongée avec ingestion de chocolat noir).

7.3.3. MONOXYDE D'AZOTE CIRCULANT ET PEROXYNITRITES

Une diminution du monoxyde d'azote circulant est observé après une série de plongées successives à 20 mètres cumulant un total d'apnée de 20 minutes ($86,8 \pm 15,6$ % des valeurs avant plongée ; $p < 0,05$) alors qu'aucune variation du monoxyde d'azote n'est

observée après la série de plongées successive avec prise préalable de chocolat noir (98,4 +/- 31,9 % des valeurs avant plongée ; $p>0,05$).

Concernant les marqueurs de stress oxydant, aucune variation des peroxy-nitrites n'est observée, ni pour le groupe contrôle (112,8 +/- 40,1 % des valeurs avant plongée ; $p>0,05$) ni pour le groupe chocolat (105,1 +/- 34,6 % des valeurs avant plongée ; $p>0,05$).

Les valeurs absolues des différents paramètres cités ci-dessus sont reprises dans le tableau 5.

Contrôle n=10	Avant plongée		Après plongée		t test
	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type	
Diamètre brachial avant occlusion (mm)	4,4	0,7	4,4	0,6	ns
Dilatation flux-dépendante (%)	113,9	4,3	108,5	5,2	***
Peak-to-Peak Time (PPT) (ms)	177,6	50,8	177,1	53,7	ns
Index de rigidité artérielle (SI) (m/s)	10,8	3	11,1	3,8	ns
Monoxyde d'azote (NO) (μ M)	8,4	4	7,6	4,6	*
Peroxy-nitrites (ONOO-) (μ M)	23,8	6,5	25,7	6,2	ns

Chocolat noir n=10	Avant plongée		Après plongée		t test
	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type	
Diamètre brachial avant occlusion (mm)	4,6	0,4	4,6	0,4	ns
Dilatation flux-dépendante (%)	112,7	6,6	117,3	6,6	**
Peak-to-Peak Time (PPT) (ms)	192,5	39,4	204,4	40,7	ns
Index de rigidité artérielle (SI) (m/s)	9,7	2,1	9,1	2,1	ns
Monoxyde d'azote (NO) (μ M)	10,5	4,5	10,1	4,5	ns
Peroxy-nitrites (ONOO-) (μ M)	22,7	7,8	23,4	8,4	ns

TABLEAU 6 - RESULTATS EN VALEURS ABSOLUES DES DIAMETRES PRE-OCCLUSION DE L'ARTERE BRACHIALE, DE LA DILATATION FLUX-DEPENDANTE, DES PARAMETRES PHOTOPLETHYSMOGRAPHIQUES ET SANGUINS AVANT ET APRES UNE SERIE DE PLONGEES SUCCESSIVES EN APNEE A 20 METRES CUMULANT UN TEMPS TOTAL D'APNEE DE 20 MINUTES POUR LE GROUPE CONTROLE ET LE GROUPE CHOCOLAT

*Le t test de Student compare pour chaque groupe les valeurs avant et après plongée (ns $p>0,05$; * $p<0,05$; ** $p<0,01$ et *** $p<0,001$).*

7.4. DISCUSSION

Afin d'arriver à un temps d'apnée total de 20 minutes chacun, les plongeurs ayant participé à cette étude sont restés environ une heure quasiment immobiles dans une eau à 27°C. Ces conditions ont amené la plupart de nos plongeurs à avoir froid. Au vu de nos résultats, il est possible que l'on retrouve les mêmes mécanismes que dans les études précédentes (chapitre 3 et 4) mais le froid pourrait avoir influencé les données relatives

au NO à la baisse. En effet, les études précédentes étaient dans des conditions thermiquement neutres, ce qui n'est pas le cas dans cette étude-ci.

Pour rappel, la plongée en apnée comporte 3 phases : D'abord, une phase de descente où les plongeurs doivent fournir un effort pour descendre durant les premiers mètres. Ensuite, une phase d'hyperoxie à 20 mètres de profondeur, due à l'augmentation de la PO₂. Cette phase est rapidement suivie d'une hypoxie hypercapnique due à la consommation de l'oxygène (O₂), consommation qui induit donc une production de dioxyde de carbone (CO₂). Enfin, le retour à la surface, où les plongeurs doivent exercer un effort physique jusqu'à ce qu'ils retrouvent leur flottabilité neutre. Durant cette phase, l'hypoxie hypercapnique augmente avec la diminution de pression.

Rappelons également que l'activation de l'eNOS pour former du NO est médiée par la protéine kinase Akt ([Lehoux et coll. 2004](#)), elle-même phosphorylée par la phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) ([Dimmeler et coll. 1998](#)). Le NO ainsi produit par l'eNOS active la guanylate cyclase soluble (sGC), enzyme catalysant la formation de cGMP, second messenger de la relaxation vasculaire ([Pellegrin et coll. 2009](#)). Les études précédentes (chapitres 3 et 4) ont montré une augmentation de la production de NO durant l'apnée. Nous avons associé cette augmentation à l'exercice cardio-vasculaire effectué durant ce type de plongée. Il est en effet connu que l'exercice physique augmente la production de NO ([Pellegrin et coll. 2009](#); [Wang et coll. 1993](#)) et que, sous des conditions normales, l'entraînement physique améliore la fonction endothéliale ([Pellegrin et coll. 2009](#)), ce qui est directement lié à une augmentation de la biodisponibilité du NO dans les muscles lisses ([de Moraes et coll. 2008](#)).

Ce phénomène n'a pas été retrouvé dans cette étude-ci : au contraire, nous constatons une diminution du taux de NO dans le groupe contrôle. Nous avançons l'hypothèse que la production de NO induite par l'exercice a été contrebalancée par plusieurs facteurs dont le plus important aurait été le froid :

(1) Malgré l'augmentation de la production de NO, **l'exercice** produit également un stress oxydant ([Davies et coll. 1982](#); [Duthie et coll. 1990](#)). Or, un plus grand stress oxydant augmente le taux **d'anions superoxydes**. Ces derniers interagissent rapidement avec le NO pour former du ONOO-, réduisant ainsi la disponibilité du NO

dans les muscles lisses vasculaires. Dans le chapitre 4, nous avons déjà mis en évidence la présence de stress oxydant après plongée en apnée.

(2) L'**hyperoxie** amenée durant la phase de descente de la plongée en apnée engendre une augmentation du taux de **production de l'O₂⁻**. Celui-ci est converti en H₂O₂, ou réagit avec le NO pour former du ONOO⁻ ([Jamieson et coll. 1986](#); [Sureda et coll. 2009](#)), amenant de par ce phénomène un stress oxydant et diminuant la biodisponibilité du NO ([Demchenko et coll. 2002](#)). L'hypothèse selon laquelle l'augmentation de PO₂ favorise le stress oxydant, et donc la dysfonction endothéliale, est généralement acceptée ([Demchenko et coll. 2000](#)). L'hyperoxie est également associée à une **diminution du taux de tétrahydrobiopterine (BH₄)**, un cofacteur majeur de eNOS. Ceci induit une diminution de l'activité de l'eNOS et une libération moins grande de NO ([Fisamen et coll. 2013](#); [Forstermann 2010](#); [Ilan et coll. 2005](#)). Cette production réduite de NO est observée par une diminution de la vasodilatation signée par la réduction de FMD. L'épuisement de la BH₄ dans les cellules endothéliales exposées à un stress oxydant peut engendrer une production d'O₂⁻ par l'eNOS plutôt que de NO. Ce phénomène est appelé découplage de l'eNOS ([Vasquez-Vivar et coll. 1998](#)).

(3) L'**hypoxie** augmente à la fois l'expression et l'activité de la **Rho-kinase** ([Takemoto et coll. 2002](#)). Or, la Rho-kinase facilite la régulation négative de l'expression de l'eNOS induite par l'hypoxie ([Takemoto et coll. 2002](#)), réduisant ainsi la disponibilité endothéliale du NO. De plus, l'hypoxie augmente les taux d'ET-1 ([Pisarcik et coll. 2013](#)) jouant un rôle sur l'inhibition de l'eNOS via l'activation de la Rho-kinase.

L'exercice et/ou, du moins partiellement, l'hyperoxie intermittente et l'hypoxie subséquente ([McQuillan et coll. 1994](#)) pendant la plongée pourraient expliquer la diminution de la réponse endothéliale car ils mènent tous à une réduction de la biodisponibilité du NO. L'augmentation de la PO₂ pendant l'immersion en apnée est très courte, néanmoins il a été montré que même de courtes situations hyperoxiques ([Balestra et coll. 2006](#)) ou hypoxiques ([de Bruijn et coll. 2008](#)) engendraient des réponses physiologiques.

(4) Le **froid** pourrait aussi intervenir dans la diminution du taux de NO circulant. En effet, l'exposition au froid active le système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA), qui, à son tour, supprime l'expression de l'eNOS et diminue la formation de NO ([Sun](#)

[2011](#)). Le SRAA régule également l'augmentation de la production **d'endothéline-1 (ET-1)** due au froid ([Sun 2011](#)). Or, l'ET-1, ainsi que l'angiotensine II, augmentent le taux de Rho ([Budzyn et coll. 2005](#)). L'augmentation d'ET-1 engendre une **activation de la Rho-kinase** entraînant également, par inactivation de la PI3K, une diminution de l'activité de l'eNOS et donc de la production de NO ([Budzyn et coll. 2005](#)).

Bailey 2005 et Dubraca 2005 montrent également une augmentation de l'activité de la Rho-kinase quand les vaisseaux sont exposés à un stress physiologique particulier, tel qu'un changement dans le statut redox ([Bailey et coll. 2005](#); [Dubroca et coll. 2005](#); [Thompson-Torgerson et coll. 2007](#)).

Les études des chapitres précédents présentent une augmentation du NO circulant après une série de plongées successives en apnée. Or, les conditions de plongées, à l'exception de la température de l'eau, étaient équivalentes à celles effectuée dans cette étude. De fait, le stress oxydant, l'hyperoxie et l'hypoxie sont des paramètres en défaveur de la biodisponibilité du NO liés à la plongée en apnée et déjà retrouvés dans les études précédentes. Nous pourrions donc considérer qu'ici, la diminution du taux de NO circulant dans le groupe contrôle est principalement due au froid. L'augmentation de la production de NO liée à l'exercice ne serait ici pas assez importante pour compenser l'effet combiné du stress oxydant, de l'hyperoxie de début de plongée, de l'hypoxie de fin de plongée et du froid.

Dans cette étude, nos résultats ne montrent pas de modification du taux des ONOO⁻. Les peroxynitrites provenant de la combinaison du NO avec les O₂⁻, si une diminution du taux de NO est observée, la réaction formant du ONOO⁻ s'en trouve diminuée. Ceci pourrait donc expliquer la stabilité du taux de ONOO⁻ malgré une augmentation du stress oxydant mais remet en cause l'utilisation du taux de peroxynitrites comme marqueur de stress oxydant. En effet, d'autres marqueurs ont montré une évolution après la plongée en apnée, tel qu'une augmentation des TBARS ([Joulia et coll. 2002](#)), ou de l'activité de la superoxyde dismutase et de la glutathione peroxydase ([Rousseau et coll. 2006](#)).

Dans le groupe chocolat, les taux de NO et de ONOO⁻ restent constants avant et après plongée. La prise de chocolat exerce des effets antioxydants sur les cellules endothéliales en réduisant, d'une part, l'expression et l'activité de la NADPH oxydase et, d'autre part,

en diminuant le stress oxydant ([Andriantsitohaina et coll. 2012](#)), limitant ainsi la quantité disponible de radicaux libres dans le sang, anions superoxydes inclus. Le chocolat contient des flavonoïdes qui sont en effet associés à une diminution directe de la NADPH oxydase (source de $O_2^{\cdot-}$), à une diminution de l'activité du SRAA (système activant la NADPH oxydase) et à une augmentation de l'expression des enzymes antioxydantes et du taux de PI3K (intervenant dans l'activation de l'eNOS) ([Andriantsitohaina et coll. 2012](#)).

Ceci a comme conséquence un taux de BH_4 et de PI3K élevé et une activité enzymatique de l'eNOS plus importante. Cependant les plongeurs ont eu froid, ce qui a engendré les mécanismes déjà décrits ci-dessus pour le groupe contrôle, diminuant l'activité et l'expression de l'eNOS. L'effet combiné de l'exercice associé à la prise d'antioxydants aurait donc engendré une augmentation de l'activité et de l'expression de l'eNOS. Mais cette augmentation semble, d'après nos résultats, avoir été contrée par l'hyperoxie, l'hypoxie et le froid, diminuant tous trois l'activité de cette enzyme. Etant donné que le taux de NO est stable et que la prise d'antioxydants a réduit la quantité d'anions superoxydes présents dans le sang, l'équilibre de la réaction formant les ONOO $^-$ n'a pas été perturbé, expliquant ainsi que le taux de ONOO $^-$ soit resté stable.

Dans cette étude, des signes de dysfonction endothéliale, indiqués par une réduction de la FMD, ont été trouvés dans le groupe contrôle après une série de plongées successives en apnée, alors qu'une augmentation significative de cette même FMD a été trouvée dans le groupe chocolat.

Dans le groupe contrôle, la réduction de la FMD corrobore les résultats obtenus précédemment (chapitres 3 et 4). La diminution de la FMD semble confirmer que la plongée en apnée a une influence sur la fonction endothéliale et pourrait être partiellement expliquée par la diminution de la biodisponibilité du NO.

En revanche, le groupe chocolat a présenté une augmentation de FMD, également sans modification des marqueurs de stress oxydant. Ceci pourrait être expliqué par la prise de chocolat noir, antioxydant. Cependant, l'augmentation de la FMD alors que le taux de NO n'a pas été modifié, ce qui laisse supposer que cette dernière est due à un autre facteur que la voie NO-cGMP. La plongée en apnée est en effet accompagnée d'un changement dans les activités sympa- et parasympathiques ([Foster et coll. 2005](#)). Dans

notre étude, cependant, les diamètres pré-occlusion ne sont pas modifiés, ni dans le groupe contrôle, ni chez les plongeurs ayant mangé du chocolat. Nous pourrions donc penser que le système nerveux autonome n'est pas le facteur majeur responsable de l'augmentation de la FMD chez les plongeurs ayant été supplémentés en chocolat. Néanmoins, d'autres auteurs ont démontré que l'hyperoxie mène à des altérations de la fonction cardiovasculaire et du système nerveux autonome pendant l'exposition et après un retour à la respiration normoxique ([Gole et coll. 2011](#)). Tout cela coïncide avec la diminution de la FMD observée. L'augmentation de la FMD pourrait alors être due à une relaxation du muscle lisse par les effets antioxydants du chocolat. Mais les réponses vasculaires à l'administration orale de nitroglycérine ne sont pas altérées par le chocolat/cacao ([Heiss et coll. 2007](#); [Monahan et coll. 2011](#); [Vlachopoulos et coll. 2005](#)), ce qui prouve bien que l'augmentation de la FMD suite à la prise de chocolat n'est pas due à une augmentation de la réactivité du muscle lisse vasculaire. Les caractéristiques antioxydantes du chocolat sont donc peut-être responsables de l'augmentation de FMD sans augmentation de NO circulant après la plongée, mais les mécanismes sous-jacents doivent encore être déterminés.

Contrairement à la FMD, la photopléthysmographie n'a montré d'évolution dans aucun des deux groupes étudiés. Des études antérieures ont déjà relaté une réaction différente entre la dilatation flux-dépendante et la photopléthysmographie ([Cornelissen et coll. 2012](#); [Obad et coll. 2007a](#)). Llauradó et coll. rapportent que l'altération de la fonction endothéliale n'est pas associée à la rigidité artérielle chez les patients diabétiques de type 1 ([Llauradó et coll. 2013](#)). La rigidité des troncs artériels comporte des modifications complexes de l'organisation structurale des différents composants de la paroi artérielle ([Zieman et coll. 2005](#)), qui conduisent à la réduction de sa distensibilité. Ils suggèrent que la dysfonction endothéliale précède la rigidité artérielle ([Llauradó et coll. 2013](#)). La plongée occasionne un stress oxydant qui attaque l'endothélium, et pourrait donc provoquer une augmentation de la rigidité artérielle à plus long terme. Ceci pourrait être évité par l'apport de chocolat ([Teede et coll. 2003](#); [van der Schouw et coll. 2002](#)) mais cette étude, de par sa durée, ne permet probablement pas de le mettre en évidence.

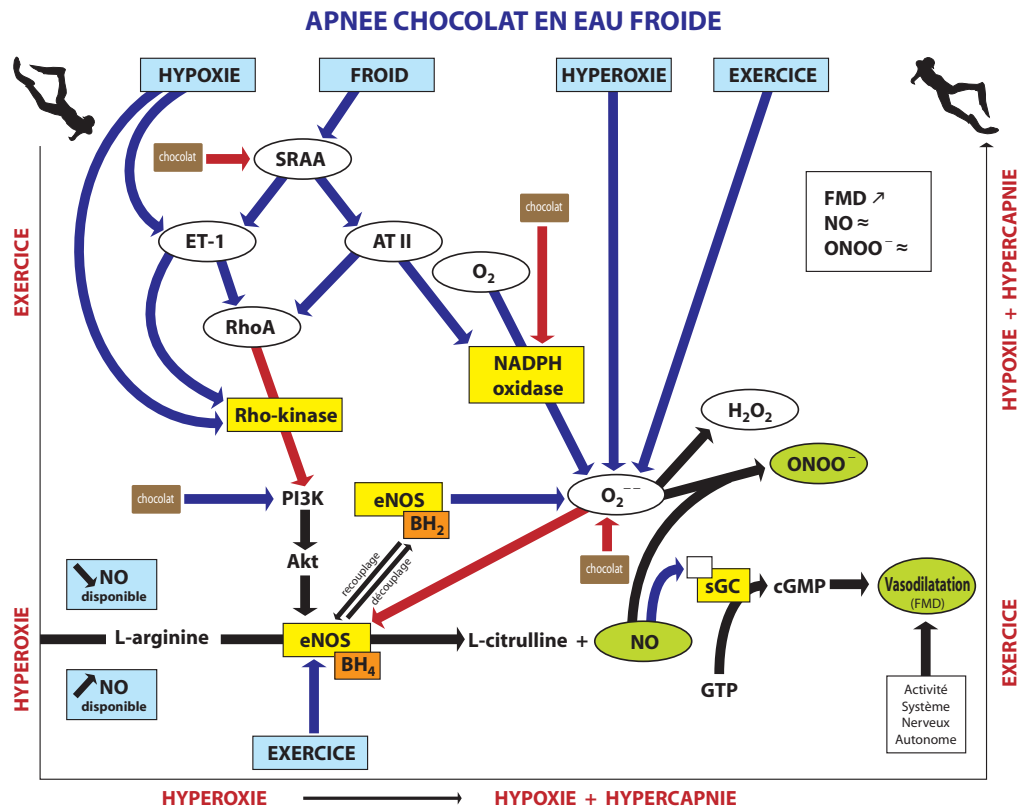


FIGURE 15 - INFLUENCES DE L'EXPOSITION AU FROID, A L'HYPEROXIE, A L'HYPOXIE, A L'EXERCICE ET AUX FLAVONOÏDES SUR LA BIODISPONIBILITE DU MONOXYDE D'AZOTE (NO).

Dans des conditions normales, la L-arginine produit du NO sous l'action de la nitric oxide synthétase endothéliale (eNOS) grâce à la présence de cofacteurs tel que la tétrahydrobiopterine (BH₄). Le NO ainsi produit par l'eNOS active la guanylate cyclase soluble (sGC), enzyme catalysant la formation de guanosine monosphosphate cyclique (cGMP), et permet ainsi une vasodilatation. Sans la présence de BH₄, l'eNOS est découplée et produit des anions superoxydes (O₂⁻) plutôt que du NO. Les O₂⁻, dont la production est également influencée par la NADPH oxydase, peuvent prendre part à la dysfonction endothéliale de différentes façons. En effet, ils peuvent s'associer avec le NO pour former du peroxynitrite (ONOO⁻), être converti en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (un oxydant puissant) ou oxyder la BH₄. L'exposition au froid active le système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA), entraînant une série de modifications aboutissant à une diminution de l'expression et de l'activation de l'eNOS. Le SRAA augmente de production d'endothéline-1 (ET-1) et d'angiotensine (angio II). Or, toutes deux augmentent le taux de Rho. Cette activation engendre une diminution de l'eNOS ainsi qu'une augmentation de la Rho-kinase entraînant également, par inactivation de la PI3K, une diminution de l'activation de l'eNOS et donc de la production de NO. De plus, l'angio II augmente la présence de NADPH oxydase et donc favorise la formation d'O₂⁻. Ceci a pour conséquence d'augmenter la production de H₂O₂, de favoriser l'oxydation de la BH₄, et, de par son association avec le NO pour former des peroxynitrites, de diminuer la biodisponibilité de ce dernier.

7.5. CONCLUSION

Dans cette étude, nous observons une diminution de la FMD et du taux de NO circulant après une série de plongées successives en apnée. La diminution de la FMD semble confirmer que la plongée en apnée a une influence négative sur la fonction endothéliale et pourrait être partiellement expliquée par la diminution de la biodisponibilité du NO. Nous avançons l'hypothèse que la production de NO induite par l'exercice aurait été contrebalancée par plusieurs facteurs dont le plus important aurait été le froid. En revanche, après ingestion de chocolat noir, une augmentation de FMD sans évolution du taux de NO a été observée après une série de plongées en apnée réalisée dans les mêmes conditions. Ceci pourrait être expliqué par la prise de chocolat noir. En effet, Les antioxydants contenus dans le chocolat noir seraient capables de diminuer la production de radicaux libres pendant la plongée en apnée. L'effet combiné de l'exercice associé à la prise d'antioxydants aurait donc engendré une augmentation de l'activité et de l'expression de l'eNOS. Mais cette augmentation semblerait avoir été contrée par l'action combinée de l'hyperoxie, de l'hypoxie et du froid. L'absence de modification du taux de monoxyde d'azote, parallèlement à une modification de la FMD, laisse supposer que cette dernière est peut-être due à un autre facteur que la voie NO-cGMP. Malgré l'augmentation de stress oxydant lié à la plongée en apnée, le taux de peroxynitrites n'a montré aucune évolution, que ce soit avec ou sans apport d'antioxydant. La production de ONOO- étant NO dépendante, celle-ci a pu être freinée par l'absence d'augmentation du taux de monoxyde d'azote. Ceci pourrait donc expliquer la stabilité du taux de ONOO- malgré une augmentation du stress oxydant mais remet en cause l'utilisation du taux de peroxynitrites comme marqueur de ce stress.

Cette étude ne permet pas d'observer les effets des flavonoïdes sur la rigidité artérielle. Pour cela, une expérimentation sur un plus long terme pourrait être nécessaire.

Toutefois, il ressort de notre étude que l'ingestion de 30gr de chocolat noir une heure avant de plonger pourrait être un moyen efficace de prévenir la dysfonction endothéliale observée après une série de plongées successives à 20m en apnée comptabilisant un total de 20 minutes d'immersion.

TABLEAU GENERAL DES RESULTATS

	Etude 1		Etude 2	Etude 3		Etude 4		Etude 5	
	Némo 33 (SCUBA vs Apnéistes)		Santa Maria di Leuca (Apnéistes)	Chocolat noir vs Chocolat blanc (Sujets sains)		Nemo 33 (SCUBA)		Conflans-Ste-Honorine (Apnéistes)	
	SCUBA (n=9)	APNEISTES (n=5)	APNEISTES (n=13)	CHOC. BLANC (n=20)	CHOC. NOIR (n=20)	CONTRÔLE (n=21)	CHOCOLATE (n=21)	CONTRÔLE (n=10)	CHOCOLATE (n=10)
Diamètres	Diamètres $\blacktriangledown$ (*) 85,76%	Diamètres $\approx$ (NS) 86,56%	/	Diamètres $\approx$ (NS) 100,70%	Diamètres $\blacktriangledown$ (*) 108,30%	Diamètres $\blacktriangledown$ (*) 104,50%	Diamètres $\approx$ (NS) 98,88%	Diamètres $\approx$ (NS) 102,10%	Diamètres $\approx$ (NS) 99,90%
FMD	FMD $\blacktriangledown$ (*) 94,26%	FMD $\blacktriangledown$ (*) 95,43%	/	FMD $\approx$ (NS) 96,73%	FMD $\blacktriangledown$ (*) 102,43%	FMD $\blacktriangledown$ (***) 90,87%	FMD $\blacktriangledown$ (***) 105,10%	FMD $\blacktriangledown$ (***) 95,28%	FMD $\blacktriangledown$ (***) 104,10%
PORH / pléthysmo	PORH $\blacktriangledown$ (*) 73,38%	PORH $\blacktriangledown$ (*) 149,50%	/	SI $\approx$ (NS) 105,60%	SI $\approx$ (NS) 98,26%	SI $\approx$ (NS) 96,32%	SI $\approx$ (NS) 98,89%	SI $\approx$ (NS) 103,10%	SI $\approx$ (NS) 96,22%
NO	NO $\approx$ (NS) 100,50%	NO $\blacktriangledown$ (**) 154,40%	NO $\blacktriangledown$ (***) 169,10%	/	/	NO $\approx$ (NS) 102,55%	NO $\blacktriangledown$ (*) 154,43%	NO $\blacktriangledown$ (*) 86,76%	NO $\approx$ (NS) 98,44%
ONOO-	/	/	ONOO- $\blacktriangledown$ (**) 207,20%	/	/	ONOO- $\blacktriangledown$ (**) 84,25%	ONOO- $\approx$ (NS) 100,10%	ONOO- $\approx$ (NS) 112,80%	ONOO- $\approx$ (NS) 105,10%
SH	/	/	SH $\blacktriangledown$ (***) 69,88%	/	/	/	/	/	/

TABLEAU 7 - RECAPITULATIF DES POURCENTAGES D'EVOLUTION DE TOUS LES RESULTATS OBTENUS LORS DES DIFFERENTES EXPERIENCES.

Les résultats sont présentés en % des valeurs avant la plongée (études 1, 2, 4 et 5) ou avant la prise de chocolat noir ou blanc (étude 3). Ils reprennent les diamètres pré-occlusion (Diamètres), la dilatation flux-dépendante (FMD), l'hyperhémie réactive post-occlusive (PORH) ou la photopléthysmographie (pléthysmo), les évolutions du monoxyde d'azote (NO), des peroxy-nitrites (ONOO-) et des thiols (SH). $\blacktriangledown$ augmente ; $\blacktriangledown$ diminue ; $\approx$ ne montre pas de modification. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; NS non significatif.

DISCUSSION GENERALE

Ce travail avait pour but de déterminer l'impact de la plongée à l'air (études 1 et 4) et de l'apnée (études 1, 2 et 5) sur la fonction endothéliale. Elle avait également pour intérêt de trouver un moyen de prévention de la dysfonction endothéliale. Ces étapes nécessitaient la compréhension des mécanismes sous-jacents à la dysfonction endothéliale.

Grâce aux réflexions apportées dans la discussion des résultats obtenus dans le dernier chapitre où les apnéistes ont exécuté une série de plongées successives en apnée dans une eau froide (27°C) après avoir ingéré ou non du chocolat noir, un modèle de mécanismes a pu être construit et interprété dans tous les cas de figure que sont (1) la plongée à l'air dans des conditions à neutralité thermique, (2) la plongée à l'air avec l'addition de chocolat, (3) la plongée en apnée dans des conditions thermiquement neutres, (4) la plongée en apnée dans des conditions de température plus froide et enfin (5) la plongée en apnée dans une eau à 27°C après avoir ingéré du chocolat une heure auparavant. Notre schéma récapitulatif reprenant les effets de l'hyperoxie et hypoxie hypercapnique, de l'exercice, du froid et du chocolat sur le plongeur est très probablement extrapolable aux mécanismes rencontrés dans la plongée SCUBA en eau froide (hyperoxie + froid) ou la plongée à l'air en eau froide avec addition de chocolat comme pré-conditionnement (hyperoxie + froid + chocolat) mais ne l'ayant pas expérimenté, nous nous tiendrons aux explications des résultats obtenus. Voici donc présentés les phénomènes impliqués en plongée à l'air et en apnée dans différentes conditions de température et de pré-conditionnement.

IMPACT DE LA PLONGEE EN SCAPHANDRE AUTONOME SUR LA FONCTION ENDOTHELIALE

Brubakk et coll. en 2005 furent les premiers à rapporter une dysfonction endothéliale après une plongée à l'air ([Brubakk et coll. 2005](#)). La réduction de FMD fut également observée par d'autres auteurs après une plongée SCUBA ([Brubakk et coll. 2005](#); [Obad et coll. 2010](#); [Obad et coll. 2007a](#); [Obad et coll. 2007b](#); [Rasdal et coll. 2009](#)) et est confirmée par nos 2 protocoles expérimentaux.

Brubakk et coll. avaient émis l'hypothèse que la diminution de FMD pouvait être due en partie à l'augmentation des diamètres pré-occlusion ou à une influence du muscle lisse vasculaire ([Brubakk et coll. 2005](#)). Cependant, nos résultats des diamètres pré-occlusion sont divergents d'une expérience à l'autre, ce qui ne nous permet pas de confirmer leur hypothèse. Ils avaient également avancé l'hypothèse que l'hyperoxie pouvait être responsable de la réduction de FMD puisque celle-ci augmente le stress oxydant ([Demchenko et coll. 2000](#)) par production d'anions superoxydes ([Jamieson et coll. 1986](#)).

De plus, les ROS ne s'attaquent pas uniquement au NO lui réduisant sa biodisponibilité, ils oxydent également la BH₄, cofacteur majeur de l'eNOS, ce qui entraîne une réduction de la libération de NO ([Forstermann 2010](#)). En effet, l'épuisement de la BH₄ dans les cellules endothéliales exposées à un stress oxydant peut engendrer un découplage de l'eNOS amenant une production d'anions superoxydes par l'eNOS plutôt que de NO ([Vasquez-Vivar et coll. 1998](#)).

Lors de nos expériences, aucune variation du NO n'est observée. Ceci implique que l'activité de l'eNOS n'est pas modifiée. Or il fut jusqu'ici accepté que la FMD est NO-dépendante ([Mullen et coll. 2001](#)). Nous aurions donc pu nous attendre à avoir moins de NO après la plongée à l'air.

Nous émettons alors l'hypothèse que les anions superoxydes produits durant la plongée interagiraient avec le NO pour former des peroxynitrites (ONOO-) ([Sureda et coll. 2009](#)). Et ceci le rendrait moins disponible pour participer à la dilatation flux-dépendante, provoquant une vasoconstriction ([Beckman et coll. 1996](#); [Demchenko et coll. 2000](#)). Mais cela sous-entend que lorsque l'on aurait mesuré les ONOO-, nous en aurions trouvé un taux plus élevé après la plongée. Or, dans notre 2^{ème} expérience sur les plongeurs SCUBA, nous n'avons pas observé d'augmentation des ONOO- mais une diminution de ceux-ci. Cela fait penser que le NO n'est pas transformé en ONOO-.

Il n'est donc ni moins produit, ni plus éliminé (pas de transformation en ONOO-). Ceci peut expliquer pourquoi les résultats du monoxyde d'azote ne montrent pas d'évolution dans toutes nos expériences. Ces résultats sont d'ailleurs confirmés par Marinovic et co. ([Marinovic et coll. 2012](#)).

L'hypothèse du stress oxydant n'a pas l'air de se confirmer par la mesure des ONOO-. Ceci traduit que soit (1) le taux de NO n'est pas suffisamment élevé pour produire des ONOO-, soit (2) les systèmes antioxydants activés par la plongée ([Ferrer et coll. 2007](#); [Sureda et coll. 2012](#)) ont neutralisé les peroxynitrites formés, soit (3) le stress oxydant n'est pas ou peu présent. Ce dernier argument contredirait des études trouvant du stress oxydant en plongée ([Obad et coll. 2010](#); [Vince et coll. 2009](#)). Celui-ci ayant été démontré avec d'autres marqueurs comme les TBARS ([Vince et coll. 2009](#)) ou l'activité de la superoxyde dismutase et de la glutathione peroxydase ([Rousseau et coll. 2006](#)). Pour ces raisons, les peroxynitrites ne sont peut-être pas les meilleurs marqueurs du stress oxydant, surtout lorsqu'un déficit en NO est observé. Néanmoins, ils indiquent que le NO n'est pas plus éliminé par le stress oxydant.

La FMD est réduite après la plongée à l'air alors que le NO n'a pas été modifié. Ceci a également été observé par Marinovic et coll. en 2012 ([Marinovic et coll. 2012](#)) et pourrait trouver une explication dans une adaptation cardio-vasculaire ([Boussuges et coll. 2006](#)), une atteinte du muscle lisse vasculaire ([Lambrechts et coll. 2013](#)) et/ou une activité du système nerveux autonome. En effet, des activités du système sympathique et parasympathique ont déjà été démontrées en plongée ([Gole et coll. 2011](#)). De plus, nous observons une augmentation des diamètres pré-occlusion, ce qui prouve une activité du système nerveux autonome. Ces résultats vont à l'encontre de ceux retrouvés dans notre première étude où les diamètres pré-occlusion étaient alors significativement réduits. Nous n'expliquons pas la raison pour laquelle leur évolution est diamétralement opposée. Mais une augmentation des diamètres pré-occlusion accompagnée d'une réduction de la FMD fut également observée par l'équipe de Brubakk en 2005. Ils avaient émis l'hypothèse que la diminution de FMD pouvait être due en partie à l'augmentation des diamètres pré-occlusion ou à une influence du muscle lisse vasculaire ([Brubakk et coll. 2005](#)).

Les mécanismes associés à la diminution de la FMD après une plongée à l'air sont repris dans la figure 16.

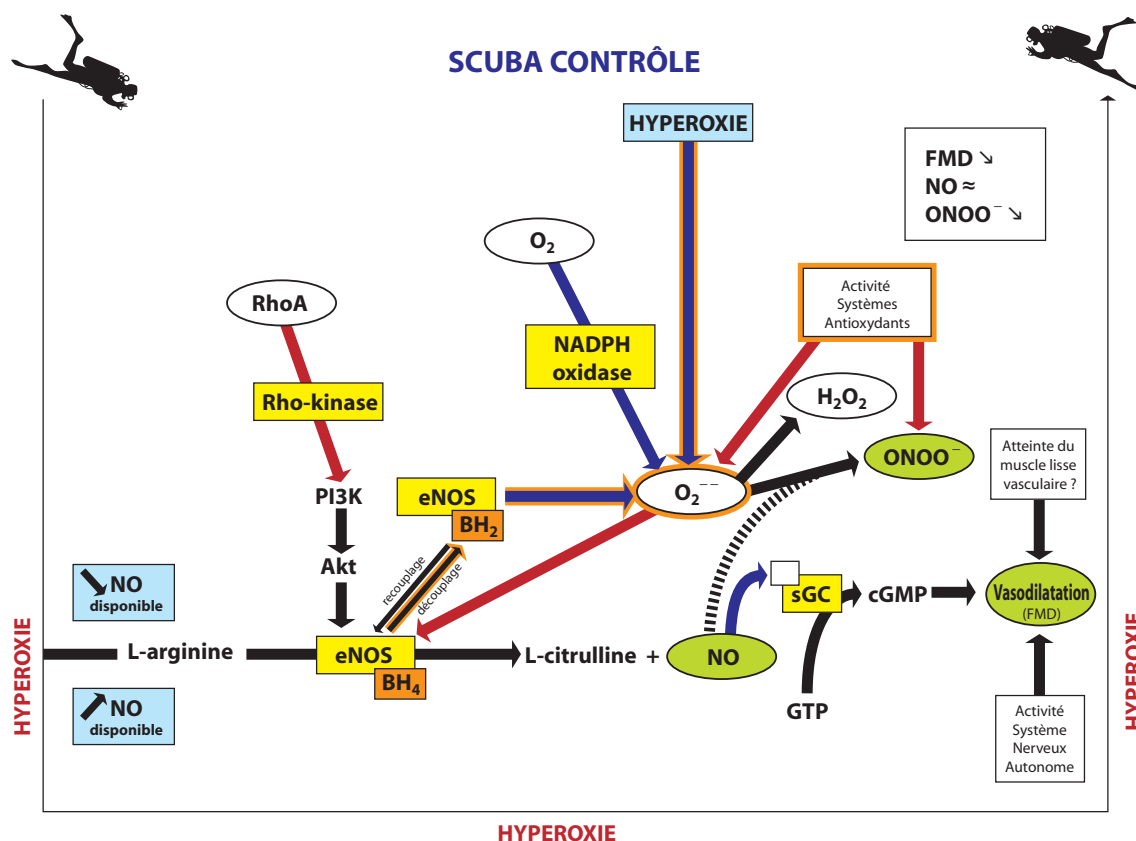


FIGURE 16 - MECANISMES ASSOCIES A LA DIMINUTION DE LA FMD APRES UNE PLONGEE A L'AIR.

L'hyperoxie engendre une diminution des taux de tetrahydrobiopterine (BH_4), cofacteur de la nitric oxide synthétase endothéliale (eNOS). Ceci a pour conséquence un découplage de l'enzyme qui produira des anions superoxydes ($O_2^{\cdot -}$) plutôt du NO. Sa production est alors diminuée. Dans notre étude, nous ne trouvons pas de changement de NO. Ce mécanisme n'est donc pas prédominant dans la plongée à l'air. La combinaison du NO avec les anions superoxydes forment des peroxynitrites ($ONOO^-$). Dans notre étude, nous observons une réduction des $ONOO^-$. Ceci pourrait s'expliquer d'une part, par les taux de NO probablement insuffisants pour former des $ONOO^-$, et d'autre part, par les systèmes antioxydants activés par la plongée, amenant une diminution des taux d'anions superoxydes et des peroxynitrites. Le NO n'est donc ni produit en excès (réduction de sa production par l'eNOS), ni plus éliminé (pas de transformation en $ONOO^-$). Les taux de NO restent donc stables. La réduction de FMD sans modification de NO voit donc peut-être son explication dans d'autres mécanismes (activation du système nerveux autonome, atteinte du muscle lisse vasculaire). Les flèches bleues correspondent à une activation / production ; les flèches rouges à une inhibition / réduction du taux. Les flèches noires indiquent une transformation. Les cercles verts correspondent aux paramètres mesurés (NO, $ONOO^-$ et FMD).

La microcirculation a été mesurée de 2 manières différentes dans nos 2 expériences. D'une part, par l'hyperhémie réactive post-occlusive (PORH) et d'autre part, par le calcul de l'index de rigidité artérielle SI par photopléthysmographie digitale.

Nos résultats de la PORH montrent également une fonction endothéliale altérée dans la microcirculation après une plongée à l'air. Nous pouvons émettre l'hypothèse que l'augmentation de PO_2 durant la plongée à l'air va modérément augmenter les résistances vasculaires périphériques comme démontré pendant la respiration de mélanges gazeux hyperoxiques ([Gole et coll. 2011](#); [Gole et coll. 2009b](#); [Rossi et coll. 2005](#)).

Par contre, lorsque l'on s'attarde aux résultats de l'index de rigidité artérielle (SI), aucune différence n'est observée. Cependant, Llauradó et coll. rapportent que l'altération de la fonction endothéliale n'est pas associée à la rigidité artérielle chez les patients diabétiques de type 1 ([Llaurado et coll. 2013](#)). La rigidité des troncs artériels comporte des modifications complexes de l'organisation structurale des différents composants de la paroi artérielle ([Zieman et coll. 2005](#)) qui conduisent à la réduction de sa distensibilité. Ces auteurs suggèrent que la dysfonction endothéliale précède la rigidité artérielle ([Llaurado et coll. 2013](#)). La plongée occasionne un stress oxydant qui attaque l'endothélium, et pourrait donc provoquer une augmentation de la rigidité artérielle à plus long terme. La PORH semble donc être un meilleur moyen de mesure que la photopléthysmographie pour corrélérer les altérations de la fonction endothéliale entre le central et le périphérique.

IMPACT DE LA PLONGEE EN APNEE SUR LA FONCTION ENDOTHELIALE

La plongée en apnée est un peu plus complexe que la plongée en scaphandre autonome. En effet, si cette dernière ne comprend qu'une phase d'hyperoxie continue, la plongée en apnée est composée de 4 phases : (1) une phase de descente où les plongeurs doivent fournir un effort pour descendre durant les premiers mètres, (2) une phase d'hyperoxie due à l'augmentation de la PO_2 suivie (3) d'une phase d'hypoxie hypercapnique due à la consommation de l'oxygène (O_2), consommation qui induit donc une production de dioxyde de carbone (CO_2) et enfin (4) le retour à la surface, où les plongeurs doivent exercer un effort physique jusqu'à ce qu'ils retrouvent leur flottabilité neutre et où l'oxygène se fait de plus en plus rare dans les tissus amenant le sujet à des conditions

d'hypoxie hypercapnique encore plus importantes. Ces différentes phases correspondent à une seule apnée. Sachant que les plongeurs répètent les apnées durant leur temps de plongée qui peut durer plusieurs heures pour les plongeurs professionnels, les mécanismes physiologiques associés aux différentes phases sont répétés un certain nombre de fois.

Il semble alors assez logique de se poser la question de savoir si l'hyperoxie intermittente, accompagnée d'une hypoxie hypercapnique provoque également un stress oxydant pouvant induire une dysfonction endothéliale. D'ailleurs, il fut démontré qu'après une série d'apnées successives, il existe une accumulation d'azote dans les tissus et le sang ([Dujic et coll. 2012](#)).

Toutes nos expérimentations montrent une réduction de FMD après la plongée en apnée. A notre connaissance, ce sont les premiers résultats rapportés dans la littérature sur cette population. La réduction de FMD semble donc indiquer que la plongée en apnée agit sur la fonction endothéliale même si la phase d'hyperoxie est intermittente.

La grande différence par rapport à la plongée à l'air est que la réduction de FMD est ici associée à une augmentation du NO circulant dans les conditions thermiquement neutres. Cette augmentation après une plongée en apnée peut être associée à un effort cardio-vasculaire plus important qu'en plongée avec bouteille. En effet, pour descendre durant les premiers mètres et lorsqu'ils reviennent à la surface, les apnéistes doivent palmer, ce qui requiert un effort cardio-vasculaire. Et l'exercice physique est connu pour augmenter la production de NO ([Wang et coll. 1993](#)). D'ailleurs, dans des conditions normales, l'entraînement améliore la fonction endothéliale, ce qui est directement lié à une augmentation de la biodisponibilité du NO dans le muscle lisse ([de Moraes et coll. 2008](#)).

Nous aurions alors du retrouver une FMD augmentée, ce qui n'est absolument pas le cas dans notre étude (Etude 1 – Chapitre 3). Nous avons dès lors émis l'hypothèse que malgré l'augmentation de la production de NO, l'effort cardio-vasculaire, l'hyperoxie intermittente et l'hypoxie étaient des sources de stress oxydant pouvant réduire la disponibilité du NO pour participer à la FMD. En effet, il fut démontré que **l'exercice** produisait du stress oxydant ([Davies et coll. 1982](#); [Duthie et coll. 1990](#)). Or, un plus grand stress oxydant est associé à un taux plus important **d'anions superoxydes**. Les

mécanismes qui tendent à réduire la disponibilité du NO sont les mêmes dans la plongée SCUBA et en apnée. L'**hyperoxie** amenée durant la phase de descente de la plongée en apnée engendre également une augmentation du taux de **production d'anions superoxydes** qui peuvent être convertis en H_2O_2 , ou réagir avec le NO pour **former des peroxynitrites** ([Jamieson et coll. 1986](#); [Sureda et coll. 2009](#)) diminuant la biodisponibilité du NO ([Demchenko et coll. 2002](#)). Ceci est confirmé par notre 2^{ème} étude dans laquelle nous observons une augmentation du NO circulant et des peroxynitrites (ONOO-) en même temps qu'une diminution des thiols (R-SH). Ceci confirme l'hypothèse du stress oxydant produit par l'exercice et l'hyperoxie pendant la plongée en apnée. En effet, quand les anions superoxydes sont présents en quantité physiologique, le NO réagit avec les protéines pour former des groupements R-SH. Mais un taux élevé d'anions superoxydes facilite l'interaction de ceux-ci avec le NO pour former des ONOO-, à la place des groupements R-SH ([Ferdinandy et coll. 2000](#)). La quantité totale de groupements R-SH se voit dès lors réduite. Tout comme dans la plongée à l'air, l'hyperoxie via la production d'anions superoxydes **diminue également les taux de BH₄**, cofacteur de l'eNOS. Ceci induit un découplage de l'eNOS produisant des anions superoxydes supplémentaires et réduit l'activité de l'eNOS, entraînant une libération moins grande de NO ([Fisamen et coll. 2013](#); [Forstermann 2010](#); [Ilan et coll. 2005](#)). L'**hypoxie** retrouvée dans la seconde moitié de l'apnée augmente à la fois l'expression et l'activité de la **Rho-kinase** ([Takemoto et coll. 2002](#)) qui facilite la régulation négative de l'expression de l'eNOS ([Takemoto et coll. 2002](#)), réduisant une fois de plus la disponibilité endothéliale du NO. Le NO est donc produit par l'effort cardio-vasculaire mais sa participation à la FMD est limitée par sa transformation en peroxynitrites qui agit dans l'autre sens. Etant donné qu'en conditions thermiquement neutres, nous retrouvons plus de NO après la plongée qu'avant, nous pouvons considérer que sa production est plus importante que tous les mécanismes liés au stress oxydant qui tendent à inhiber l'eNOS.

Comme pour la plongée SCUBA, nous ne pouvons exclure une action du système nerveux autonome et une éventuelle atteinte du muscle lisse vasculaire sur la FMD.

Les mécanismes associés à la plongée en apnée dans des conditions thermiquement neutres sont résumés dans la figure 17.

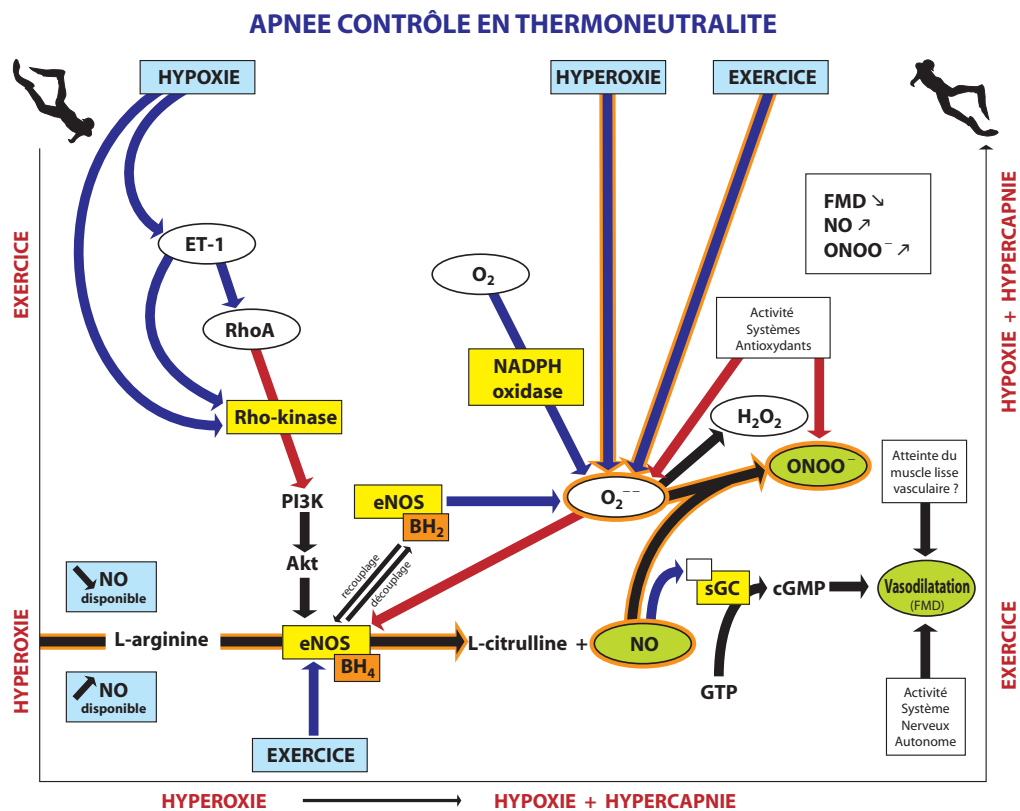


FIGURE 17 - SCHEMA RECAPITULATIF DES MECANISMES ASSOCIES A LA REDUCTION DE LA DILATATION FLUX-DEPENDANTE OBSERVEE APRES UNE SERIE DE PLONGEES SUCCESSIVES EN APNEE DANS DES CONDITIONS THERMIQUEMENT NEUTRES.

Veillez vous référer au texte pour plus d'explications. Les flèches bleues correspondent à une activation / production ; les flèches rouges à une inhibition / réduction du taux. Les flèches noires indiquent une transformation. Les cercles verts correspondent aux paramètres mesurés (NO, ONOO- et FMD).

Les mécanismes expliqués précédemment ne sont plus valables lorsque nous réduisons la température de l'eau de quelques degrés afin d'être comparable aux conditions naturelles de plongée en apnée. Sortis de la ZTN, le froid semble être un facteur important dans la régulation de la production du NO. En effet, l'exposition au froid **active le système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA)** qui, à son tour, supprime l'expression de l'eNOS et diminue la formation de NO ([Sun 2011](#)). Le SRAA régule également l'augmentation de production d'endothéline-1 (ET-1) due au froid ([Sun 2011](#)). Or, l'ET-1, ainsi que l'angiotensine II, augmentent le taux de Rho ([Budzyn et coll.](#)

[2005](#)). Cette activation engendre une diminution de l'eNOS ainsi qu'une augmentation de la Rho-kinase entraînant également, par inactivation de la PI3K, une diminution de l'activation de l'eNOS et donc de la production de NO ([Budzyn et coll. 2005](#)).

Tous ces mécanismes s'ajoutent à ceux décrits précédemment et l'inhibition de l'eNOS devient plus importante que son activation par l'exercice physique. Nous observons donc après une série de plongées en apnée en eau froide une diminution des taux de NO.

Avec le froid, nos résultats ne montrent également plus de modification du taux de peroxynitrites. Ceux-ci provenant de la combinaison du NO avec les anions superoxydes, si une diminution du taux de NO est observée, la réaction formant du ONOO- s'en trouve diminuée. Ceci pourrait donc expliquer la stabilité du taux de ONOO- malgré une augmentation du stress oxydant mais remet en cause, une fois de plus, l'utilisation des taux de ONOO- comme marqueur de ce stress oxydant. En effet, d'autres marqueurs ont montré une évolution après la plongée en apnée, tel qu'une augmentation des TBARS ([Ioulia et coll. 2002](#)) ou de l'activité de la glutathione peroxydase ([Rousseau et coll. 2006](#)).

La FMD est donc réduite, que l'on sorte de la ZTN ou non. Le NO est produit de manière importante en réponse à l'effort cardio-vasculaire dans les conditions thermiquement neutres mais l'augmentation de la production de NO liée à l'exercice ne serait plus assez importante pour compenser les effets combinés du stress oxydant produit par l'exercice et par l'hyperoxie de début de plongée, les effets de l'hypoxie de fin de plongée et du froid une fois en dehors de la ZTN.

Les mécanismes provoquant une réduction de FMD et du NO après une série d'apnées successives dans des conditions non-thermiquement neutres sont présentés dans la figure 18.

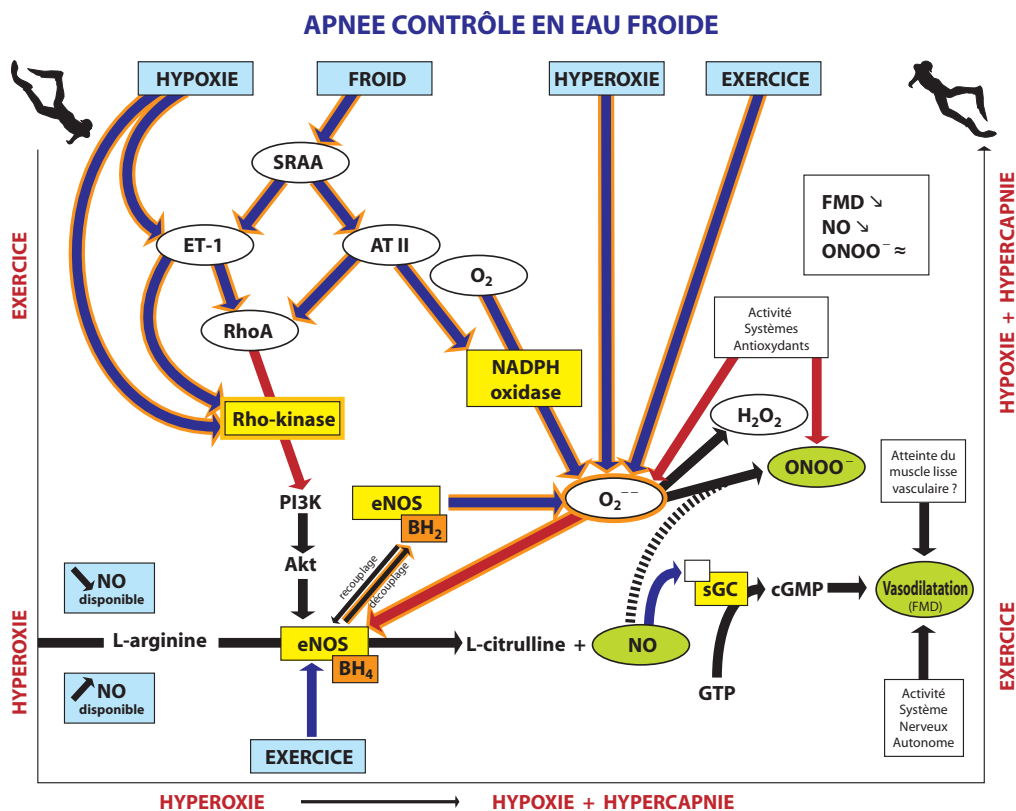


FIGURE 18 - INFLUENCE DE L'EXERCICE, DE L'HYPEROXIE, DE L'HYPOXIE, DE L'EXPOSITION AU FROID ET DES ANTIOXYDANTS SUR LA BIODISPONIBILITE DU MONOXYDE D'AZOTE (NO).

Dans des conditions normales, la L-arginine produit du NO sous l'action de l'eNOS grâce à l'action d'un cofacteur, la tetrahydrobiopterine (BH₄). Le NO produit par l'eNOS active la guanylate cyclase soluble (sGC), qui catalyse la formation de GMP cyclique à partir du GTP induisant une vasodilatation comme observé par la dilatation flux-dépendante (FMD). **L'exercice** produit du NO à partir de l'eNOS mais est aussi associé à la formation de stress oxydant, incluant une production d'anions superoxydes (O₂⁻). Ceux-ci sont formés par la NADPH oxydase à partir de l'oxygène. **L'hyperoxie** induit également une production d'anions superoxydes. Ces derniers oxydent la BH₄ en dihydrobiopterine (BH₂) réduisant les taux de BH₄. Cela induit un découplage de l'eNOS entraînant une production d'anions superoxydes par l'eNOS à la place de NO, augmentant le stress oxydant. L'exposition au **froid** active le système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA) qui augmente la production d'endothéline-1 (ET-1) et d'angiotensine II (AT II). Ceux-ci augmentent le taux de Rho induisant une activité augmentée de la Rho-kinase qui résulte en une inactivation de la phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K). Cette inactivation diminue l'activité de l'eNOS et dès lors entraîne une réduction du NO produit. De plus, l'AT II augmente la présence de la NADPH oxydase et favorise donc la formation d'anions superoxydes. **L'hypoxie** active la production d'ET-1 et l'activité de la Rho-kinase entraînant une régulation négative de l'eNOS. Le NO produit par l'exercice est contrebalancé par la combinaison des inhibitions de l'eNOS entraînant une réduction des taux de NO post-plongée. La FMD, NO-dépendante

se voit réduite mais des actions du système nerveux autonome ou une atteinte du muscle lisse vasculaire ne sont pas à exclure. Les flèches bleues correspondent à une activation / production ; les flèches rouges à une inhibition / réduction du taux. Les flèches noires indiquent une transformation. Les cercles verts correspondent aux paramètres mesurés (NO, ONOO- et FMD).

Une fois de plus, la réduction de la FMD alors que le taux de NO est augmenté (Chapitre 3 et 4) ou diminué (Chapitre 7) laisse supposer que cette dernière est due en partie à un autre facteur que la voie NO-cGMP. La plongée en apnée est en effet accompagnée d'un changement dans les activités ortho- et parasympathiques ([Foster et coll. 2005](#)). Néanmoins, que les plongeurs se trouvent dans la ZTN ou non, que la quantité de NO soit augmentée ou non, les diamètres pré-occlusion n'ont pas changé. Ceci implique que si une activité sympathique ou parasympathique était présente, elle est loin d'avoir un effet prédominant. L'explication des mécanismes associés à la réduction de FMD après la plongée devrait donc s'orienter plus vers le muscle lisse vasculaire. En effet, il fut suggéré que dans les processus de dysfonction endothéliale associée à la plongée, les changements fonctionnels dans le vaisseau ne seraient pas limités à l'endothélium et pourraient être dus à des altérations du muscle lisse vasculaire ([Lambrechts et coll. 2013](#)).

Au niveau de la microcirculation, la PORH montre une augmentation significative entre avant et après la série de plongées successives en apnée. Celle-ci pourrait être expliquée par le fait que les petites artères sont plus sensibles au NO que les grosses ([Coffman 1994](#); [Noon et coll. 1996](#)). Une fois de plus, si l'on regarde les résultats de la rigidité artérielle, aucune variation ne fut observée. Tout comme pour les plongeurs en scaphandre autonome, la PORH semble être un meilleur outil de mesure que la rigidité artérielle pour évaluer la fonction endothéliale à court terme.

LE CHOCOLAT NOIR COMME MOYEN DE PREVENTION DE LA DYSFONCTION ENDOTHELIALE

EFFETS SUR LA PLONGÉE À L'AIR

Le chocolat noir comprend des antioxydants capables de réduire le stress oxydant produit par la plongée. En plongée en scaphandre autonome, le chocolat agit directement au niveau des anions superoxydes ainsi qu'en réduisant l'activité de la NADPH oxydase, enzyme qui transforme l'oxygène en anions superoxydes. Ceci entraîne une moins grande oxydation de la BH₄ permettant à l'eNOS de former du NO. Le taux de NO se voit donc augmenté. La FMD suit l'augmentation de NO. En plongée à l'air sans supplémentation en chocolat, nous avons observé une réduction de la FMD alors que le NO ne variait pas. L'hypothèse avait donc été donnée que la variation de FMD pouvait être due en partie à une activité du système nerveux autonome, une adaptation cardiovasculaire ou une atteinte du muscle lisse vasculaire. Après ingestion de chocolat noir, les variations de NO et de FMD vont dans le même sens mais cela n'exclut pas que le système nerveux puisse intervenir ou qu'une atteinte du muscle lisse puisse être présente. D'ailleurs, certaines études ont montré que la plongée SCUBA de loisir était associée à une augmentation de l'activité vagale et à une diminution de l'activité sympathique cardiaque. Par contre, l'activité sympathique augmente pendant la récupération ([Chouchou et coll. 2009](#)). Ceci pourrait donc expliquer pourquoi les résultats de la FMD ne suivent pas toujours les résultats du NO.

Les taux de peroxynitrites restent inchangés après la plongée. Etant donné que les anions superoxydes sont piégés par les antioxydants du chocolat, leur quantité pourrait se voir suffisamment réduite pour que leur combinaison avec le NO ne soit pas suffisante pour modifier les taux de ONOO⁻.

Les mécanismes associés à la plongée SCUBA après supplémentation en chocolat noir sont présentés ci-dessous.

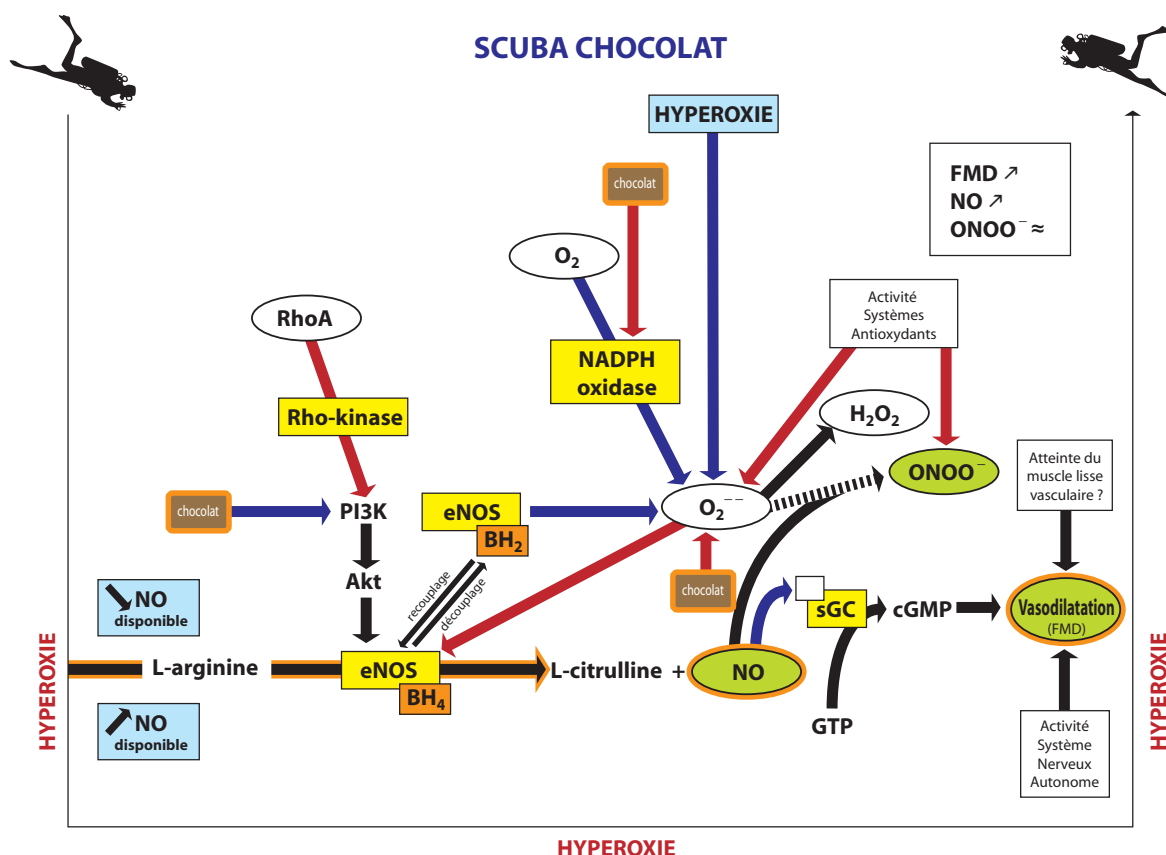


FIGURE 19 – MECANISMES ASSOCIES A LA PLONGEE SCUBA APRES SUPPLEMENTATION EN CHOCOLAT NOIR.

Le chocolat agit en réduisant la quantité d'anions superoxydes ($O_2^{\bullet-}$), en diminuant l'activité de la NADPH et en augmentant le taux de PI3K. Toutes ces actions ont pour effet d'augmenter l'activité de l'eNOS et donc la production de NO. Etant donné que les $O_2^{\bullet-}$ sont piégés par les antioxydants du chocolat, leur quantité pourrait se voir suffisamment réduite pour que leur combinaison avec le NO ne soit pas suffisante pour modifier les taux de $ONOO^-$. Les flèches bleues correspondent à une activation / production ; les flèches rouges à une inhibition / réduction du taux. Les flèches noires indiquent une transformation. Les cercles verts correspondent aux paramètres mesurés (NO, $ONOO^-$ et FMD).

Au niveau de la microcirculation, les valeurs de l'index de rigidité artérielle n'ont pas changées. Ceci corrobore les discussions précédemment évoquées.

EFFETS SUR LA PLONGÉE EN APNÉE

La supplémentation en chocolat 1h avant une série d'apnées successives en eau froide a pour effet d'atténuer le stress oxydant par l'intermédiaire du chocolat qui piège les anions superoxydes, de réduire l'action du système rénine-angiotensine-aldostérone et la production d'anions superoxydes par la NADPH oxydase et d'augmenter la production

de PI3K. Toutes ces actions ont pour effet d'activer l'eNOS. Néanmoins, les effets inverses de l'hyperoxie, l'hypoxie, l'exercice et le froid pourraient contrecarrer l'activité de l'eNOS et la production de NO. Ceci pourrait expliquer pourquoi le NO n'est pas modifié après une série d'apnées successives en eau froide avec supplémentation de chocolat 1h avant la plongée. La FMD est augmentée sans modification de NO. Une fois de plus, cela confirme qu'une action extérieure au NO puisse intervenir. L'hypothèse du système nerveux autonome est avancée puisqu'il est connu que la fréquence cardiaque est modifiée en apnée ([Marabotti et coll. 2009](#); [Shiraki et coll. 2002](#)). De même, une atteinte du muscle lisse vasculaire n'est pas à exclure.

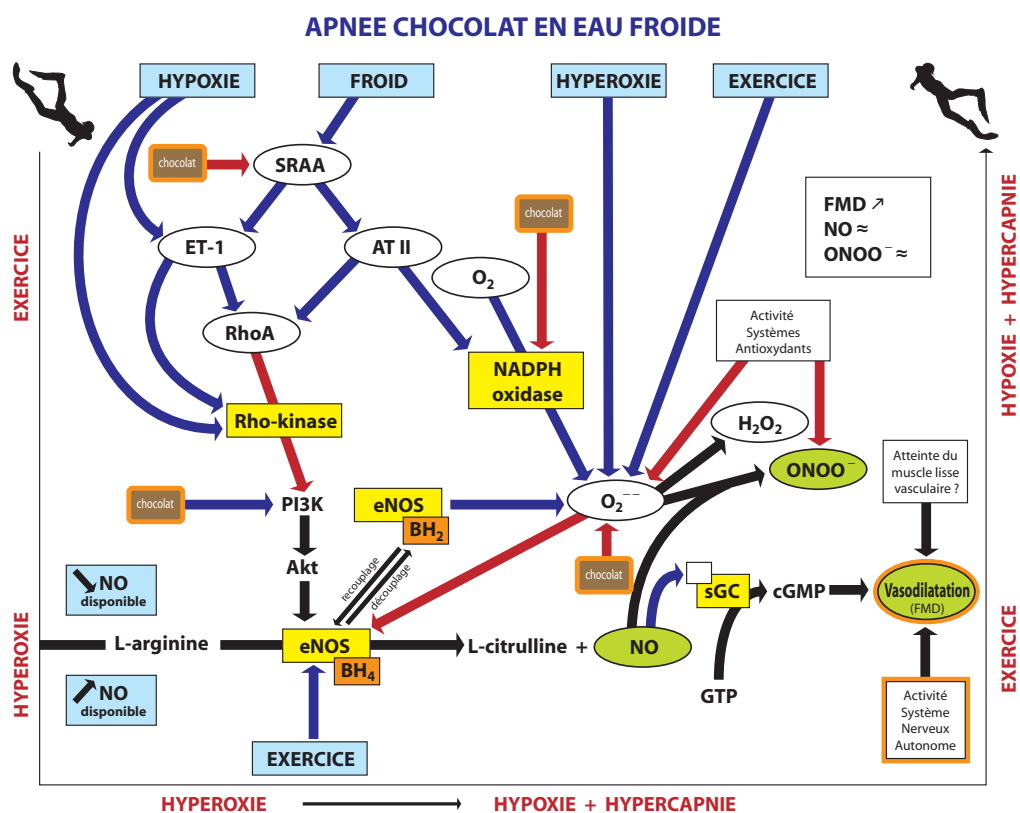


FIGURE 20 – MECANISMES SOUS-JACENTS A LA PLONGEE EN APNEE APRES INGESTION DE CHOCOLAT NOIR.

Les mêmes mécanismes précédemment expliqués sont retrouvés mais les antioxydants réduisent l'activité du système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA) et de la NADPH oxydase, activent la production de PI3K et piègent les anions superoxydes. Tous ces effets tendent à une meilleure activité de l'eNOS. Les flèches bleues correspondent à une activation / production ; les flèches rouges à une inhibition / réduction du taux. Les flèches noires indiquent une transformation. Les cercles verts correspondent aux paramètres mesurés (NO, ONOO- et FMD).

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

En conclusion, la réduction de la FMD après la plongée à l'air est confirmée. Cela sous-entend que la plongée entraîne une dysfonction endothéliale. Elle est démontrée en apnée pour la 1^{ère} fois.

Durant ces quelques dernières années, les marqueurs inflammatoires étaient analysés par de nombreux chercheurs. Ceux-ci partaient du principe que les bulles de décompression pouvaient être reconnues par l'endothélium comme un corps étranger, les mettant sur le banc des accusés comme étant la cause de la dysfonction endothéliale. Suite aux résultats que nous obtenons en apnée, nous pouvons conclure qu'il n'y a très probablement aucun lien entre les bulles de décompression et la dysfonction endothéliale. En effet, une dilatation flux-dépendante réduite est également trouvée en apnée alors que les bulles n'y sont pas présentes.

Dans tous les types de plongée, la dysfonction endothéliale peut être prévenue par l'ingestion de 30g de chocolat noir 1h avant l'apnée ou 1h30 avant la plongée à l'air. Ceci montre bien que du stress oxydant est présent également en apnée malgré que l'hyperoxie y est intermittente. Par contre, les peroxynitrites ne semblent pas être les meilleurs marqueurs pour l'évaluer. Venant de la combinaison du NO et des anions superoxydes, une carence dans l'un des deux réactifs peut amener à une réduction de production des ONOO- sans pour autant que le stress oxydant ne soit moins important. En effet, celui-ci semble être confirmé par la littérature avec d'autres marqueurs tels que les TBARS ou la SOD.

Que ce soit après une plongée à l'air ou après une série d'apnées successives, la FMD est réduite. Néanmoins, ses variations ne suivent pas celles du NO. L'hypothèse généralement admise est que la FMD est NO-dépendante. Au vu de nos résultats, nous pouvons conclure que les modifications de la FMD après la plongée, qu'elle soit à l'air ou en apnée, résultent d'un « cocktail savant » faisant intervenir les différents systèmes pro- et antioxydants dans des mesures différentes selon les conditions de plongée. De plus, une activité du système nerveux autonome activé pendant la plongée, une

adaptation cardio-vasculaire et/ou une atteinte du muscle lisse vasculaire sont probablement des facteurs à prendre en compte dans les variations de la FMD.

Pour évaluer la fonction endothéliale à court terme, la PORH est un moyen plus efficace que l'index de rigidité artérielle mesuré par photopléthysmographie. En effet, la rigidité artérielle dépend de la structure de l'endothélium qui ne varie pas sur le temps d'une plongée.

Si nous ouvrons nos perspectives à un univers plus large, nos hypothèses sont un bon modèle pour la personne âgée. Une augmentation de stress oxydant et une réduction de la fonction endothéliale sont observées chez elle. Il serait donc intéressant de prescrire une dose modérée de chocolat noir aux personnes âgées dans le but de réduire les risques cardio-vasculaires.

Quoi qu'il en soit, le chocolat est un moyen peu coûteux et assez apprécié par les plongeurs qui leur permettrait de réduire l'impact de la plongée sur le système vasculaire. Il semblerait cependant que l'endothélium soit de moins en moins impliqué dans les accidents de décompression.

REFERENCES

- Abadir PM, Carey RM, Siragy HM (2003) Angiotensin AT₂ receptors directly stimulate renal nitric oxide in bradykinin B₂-receptor-null mice. *Hypertension* 42: 600-604
- Actis-Goretta L, Ottaviani JI, Fraga CG (2006) Inhibition of angiotensin converting enzyme activity by flavanol-rich foods. *J Agric Food Chem* 54: 229-234
- Akishita M, Horiuchi M, Yamada H, Zhang L, Shirakami G, Tamura K, Ouchi Y, Dzau VJ (2000) Inflammation influences vascular remodeling through AT₂ receptor expression and signaling. *Physiological genomics* 2: 13-20
- Alaimo M, Aiello G, Marino E, Zummo L, Cappello F (2010) Taravana: documentation of bubbles by computerized tomography. *J Neurosurg Anesthesiol* 22: 271
- Allen J (2007) Photoplethysmography and its application in clinical physiological measurement. *Physiological measurement* 28: R1-39
- Andriantsitohaina R, Auger C, Chataigneau T, Etienne-Selloum N, Li H, Martinez MC, Schini-Kerth VB, Laher I (2012) Molecular mechanisms of the cardiovascular protective effects of polyphenols. *The British journal of nutrition* 108: 1532-1549
- Angermuller S, Islinger M, Volkl A (2009) Peroxisomes and reactive oxygen species, a lasting challenge. *Histochem Cell Biol* 131: 459-463
- Anselm E, Chataigneau M, Ndiaye M, Chataigneau T, Schini-Kerth VB (2007) Grape juice causes endothelium-dependent relaxation via a redox-sensitive Src- and Akt-dependent activation of eNOS. *Cardiovasc Res* 73: 404-413
- Appeldoorn MM, Venema DP, Peters TH, Koenen ME, Arts IC, Vincken JP, Gruppen H, Keijer J, Hollman PC (2009) Some phenolic compounds increase the nitric oxide level in endothelial cells in vitro. *J Agric Food Chem* 57: 7693-7699
- Arborelius M, Jr., Ballidin UI, Lilja B, Lundgren CE (1972) Hemodynamic changes in man during immersion with the head above water. *Aerospace medicine* 43: 592-598
- Atkinson G, Batterham AM, Green DJ, Thijssen DH (2009) Commentaries on viewpoint: pick your Poiseuille: normalizing the shear stimulus in studies of flow-mediated dilation. *J Appl Physiol* 107: 1362; author reply 1366
- Baba S, Natsume M, Yasuda A, Nakamura Y, Tamura T, Osakabe N, Kanegae M, Kondo K (2007) Plasma LDL and HDL cholesterol and oxidized LDL concentrations are altered in normo- and hypercholesterolemic humans after intake of different levels of cocoa powder. *The Journal of nutrition* 137: 1436-1441

- Baba S, Osakabe N, Yasuda A, Natsume M, Takizawa T, Nakamura T, Terao J (2000) Bioavailability of (-)-epicatechin upon intake of chocolate and cocoa in human volunteers. *Free radical research* 33: 635-641
- Bailey SR, Mitra S, Flavahan S, Flavahan NA (2005) Reactive oxygen species from smooth muscle mitochondria initiate cold-induced constriction of cutaneous arteries. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 289: H243-250
- Balestra C, Germonpre P, Poortmans JR, Marroni A (2006) Serum erythropoietin levels in healthy humans after a short period of normobaric and hyperbaric oxygen breathing: the "normobaric oxygen paradox". *Journal of applied physiology* 100: 512-518
- Balzer J, Rassaf T, Heiss C, Kleinbongard P, Lauer T, Merx M, Heussen N, Gross HB, Keen CL, Schroeter H, Kelm M (2008) Sustained benefits in vascular function through flavanol-containing cocoa in medicated diabetic patients a double-masked, randomized, controlled trial. *Journal of the American College of Cardiology* 51: 2141-2149
- Bardy E, Mollendorf J, Pendergast DR (2006) A comparison of the thermal resistance of a foam neoprene wetsuit to a wetsuit fabricated from aerogel/syntactic foam hybrid insulation
- Beckman JS, Koppenol WH (1996) Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 271: C1424-1437
- Berry KL, Skyrme-Jones RA, Meredith IT (2000) Occlusion cuff position is an important determinant of the time course and magnitude of human brachial artery flow-mediated dilation. *Clin Sci (Lond)* 99: 261-267
- Berry NM, Davison K, Coates AM, Buckley JD, Howe PR (2010) Impact of cocoa flavanol consumption on blood pressure responsiveness to exercise. *Br J Nutr* 103: 1480-1484
- Betik AC, Luckham VB, Hughson RL (2004) Flow-mediated dilation in human brachial artery after different circulatory occlusion conditions. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286: H442-448
- Beyer RE (1992) An analysis of the role of coenzyme Q in free radical generation and as an antioxidant. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 70: 390-403
- Blatteau JE, Barre S, Pascual A, Castagna O, Abraini JH, Risso JJ, Vallee N (2012) Protective effects of fluoxetine on decompression sickness in mice. *PloS one* 7: e49069
- Blatteau JE, Brubakk AO, Gempp E, Castagna O, Risso JJ, Vallee N (2013) Sildenafil pre-treatment promotes decompression sickness in rats. *PLoS One* 8: e60639

Blatteau JE, Gempp E, Balestra C, Mets T, Germonpre P (2008) Pre-dive sauna and venous gas bubbles upon decompression from 400 kPa. *Aviat Space Environ Med* 79: 1100-1105

Blatteau JE, Gempp E, Galland FM, Pontier JM, Sainty JM, Robinet C (2005) Aerobic exercise 2 hours before a dive to 30 msw decreases bubble formation after decompression. *Aviation, space, and environmental medicine* 76: 666-669

Boussuges A, Blanc F, Carturan D (2006) Hemodynamic changes induced by recreational scuba diving. *Chest* 129: 1337-1343

Boussuges A, Coulange M, Bessereau J, Gargne O, Ayme K, Gavarry O, Fontanari P, Joulia F (2011) Ultrasound lung comets induced by repeated breath-hold diving, a study in underwater fishermen. *Scandinavian journal of medicine & science in sports*

Boussuges A, Pontier JM, Schmid B, Dussault C (2012) Paradoxical gas embolism after SCUBA diving: Hemodynamic changes studied by echocardiography. *Scand J Med Sci Sports*

Bredt DS, Snyder SH (1994) Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu Rev Biochem* 63: 175-195

Brubakk AO, Duplancic D, Valic Z, Palada I, Obad A, Bakovic D, Wisloff U, Dujic Z (2005) A single air dive reduces arterial endothelial function in man. *The Journal of physiology* 566: 901-906

Brunner H, Cockcroft JR, Deanfield J, Donald A, Ferrannini E, Halcox J, Kiowski W, Luscher TF, Mancia G, Natali A, Oliver JJ, Pessina AC, Rizzoni D, Rossi GP, Salvetti A, Spieker LE, Taddei S, Webb DJ (2005) Endothelial function and dysfunction. Part II: Association with cardiovascular risk factors and diseases. A statement by the Working Group on Endothelins and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. *Journal of hypertension* 23: 233-246

Budzyn K, Marley PD, Sobey CG (2005) Opposing roles of endothelial and smooth muscle phosphatidylinositol 3-kinase in vasoconstriction: effects of rho-kinase and hypertension. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 313: 1248-1253

Buijsse B, Feskens EJ, Kok FJ, Kromhout D (2006) Cocoa intake, blood pressure, and cardiovascular mortality: the Zutphen Elderly Study. *Archives of internal medicine* 166: 411-417

Bulmer AC, Coombes JS, Sharman JE, Stewart IB (2008) Effects of maximal static apnea on antioxidant defenses in trained free divers. *Medicine and science in sports and exercise* 40: 1307-1313

- Burk RF (1991) Molecular biology of selenium with implications for its metabolism. *FASEB J* 5: 2274-2279
- Burton GW, Ingold KU (1984) beta-Carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science* 224: 569-573
- Busse R, Edwards G, Feletou M, Fleming I, Vanhoutte PM, Weston AH (2002) EDHF: bringing the concepts together. *Trends in pharmacological sciences* 23: 374-380
- Capelli C, Pendergast DR, Termin B (1998) Energetics of swimming at maximal speeds in humans. *European journal of applied physiology and occupational physiology* 78: 385-393
- Carrillo-Sepulveda MA, Ceravolo GS, Furstenau CR, Monteiro Pde S, Bruno-Fortes Z, Carvalho MH, Laurindo FR, Tostes RC, Webb RC, Barreto-Chaves ML (2013) Emerging role of angiotensin type 2 receptor (AT2R)/Akt/NO pathway in vascular smooth muscle cell in the hyperthyroidism. *PLoS One* 8: e61982
- Chance B, Sies H, Boveris A (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59: 527-605
- Cherniack EP (2011) Polyphenols: planting the seeds of treatment for the metabolic syndrome. *Nutrition* 27: 617-623
- Cho ES, Jang YJ, Kang NJ, Hwang MK, Kim YT, Lee KW, Lee HJ (2009) Cocoa procyanidins attenuate 4-hydroxynonenal-induced apoptosis of PC12 cells by directly inhibiting mitogen-activated protein kinase kinase 4 activity. *Free radical biology & medicine* 46: 1319-1327
- Chouchou F, Pichot V, Garet M, Barthelemy JC, Roche F (2009) Dominance in cardiac parasympathetic activity during real recreational SCUBA diving. *European journal of applied physiology* 106: 345-352
- Chuang CC, McIntosh MK (2011) Potential mechanisms by which polyphenol-rich grapes prevent obesity-mediated inflammation and metabolic diseases. *Annual review of nutrition* 31: 155-176
- Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, Pober JS, Wick TM, Konkle BA, Schwartz BS, Barnathan ES, McCrae KR, Hug BA, Schmidt AM, Stern DM (1998) Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 91: 3527-3561
- Claybaugh JR, Freund BJ, Luther G, Muller K, Bennett PB (1997) Renal and hormonal responses to exercise in man at 46 and 37 atmospheres absolute pressure. *Aviation, space, and environmental medicine* 68: 1038-1045

Coffman JD (1994) Effects of endothelium-derived nitric oxide on skin and digital blood flow in humans. *The American journal of physiology* 267: H2087-2090

Cooke JP, Dzau VJ (1997) Nitric oxide synthase: role in the genesis of vascular disease. *Annu Rev Med* 48: 489-509

Cornelissen VA, Onkelinx S, Goetschalckx K, Thomaes T, Janssens S, Fagard R, Verhamme P, Vanhees L (2012) Exercise-based cardiac rehabilitation improves endothelial function assessed by flow-mediated dilation but not by pulse amplitude tonometry. *European journal of preventive cardiology*

Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA, Deanfield J, Drexler H, Gerhard-Herman M, Herrington D, Vallance P, Vita J, Vogel R (2002) Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *Journal of the American College of Cardiology* 39: 257-265

Corretti MC, Plotnick GD, Vogel RA (1995) Technical aspects of evaluating brachial artery vasodilatation using high-frequency ultrasound. *Am J Physiol* 268: H1397-1404

Coulangue M, Hug F, Kipson N, Robinet C, Desruelle AV, Melin B, Jimenez C, Galland F, Jammes Y (2006) Consequences of prolonged total body immersion in cold water on muscle performance and EMG activity. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 452: 91-101

Craig AB, Jr., Dvorak M (1966) Thermal regulation during water immersion. *Journal of applied physiology* 21: 1577-1585

Cruz MN, Luksha L, Logman H, Poston L, Agewall S, Kublickiene K (2006) Acute responses to phytoestrogens in small arteries from men with coronary heart disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290: H1969-1975

Davies KJ, Quintanilha AT, Brooks GA, Packer L (1982) Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem Biophys Res Commun* 107: 1198-1205

Davis FM, Baddeley AD, Hancock TR (1975) Diver performance: the effect of cold. *Undersea biomedical research* 2: 195-213

De Bels D, Theunissen S, Devriendt J, Germonpre P, Lafere P, Valsamis J, Snoeck T, Meeus P, Balestra C (2012) The 'normobaric oxygen paradox': does it increase haemoglobin? *Diving and hyperbaric medicine : the journal of the South Pacific Underwater Medicine Society* 42: 67-71

de Bruijn R, Richardson M, Schagatay E (2008) Increased erythropoietin concentration after repeated apneas in humans. *European journal of applied physiology* 102: 609-613

- de Dios S, Sobey C, Drummond GR (2010) Oxidative stress and endothelial dysfunction. In: Karsan SMDaA (ed) Endothelial Dysfunction and Inflammation
- de Moraes C, Davel AP, Rossoni LV, Antunes E, Zanesco A (2008) Exercise training improves relaxation response and SOD-1 expression in aortic and mesenteric rings from high caloric diet-fed rats. *BMC physiology* 8: 12
- Demchenko IT, Boso AE, O'Neill TJ, Bennett PB, Piantadosi CA (2000) Nitric oxide and cerebral blood flow responses to hyperbaric oxygen. *J Appl Physiol* 88: 1381-1389
- Demchenko IT, Oury TD, Crapo JD, Piantadosi CA (2002) Regulation of the brain's vascular responses to oxygen. *Circulation research* 91: 1031-1037
- Dimmeler S, Assmus B, Hermann C, Haendeler J, Zeiher AM (1998) Fluid shear stress stimulates phosphorylation of Akt in human endothelial cells: involvement in suppression of apoptosis. *Circulation research* 83: 334-341
- Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM (1999) Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 399: 601-605
- Doolette DJ, Mitchell SJ (2001) The physiological kinetics of nitrogen and the prevention of decompression sickness. *Clinical pharmacokinetics* 40: 1-14
- Doshi SN, Naka KK, Payne N, Jones CJ, Ashton M, Lewis MJ, Goodfellow J (2001) Flow-mediated dilatation following wrist and upper arm occlusion in humans: the contribution of nitric oxide. *Clinical science* 101: 629-635
- Duarte J, Andriambeloson E, Diebolt M, Andriantsitohaina R (2004) Wine polyphenols stimulate superoxide anion production to promote calcium signaling and endothelial-dependent vasodilatation. *Physiol Res* 53: 595-602
- Dubroca C, You D, Levy BI, Loufrani L, Henrion D (2005) Involvement of RhoA/Rho kinase pathway in myogenic tone in the rabbit facial vein. *Hypertension* 45: 974-979
- Dujic Z, Breskovic T (2012) Impact of breath holding on cardiovascular respiratory and cerebrovascular health. *Sports medicine* 42: 459-472
- Dujic Z, Marinovic J, Obad A, Ivancev V, Breskovic T, Jovovic P, Ljubkovic M (2011) A no-decompression air dive and ultrasound lung comets. *Aviation, space, and environmental medicine* 82: 40-43
- Dujic Z, Obad A, Palada I, Valic Z, Brubakk AO (2006) A single open sea air dive increases pulmonary artery pressure and reduces right ventricular function in professional divers. *Eur J Appl Physiol* 97: 478-485

- Duthie GG, Robertson JD, Maughan RJ, Morrice PC (1990) Blood antioxidant status and erythrocyte lipid peroxidation following distance running. *Arch Biochem Biophys* 282: 78-83
- Edwards G, Feletou M, Weston AH (2010) Endothelium-derived hyperpolarising factors and associated pathways: a synopsis. *Pflugers Arch* 459: 863-879
- Ellman G, Lysko H (1979) A precise method for the determination of whole blood and plasma sulfhydryl groups. *Anal Biochem* 93: 98-102
- Engan HK, Jones AM, Ehrenberg F, Schagatay E (2012) Acute dietary nitrate supplementation improves dry static apnea performance. *Respir Physiol Neurobiol* 182: 53-59
- Engler MB, Engler MM, Chen CY, Malloy MJ, Browne A, Chiu EY, Kwak HK, Milbury P, Paul SM, Blumberg J, Mietus-Snyder ML (2004) Flavonoid-rich dark chocolate improves endothelial function and increases plasma epicatechin concentrations in healthy adults. *J Am Coll Nutr* 23: 197-204
- Faridi Z, Njike VY, Dutta S, Ali A, Katz DL (2008) Acute dark chocolate and cocoa ingestion and endothelial function: a randomized controlled crossover trial. *The American journal of clinical nutrition* 88: 58-63
- Ferdinandy P, Danial H, Ambrus I, Rothery RA, Schulz R (2000) Peroxynitrite is a major contributor to cytokine-induced myocardial contractile failure. *Circ Res* 87: 241-247
- Ferrer MD, Sureda A, Batle JM, Tauler P, Tur JA, Pons A (2007) Scuba diving enhances endogenous antioxidant defenses in lymphocytes and neutrophils. *Free Radic Res* 41: 274-281
- Ferrigno M, Hickey DD, Liner MH, Lundgren CE (1986) Cardiac performance in humans during breath holding. *Journal of applied physiology* 60: 1871-1877
- Fisher ND, Hughes M, Gerhard-Herman M, Hollenberg NK (2003) Flavanol-rich cocoa induces nitric-oxide-dependent vasodilation in healthy humans. *Journal of hypertension* 21: 2281-2286
- Fismen L, Eide T, Hjelde A, Svardal AM, Djurhuus R (2013) Hyperoxia but not ambient pressure decreases tetrahydrobiopterin level without affecting the enzymatic capability of nitric oxide synthase in human endothelial cells. *European journal of applied physiology*
- Fitzpatrick DF, Hirschfield SL, Coffey RG (1993) Endothelium-dependent vasorelaxing activity of wine and other grape products. *Am J Physiol* 265: H774-778

- Flammer AJ, Hermann F, Sudano I, Spieker L, Hermann M, Cooper KA, Serafini M, Luscher TF, Ruschitzka F, Noll G, Corti R (2007) Dark chocolate improves coronary vasomotion and reduces platelet reactivity. *Circulation* 116: 2376-2382
- Forstermann U (2010) Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflugers Arch* 459: 923-939
- Forstermann U, Munzel T (2006) Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation* 113: 1708-1714
- Foster GE, Sheel AW (2005) The human diving response, its function, and its control. *Scandinavian journal of medicine & science in sports* 15: 3-12
- Frassi F, Pingitore A, Cialoni D, Picano E (2008) Chest sonography detects lung water accumulation in healthy elite apnea divers. *Journal of the American Society of Echocardiography : official publication of the American Society of Echocardiography* 21: 1150-1155
- Fujii K, Ohmori S, Tominaga M, Abe I, Takata Y, Ohya Y, Kobayashi K, Fujishima M (1993) Age-related changes in endothelium-dependent hyperpolarization in the rat mesenteric artery. *Am J Physiol* 265: H509-516
- Fujii K, Tominaga M, Ohmori S, Kobayashi K, Koga T, Takata Y, Fujishima M (1992) Decreased endothelium-dependent hyperpolarization to acetylcholine in smooth muscle of the mesenteric artery of spontaneously hypertensive rats. *Circ Res* 70: 660-669
- Furchgott RF, Zawadzki JV (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-376
- Galley HF, Webster NR (2004) Physiology of the endothelium. *Br J Anaesth* 93: 105-113
- Gennser M, Jurd KM, Blogg SL (2012) Pre-dive exercise and post-dive evolution of venous gas emboli. *Aviation, space, and environmental medicine* 83: 30-34
- Germonpre P, Pontier JM, Gempp E, Blatteau JE, Deneweth S, Lafere P, Marroni A, Balestra C (2009) Pre-dive vibration effect on bubble formation after a 30-m dive requiring a decompression stop. *Aviation, space, and environmental medicine* 80: 1044-1048
- Glavas D, Bakovic D, Obad A, Palada I, Breskovic T, Valic Z, Brubakk AO, Dujic Z (2009) Effects of tetrahydrobiopterin on venous bubble grade and acute diving-induced changes in cardiovascular function. *Clin Physiol Funct Imaging* 29: 100-107
- Gole Y, Gargne O, Coulange M, Steinberg JG, Bouhaddi M, Jammes Y, Regnard J, Boussuges A (2011) Hyperoxia-induced alterations in cardiovascular function and autonomic control during return to normoxic breathing. *European journal of applied physiology* 111: 937-946

- Gole Y, Louge P, Boussuges A (2009a) Specific diving training-induced arterial circulation changes. *British journal of sports medicine* 43: 526-530
- Gole Y, Rossi P, Fontanari P, Gavarry O, Boussuges A (2009b) Arterial compliance in divers exposed to repeated hyperoxia using rebreather equipment. *Aviation, space, and environmental medicine* 80: 482-484
- Goto K, Fujii K, Onaka U, Abe I, Fujishima M (2000a) Angiotensin-converting enzyme inhibitor prevents age-related endothelial dysfunction. *Hypertension* 36: 581-587
- Goto K, Fujii K, Onaka U, Abe I, Fujishima M (2000b) Renin-angiotensin system blockade improves endothelial dysfunction in hypertension. *Hypertension* 36: 575-580
- Grassi D, Desideri G, Necozione S, Ruggieri F, Blumberg JB, Stornello M, Ferri C (2012) Protective effects of flavanol-rich dark chocolate on endothelial function and wave reflection during acute hyperglycemia. *Hypertension* 60: 827-832
- Grassi D, Necozione S, Lippi C, Croce G, Valeri L, Pasqualetti P, Desideri G, Blumberg JB, Ferri C (2005) Cocoa reduces blood pressure and insulin resistance and improves endothelium-dependent vasodilation in hypertensives. *Hypertension* 46: 398-405
- Gratton JP, Fontana J, O'Connor DS, Garcia-Cardena G, McCabe TJ, Sessa WC (2000) Reconstitution of an endothelial nitric-oxide synthase (eNOS), hsp90, and caveolin-1 complex in vitro. Evidence that hsp90 facilitates calmodulin stimulated displacement of eNOS from caveolin-1. *J Biol Chem* 275: 22268-22272
- Griendling KK, FitzGerald GA (2003) Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation* 108: 1912-1916
- Guerrero F, Thioub S, Goanvec C, Theunissen S, Feray A, Balestra C, Mansourati J (2012) Effect of tetrahydrobiopterin and exercise training on endothelium-dependent vasorelaxation in SHR. *J Physiol Biochem*
- Gutteridge JM, Halliwell B (2010) Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. *Biochem Biophys Res Commun* 393: 561-564
- Han JA, Seo EY, Kim HJ, Park SJ, Yoo HY, Kim JY, Shin DM, Kim JK, Zhang YH, Kim SJ (2013) Hypoxia-augmented constriction of deep femoral artery mediated by inhibition of eNOS in smooth muscle. *American journal of physiology Cell physiology* 304: C78-88
- Hanasaki Y, Ogawa S, Fukui S (1994) The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radic Biol Med* 16: 845-850
- Hardy JD, Dubois EF (1937a) Basal metabolism, radiation, convection and vaporization at temperatures of 22 to 35C. *The Journal of nutrition* 15: 477-497
- Hardy JD, Dubois EF (1937b) Regulation of Heat Loss from the Human Body. (1937). *Proc Natl Acad Sci U S A* 23: 624-631

- Harris RA, Nishiyama SK, Wray DW, Richardson RS (2010) Ultrasound assessment of flow-mediated dilation. *Hypertension* 55: 1075-1085
- Harrison DG, Gongora MC (2009) Oxidative stress and hypertension. *The Medical clinics of North America* 93: 621-635
- Heiss C, Dejam A, Kleinbongard P, Schewe T, Sies H, Kelm M (2003) Vascular effects of cocoa rich in flavan-3-ols. *Jama* 290: 1030-1031
- Heiss C, Finis D, Kleinbongard P, Hoffmann A, Rassaf T, Kelm M, Sies H (2007) Sustained increase in flow-mediated dilation after daily intake of high-flavanol cocoa drink over 1 week. *J Cardiovasc Pharmacol* 49: 74-80
- Heiss C, Kleinbongard P, Dejam A, Perre S, Schroeter H, Sies H, Kelm M (2005) Acute consumption of flavanol-rich cocoa and the reversal of endothelial dysfunction in smokers. *J Am Coll Cardiol* 46: 1276-1283
- Hermann F, Spieker LE, Ruschitzka F, Sudano I, Hermann M, Binggeli C, Luscher TF, Riesen W, Noll G, Corti R (2006) Dark chocolate improves endothelial and platelet function. *Heart* 92: 119-120
- Heylen E, Guerrero F, Mansourati J, Theron M, Thioub S, Saiag B (2008) Effect of training frequency on endothelium-dependent vasorelaxation in rats. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 15: 52-58
- Hlastala MP (1996) Ventilation/perfusion: from the bench to the patient. *Cardiologia* 41: 405-415
- Hodges GJ, Zhao K, Kosiba WA, Johnson JM (2006) The involvement of nitric oxide in the cutaneous vasoconstrictor response to local cooling in humans. *J Physiol* 574: 849-857
- Holt RR, Schramm DD, Keen CL, Lazarus SA, Schmitz HH (2002) Chocolate consumption and platelet function. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 287: 2212-2213
- Hood WB, Jr., Murray RH, Urchel CW, Bowers JA, Goldman JK (1968) Circulatory effects of water immersion upon human subjects. *Aerospace medicine* 39: 579-584
- Hooker SK, Fahlman A, Moore MJ, de Soto NA, de Quiros YB, Brubakk AO, Costa DP, Costidis AM, Dennison S, Falke KJ, Fernandez A, Ferrigno M, Fitz-Clarke JR, Garner MM, Houser DS, Jepson PD, Ketten DR, Kvadsheim PH, Madsen PT, Pollock NW, Rotstein DS, Rowles TK, Simmons SE, Van Bonn W, Weathersby PK, Weise MJ, Williams TM, Tyack PL (2012) Deadly diving? Physiological and behavioural management of decompression stress in diving mammals. *Proc Biol Sci* 279: 1041-1050
- Huang A, Sun D, Koller A (2000) Shear stress-induced release of prostaglandin H(2) in arterioles of hypertensive rats. *Hypertension* 35: 925-930

Hurford WE, Hong SK, Park YS, Ahn DW, Shiraki K, Mohri M, Zapol WM (1990) Splenic contraction during breath-hold diving in the Korean ama. *Journal of applied physiology* 69: 932-936

Ilan E, Tirosh O, Madar Z (2005) Triacylglycerol-mediated oxidative stress inhibits nitric oxide production in rat isolated hepatocytes. *J Nutr* 135: 2090-2095

Incropera FP, DeWitt DP, Bergman TL, Lavine SA (2007) *Introduction to Heat Transfer*. John Wiley & Sons, Inc.

IUPS TC (2001) *Glossary of terms for thermal physiology*. Third edition. Revised by The Commission for Thermal Physiology of the International Union of Physiological Sciences (IUPS Thermal Commission). *The Japanese Journal of Physiology* 51: 245-280

Jamieson D, Chance B, Cadenas E, Boveris A (1986) The relation of free radical production to hyperoxia. *Annu Rev Physiol* 48: 703-719

Jenkins NT, Witkowski S, Spangenburg EE, Hagberg JM (2009) Effects of acute and chronic endurance exercise on intracellular nitric oxide in putative endothelial progenitor cells: role of NADPH oxidase. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 297: H1798-1805

Jenkins RR (1988) Free radical chemistry. Relationship to exercise. *Sports Med* 5: 156-170

Joannides R, Haefeli WE, Linder L, Richard V, Bakkali EH, Thuillez C, Luscher TF (1995) Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation* 91: 1314-1319

Joulia F, Steinberg JG, Faucher M, Jamin T, Ulmer C, Kipson N, Jammes Y (2003) Breath-hold training of humans reduces oxidative stress and blood acidosis after static and dynamic apnea. *Respiratory physiology & neurobiology* 137: 19-27

Joulia F, Steinberg JG, Wolff F, Gavarry O, Jammes Y (2002) Reduced oxidative stress and blood lactic acidosis in trained breath-hold human divers. *Respir Physiol Neurobiol* 133: 121-130

Jurd KM, Thacker JC, Seddon FM, Gennser M, Loveman GA (2011) The effect of pre-dive exercise timing, intensity and mode on post-decompression venous gas emboli. *Diving and hyperbaric medicine : the journal of the South Pacific Underwater Medicine Society* 41: 183-188

Kagan VE, Fabisiak JP, Quinn PJ (2000) Co-enzyme Q and vitamin E need each other as antioxidants. *Protoplasma* 214: 11-18

Kambayashi Y, Bardhan S, Takahashi K, Tsuzuki S, Inui H, Hamakubo T, Inagami T (1993) Molecular cloning of a novel angiotensin II receptor isoform involved in

phosphotyrosine phosphatase inhibition. *The Journal of biological chemistry* 268: 24543-24546

Kane MO, Etienne-Selloum N, Madeira SV, Sarr M, Walter A, Dal-Ros S, Schott C, Chataigneau T, Schini-Kerth VB (2010) Endothelium-derived contracting factors mediate the Ang II-induced endothelial dysfunction in the rat aorta: preventive effect of red wine polyphenols. *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 459: 671-679

Kansui Y, Fujii K, Goto K, Abe I, Iida M (2002) Angiotensin II receptor antagonist improves age-related endothelial dysfunction. *J Hypertens* 20: 439-446

Karim M, McCormick K, Kappagoda CT (2000) Effects of cocoa extracts on endothelium-dependent relaxation. *J Nutr* 130: 2105S-2108S

Katusic ZS, Shepherd JT, Vanhoutte PM (1988) Endothelium-dependent contractions to calcium ionophore A23187, arachidonic acid, and acetylcholine in canine basilar arteries. *Stroke* 19: 476-479

Khan SA, Lee K, Minhas KM, Gonzalez DR, Raju SV, Tejani AD, Li D, Berkowitz DE, Hare JM (2004) Neuronal nitric oxide synthase negatively regulates xanthine oxidoreductase inhibition of cardiac excitation-contraction coupling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 15944-15948

Khoo NK, White CR, Pozzo-Miller L, Zhou F, Constance C, Inoue T, Patel RP, Parks DA (2010) Dietary flavonoid quercetin stimulates vasorelaxation in aortic vessels. *Free Radic Biol Med* 49: 339-347

Klinge CM, Wickramasinghe NS, Ivanova MM, Dougherty SM (2008) Resveratrol stimulates nitric oxide production by increasing estrogen receptor alpha-Src-caveolin-1 interaction and phosphorylation in human umbilical vein endothelial cells. *FASEB J* 22: 2185-2197

Kojda G, Harrison D (1999) Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc Res* 43: 562-571

Konishi M, Su C (1983) Role of endothelium in dilator responses of spontaneously hypertensive rat arteries. *Hypertension* 5: 881-886

Kris-Etherton PM, Keen CL (2002) Evidence that the antioxidant flavonoids in tea and cocoa are beneficial for cardiovascular health. *Curr Opin Lipidol* 13: 41-49

Kuhlmann CR, Schaefer CA, Kosok C, Abdallah Y, Walther S, Ludders DW, Neumann T, Tillmanns H, Schafer C, Piper HM, Erdogan A (2005) Quercetin-induced induction of the NO/cGMP pathway depends on Ca²⁺-activated K⁺ channel-induced hyperpolarization-mediated Ca²⁺-entry into cultured human endothelial cells. *Planta Med* 71: 520-524

- Kuznetsova T, Szczesny G, Thijs L, Jozeau D, D'hooge J, Staessen JA (2011) Assessment of peripheral vascular function with photoplethysmographic pulse amplitude. *Artery Research* 5: 58-64
- Lambrechts K, Germonpre P, Charbel B, Cialoni D, Musimu P, Sponsiello N, Marroni A, Pastouret F, Balestra C (2011) Ultrasound lung "comets" increase after breath-hold diving. *European journal of applied physiology* 111: 707-713
- Lambrechts K, Pontier JM, Balestra C, Mazur A, Wang Q, Buzzacott P, Théron M, Mansourati J, Guerrero F (2013) Effect of a single, open-sea, air SCUBA dive on human micro- and macro-vascular function. . *Eur J Appl Physiol*
- Landmesser U, Dikalov S, Price SR, McCann L, Fukai T, Holland SM, Mitch WE, Harrison DG (2003) Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest* 111: 1201-1209
- Lanphier EH, Bookspan J (1999) Carbon dioxide retention. In: Lundgren CEG, Miller JN (eds) *The Lung at depth*. Dekker, New York, pp. 211-236
- Laufs U, La Fata V, Plutzky J, Liao JK (1998) Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation* 97: 1129-1135
- Lehoux S, Tedgui A (2004) [Shear and signal transduction in the endothelial cell]. *Medecine sciences : M/S* 20: 551-556
- Leikert JF, Räthel TR, Wohlfart P, Cheynier V, Vollmar AM, Dirsch VM (2002) Red wine polyphenols enhance endothelial nitric oxide synthase expression and subsequent nitric oxide release from endothelial cells. *Circulation* 106: 1614-1617
- Lemaitre F, Fahlman A, Gardette B, Kohshi K (2009) Decompression sickness in breath-hold divers: a review. *Journal of sports sciences* 27: 1519-1534
- Li H, Forstermann U (2009) Prevention of atherosclerosis by interference with the vascular nitric oxide system. *Curr Pharm Des* 15: 3133-3145
- Lieberman EH, Gerhard MD, Uehata A, Selwyn AP, Ganz P, Yeung AC, Creager MA (1996) Flow-induced vasodilation of the human brachial artery is impaired in patients <40 years of age with coronary artery disease. *Am J Cardiol* 78: 1210-1214
- Lindholm P, Lundgren CE (2009) The physiology and pathophysiology of human breath-hold diving. *Journal of applied physiology* 106: 284-292
- Lindholm P, Nyren S (2005) Studies on inspiratory and expiratory glossopharyngeal breathing in breath-hold divers employing magnetic resonance imaging and spirometry. *European journal of applied physiology* 94: 646-651
- Ljubkovic M, Gaustad SE, Marinovic J, Obad A, Ivancev V, Bilopavlovic N, Breskovic T, Wisloff U, Brubakk A, Dujic Z (2010) Ultrasonic evidence of acute interstitial lung edema

after SCUBA diving is resolved within 2-3h. *Respiratory physiology & neurobiology* 171: 165-170

Llaurado G, Ceperuelo-Mallafre V, Vilardell C, Simo R, Albert L, Berlanga E, Vendrell J, Gonzalez-Clemente JM (2013) Impaired endothelial function is not associated with arterial stiffness in adults with type 1 diabetes. *Diabetes & metabolism*

Loset A, Jr., Mollerlokken A, Berge V, Wisloff U, Brubakk AO (2006) Post-dive bubble formation in rats: effects of exercise 24 h ahead repeated 30 min before the dive. *Aviat Space Environ Med* 77: 905-908

Luscher TF, Boulanger CM, Dohi Y, Yang ZH (1992) Endothelium-derived contracting factors. *Hypertension* 19: 117-130

Machlin LJ, Bendich A (1987) Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB J* 1

Madden D, Lozo M, Dujic Z, Ljubkovic M (2013) Exercise after SCUBA diving increases the incidence of arterial gas embolism. *Journal of applied physiology*

Madden LA, Christmas BC, Mellor D, Vince RV, Midgley AW, McNaughton LR, Atkin SL, Laden G (2010) Endothelial function and stress response after simulated dives to 18 msw breathing air or oxygen. *Aviat Space Environ Med* 81: 41-45

Madeira SV, Auger C, Anselm E, Chataigneau M, Chataigneau T, Soares de Moura R, Schini-Kerth VB (2009) eNOS activation induced by a polyphenol-rich grape skin extract in porcine coronary arteries. *J Vasc Res* 46: 406-416

Marabotti C, Belardinelli A, L'Abbate A, Scalzini A, Chiesa F, Cialoni D, Passera M, Bedini R (2008) Cardiac function during breath-hold diving in humans: an echocardiographic study. *Undersea & hyperbaric medicine : journal of the Undersea and Hyperbaric Medical Society, Inc* 35: 83-90

Marabotti C, Chiesa F, Scalzini A, Antonelli F, Lari R, Franchini C, Data PG (1999) Cardiac and humoral changes induced by recreational scuba diving. *Undersea Hyperb Med* 26: 151-158

Marabotti C, Scalzini A, Cialoni D, Passera M, L'Abbate A, Bedini R (2009) Cardiac changes induced by immersion and breath-hold diving in humans. *J Appl Physiol* 106: 293-297

Marinovic J, Ljubkovic M, Breskovic T, Gunjaca G, Obad A, Modun D, Bilopavlovic N, Tsikas D, Dujic Z (2012) Effects of successive air and nitrox dives on human vascular function. *European journal of applied physiology* 112: 2131-2137

- Marinovic J, Ljubkovic M, Obad A, Breskovic T, Salamunic I, Denoble PJ, Dujic Z (2010) Assessment of extravascular lung water and cardiac function in trimix SCUBA diving. *Medicine and science in sports and exercise* 42: 1054-1061
- Matsuda M, Nakayama H, Arita H, Morlock JF, Claybaugh J, Smith RM, Hong SK (1978) Physiological responses to head-out immersion in water at 11 ATA. *Undersea biomedical research* 5: 37-52
- McCay PB (1985) Vitamin E: interactions with free radicals and ascorbate. *Annual review of nutrition* 5: 323-340
- McCord JM, Fridovich I (1969) The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. *J Biol Chem* 244: 6056-6063
- McCrory P, Matser E, Cantu R, Ferrigno M (2004) Sports neurology. *Lancet neurology* 3
- McQuillan LP, Leung GK, Marsden PA, Kostyk SK, Kourembanas S (1994) Hypoxia inhibits expression of eNOS via transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *The American journal of physiology* 267: H1921-1927
- Middleton E, Jr., Kandaswami C, Theoharides TC (2000) The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological reviews* 52: 673-751
- Millasseau SC, Kelly RP, Ritter JM, Chowienczyk PJ (2002) Determination of age-related increases in large artery stiffness by digital pulse contour analysis. *Clin Sci (Lond)* 103: 371-377
- Miller VM, Vanhoutte PM (1985) Endothelium-dependent contractions to arachidonic acid are mediated by products of cyclooxygenase. *Am J Physiol* 248: H432-437
- Mitchell JA, Ali F, Bailey L, Moreno L, Harrington LS (2008) Role of nitric oxide and prostacyclin as vasoactive hormones released by the endothelium. *Experimental physiology* 93: 141-147
- Modun D, Krnic M, Vukovic J, Kokic V, Kukoc-Modun L, Tsikas D, Dujic Z (2012) Plasma nitrite concentration decreases after hyperoxia-induced oxidative stress in healthy humans. *Clinical physiology and functional imaging* 32: 404-408
- Mollerlokken A, Berge VJ, Jørgensen A, Wisløff U, Brubakk AO (2006) Effect of a short-acting NO donor on bubble formation from a saturation dive in pigs. *J Appl Physiol* 101: 1541-1545
- Monagas M, Khan N, Andres-Lacueva C, Casas R, Urpi-Sarda M, Llorach R, Lamuela-Raventos RM, Estruch R (2009) Effect of cocoa powder on the modulation of

inflammatory biomarkers in patients at high risk of cardiovascular disease. *The American journal of clinical nutrition* 90: 1144-1150

Monahan KD, Feehan RP, Kunselman AR, Preston AG, Miller DL, Lott ME (2011) Dose-dependent increases in flow-mediated dilation following acute cocoa ingestion in healthy older adults. *Journal of applied physiology* 111: 1568-1574

Moon RE, Gray LL (2010) Breath-hold diving and cerebral decompression illness. *Undersea Hyperb Med* 37: 1-5

Morabito C, Bosco G, Pilla R, Corona C, Mancinelli R, Yang Z, Camporesi EM, Fano G, Mariggio MA (2011) Effect of pre-breathing oxygen at different depth on oxidative status and calcium concentration in lymphocytes of scuba divers. *Acta physiologica* 202: 69-78

Morrison AR, Moritz H, Needleman P (1978) Mechanism of enhanced renal prostaglandin biosynthesis in ureter obstruction. Role of de novo protein synthesis. *J Biol Chem* 253: 8210-8212

Mourot L, Gole Y, Louge P, Fontanari P, Regnard J, Boussuges A (2009) Military diving training improved arterial compliance. *International journal of sports medicine* 30: 455-460

Mourot L, Wolf JP, Galland F, Robinet C, Courtiere A, Bouhaddi M, Meliet JL, Regnard J (2004) Short-term vasomotor adjustments to post immersion dehydration are hindered by natriuretic peptides. *Undersea Hyperb Med* 31: 203-210

Mullen MJ, Kharbanda RK, Cross J, Donald AE, Taylor M, Vallance P, Deanfield JE, MacAllister RJ (2001) Heterogenous nature of flow-mediated dilatation in human conduit arteries in vivo: relevance to endothelial dysfunction in hypercholesterolemia. *Circulation research* 88: 145-151

Murad F (2006) Shattuck Lecture. Nitric oxide and cyclic GMP in cell signaling and drug development. *N Engl J Med* 355: 2003-2011

Murphy TJ, Takeuchi K, Alexander RW (1992) Molecular cloning of AT1 angiotensin receptors. *American journal of hypertension* 5: 236S-242S

NAVSEA (2008) The air decompression table. In: NAVSEA (ed) *US Navy Diving Manual (Revision 6)*: SS521-AG-PRO-010/0910-LP-106-0957. US Navy, p. 62

Ndiaye M, Chataigneau M, Lobysheva I, Chataigneau T, Schini-Kerth VB (2005) Red wine polyphenol-induced, endothelium-dependent NO-mediated relaxation is due to the redox-sensitive PI3-kinase/Akt-dependent phosphorylation of endothelial NO-synthase in the isolated porcine coronary artery. *FASEB J* 19: 455-457

Nicholas WW, O'Rourke MF, McDonald DA (1990) McDonald's blood flow in arteries : theoretic, experimental, and clinical principles. Lea & Febiger, Philadelphia

Nicholson SK, Tucker GA, Brameld JM (2010) Physiological concentrations of dietary polyphenols regulate vascular endothelial cell expression of genes important in cardiovascular health. *Br J Nutr* 103: 1398-1403

Nishida K, Harrison DG, Navas JP, Fisher AA, Dockery SP, Uematsu M, Nerem RM, Alexander RW, Murphy TJ (1992) Molecular cloning and characterization of the constitutive bovine aortic endothelial cell nitric oxide synthase. *J Clin Invest* 90: 2092-2096

Nohl H, Hegner D, Summer KH (1979) Responses of mitochondrial superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities to aging. *Mechanisms of ageing and development* 11: 145-151

Noon JP, Haynes WG, Webb DJ, Shore AC (1996) Local inhibition of nitric oxide generation in man reduces blood flow in finger pulp but not in hand dorsum skin. *The Journal of physiology* 490 (Pt 2): 501-508

Nossum V, Hjelde A, Brubakk AO (2002) Small amounts of venous gas embolism cause delayed impairment of endothelial function and increase polymorphonuclear neutrophil infiltration. *Eur J Appl Physiol* 86: 209-214

Nossum V, Koteng S, Brubakk AO (1999) Endothelial damage by bubbles in the pulmonary artery of the pig. *Undersea Hyperb Med* 26: 1-8

O'Brien C, Young AJ, Lee DT, Shitzer A, Sawka MN, Pandolf KB (2000) Role of core temperature as a stimulus for cold acclimation during repeated immersion in 20 degrees C water. *Journal of applied physiology* 89: 242-250

Obad A, Marinovic J, Ljubkovic M, Breskovic T, Modun D, Boban M, Dujic Z (2010) Successive deep dives impair endothelial function and enhance oxidative stress in man. *Clinical physiology and functional imaging* 30: 432-438

Obad A, Palada I, Valic Z, Ivancev V, Bakovic D, Wisloff U, Brubakk AO, Dujic Z (2007a) The effects of acute oral antioxidants on diving-induced alterations in human cardiovascular function. *The Journal of physiology* 578: 859-870

Obad A, Valic Z, Palada I, Brubakk AO, Modun D, Dujic Z (2007b) Antioxidant pretreatment and reduced arterial endothelial dysfunction after diving. *Aviat Space Environ Med* 78: 1114-1120

Onaka U, Fujii K, Abe I, Fujishima M (1998) Antihypertensive treatment improves endothelium-dependent hyperpolarization in the mesenteric artery of spontaneously hypertensive rats. *Circulation* 98: 175-182

Oury TD, Ho YS, Piantadosi CA, Crapo JD (1992) Extracellular superoxide dismutase, nitric oxide, and central nervous system O₂ toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 9715-9719

Overgaard K, Friis S, Pedersen RB, Lykkeboe G (2006) Influence of lung volume, glossopharyngeal inhalation and P(ET) O₂ and P(ET) CO₂ on apnea performance in trained breath-hold divers. *European journal of applied physiology* 97: 158-164

Padilla J, Johnson BD, Newcomer SC, Wilhite DP, Mickleborough TD, Fly AD, Mather KJ, Wallace JP (2008) Normalization of flow-mediated dilation to shear stress area under the curve eliminates the impact of variable hyperemic stimulus. *Cardiovasc Ultrasound* 6: 44

Papapetropoulos A, Garcia-Cardena G, Madri JA, Sessa WC (1997) Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J Clin Invest* 100: 3131-3139

Pearson KJ, Baur JA, Lewis KN, Peshkin L, Price NL, Labinskyy N, Swindell WR, Kamara D, Minor RK, Perez E, Jamieson HA, Zhang Y, Dunn SR, Sharma K, Pleshko N, Woollett LA, Csiszar A, Ikeno Y, Le Couteur D, Elliott PJ, Becker KG, Navas P, Ingram DK, Wolf NS, Ungvari Z, Sinclair DA, de Cabo R (2008) Resveratrol delays age-related deterioration and mimics transcriptional aspects of dietary restriction without extending life span. *Cell metabolism* 8: 157-168

Pellegrin M, Mazzolai L, Berthelot A, Laurant P (2009) Dysfonction endothéliale et risque cardiovasculaire. L'exercice protège la fonction endothéliale et prévient la maladie cardiovasculaire. *Science & Sports* 24: 63-73

Pendergast D, Zamparo P, di Prampero PE, Capelli C, Cerretelli P, Termin A, Craig A, Jr., Bushnell D, Paschke D, Mollendorf J (2003a) Energy balance of human locomotion in water. *European journal of applied physiology* 90: 377-386

Pendergast DR (1988) The effect of body cooling on oxygen transport during exercise. *Medicine and science in sports and exercise* 20: S171-176

Pendergast DR, Krasney JA, DeRoberts D (1999) Effects of immersion in cool water on lung-exhaled nitric oxide at rest and during exercise. *Respiration physiology* 115: 73-81

Pendergast DR, Lundgren CE (2009) The underwater environment: cardiopulmonary, thermal, and energetic demands. *Journal of applied physiology* 106: 276-283

Pendergast DR, Mollendorf J, Logue C, Samimy S (2003b) Evaluation of fins used in underwater swimming. *Undersea & hyperbaric medicine : journal of the Undersea and Hyperbaric Medical Society, Inc* 30: 57-73

- Pendergast DR, Senf C, Lundgren CE (2012) Is the rate of whole-body nitrogen elimination influenced by exercise? *Undersea & hyperbaric medicine : journal of the Undersea and Hyperbaric Medical Society, Inc* 39: 595-604
- Perez-Vizcaino F, Duarte J, Andriantsitohaina R (2006) Endothelial function and cardiovascular disease: effects of quercetin and wine polyphenols. *Free Radic Res* 40: 1054-1065
- Perez-Vizcaino F, Duarte J, Jimenez R, Santos-Buelga C, Osuna A (2009) Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin. *Pharmacol Rep* 61: 67-75
- Piantadosi CA (2012) Regulation of mitochondrial processes by protein S-nitrosylation. *Biochimica et biophysica acta* 1820: 712-721
- Pisarcik S, Maylor J, Lu W, Yun X, Udem C, Sylvester JT, Semenza GL, Shimoda LA (2013) Activation of hypoxia-inducible factor-1 in pulmonary arterial smooth muscle cells by endothelin-1. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 304: L549-561
- Pontier JM, Guerrero F, Castagna O (2009) Bubble formation and endothelial function before and after 3 months of dive training. *Aviation, space, and environmental medicine* 80: 15-19
- Potkin R, Cheng V, Siegel R (2007) Effects of glossopharyngeal insufflation on cardiac function: an echocardiographic study in elite breath-hold divers. *Journal of applied physiology* 103: 823-827
- Pou S, Pou WS, Bredt DS, Snyder SH, Rosen GM (1992) Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 267: 24173-24176
- Pyke KE, Tschakovsky ME (2005) The relationship between shear stress and flow-mediated dilatation: implications for the assessment of endothelial function. *J Physiol* 568: 357-369
- Pyke KE, Tschakovsky ME (2007) Peak vs. total reactive hyperemia: which determines the magnitude of flow-mediated dilation? *Journal of applied physiology* 102: 1510-1519
- Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA (1991a) Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem* 266: 4244-4250
- Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA (1991b) Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 288: 481-487
- Raitakari OT, Celermajer DS (2000a) Flow-mediated dilatation. *Br J Clin Pharmacol* 50: 397-404

Raitakari OT, Celermajer DS (2000b) Testing for endothelial dysfunction. *Ann Med* 32: 293-304

Ramirez-Sanchez I, Maya L, Ceballos G, Villarreal F (2010) (-)-epicatechin activation of endothelial cell endothelial nitric oxide synthase, nitric oxide, and related signaling pathways. *Hypertension* 55: 1398-1405

Rasdal KV, Hjelde A, Mollerlokken A, Lundset N, Brubakk AO (2009) Aortic function in rats after decompression without ultrasonically detectable bubble formation. *Aviat Space Environ Med* 80: 1006-1011

Rigamonti E, Touvier T, Clementi E, Manfredi AA, Brunelli S, Rovere-Querini P (2013) Requirement of inducible nitric oxide synthase for skeletal muscle regeneration after acute damage. *Journal of immunology* 190: 1767-1777

Romero M, Jimenez R, Sanchez M, Lopez-Sepulveda R, Zarzuelo MJ, O'Valle F, Zarzuelo A, Perez-Vizcaino F, Duarte J (2009) Quercetin inhibits vascular superoxide production induced by endothelin-1: Role of NADPH oxidase, uncoupled eNOS and PKC. *Atherosclerosis* 202: 58-67

Rossi P, Boussuges A (2005) Hyperoxia-induced arterial compliance decrease in healthy man. *Clin Physiol Funct Imaging* 25: 10-15

Rousseau AS, Richer C, Richard MJ, Favier A, Margaritis I (2006) Plasma glutathione peroxidase activity as a potential indicator of hypoxic stress in breath-hold diving. *Aviation, space, and environmental medicine* 77: 551-555

Rubner M (1982) The laws of energy conservation in nutrition. Academic Press, INC (London) LTD., London

Rush JW, Green HJ, Maclean DA, Code LM (2005) Oxidative stress and nitric oxide synthase in skeletal muscles of rats with post-infarction, compensated chronic heart failure. *Acta Physiol Scand* 185: 211-218

Sanchez FA, Savalia NB, Duran RG, Lal BK, Boric MP, Duran WN (2006) Functional significance of differential eNOS translocation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291: H1058-1064

Schachinger V, Britten MB, Zeiher AM (2000) Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation* 101: 1899-1906

Schagatay E, Andersson JP, Hallen M, Palsson B (2001) Selected contribution: role of spleen emptying in prolonging apneas in humans. *Journal of applied physiology* 90: 1623-1629; discussion 1606

Schini-Kerth VB, Auger C, Kim JH, Etienne-Selloum N, Chataigneau T (2010) Nutritional improvement of the endothelial control of vascular tone by polyphenols: role of NO and EDHF. *Pflügers Arch* 459: 853-862

Schnorr O, Brossette T, Momma TY, Kleinbongard P, Keen CL, Schroeter H, Sies H (2008) Cocoa flavanols lower vascular arginase activity in human endothelial cells in vitro and in erythrocytes in vivo. *Arch Biochem Biophys* 476: 211-215

Schroeter H, Heiss C, Balzer J, Kleinbongard P, Keen CL, Hollenberg NK, Sies H, Kwik-Uribe C, Schmitz HH, Kelm M (2006) (-)-Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 1024-1029

Shen YH, Wang XL, Wilcken DE (1998) Nitric oxide induces and inhibits apoptosis through different pathways. *FEBS Lett* 433: 125-131

Shiina Y, Funabashi N, Lee K, Murayama T, Nakamura K, Wakatsuki Y, Daimon M, Komuro I (2009) Acute effect of oral flavonoid-rich dark chocolate intake on coronary circulation, as compared with non-flavonoid white chocolate, by transthoracic Doppler echocardiography in healthy adults. *International journal of cardiology* 131: 424-429

Shimokawa H, Yasutake H, Fujii K, Owada MK, Nakaike R, Fukumoto Y, Takayanagi T, Nagao T, Egashira K, Fujishima M, Takeshita A (1996) The importance of the hyperpolarizing mechanism increases as the vessel size decreases in endothelium-dependent relaxations in rat mesenteric circulation. *J Cardiovasc Pharmacol* 28: 703-711

Shiraki K, Elsner R, Sagawa S, Torii R, Mohri M, Yamaguchi H (2002) Heart rate of Japanese male ama divers during breath-hold dives: diving bradycardia or exercise tachycardia? *Undersea & hyperbaric medicine : journal of the Undersea and Hyperbaric Medical Society, Inc* 29: 59-62

Simon E (1998) Nitric oxide as a peripheral and central mediator in temperature regulation. *Amino Acids* 14: 87-93

Siragy HM, Carey RM (1996) The subtype-2 (AT₂) angiotensin receptor regulates renal cyclic guanosine 3', 5'-monophosphate and AT₁ receptor-mediated prostaglandin E₂ production in conscious rats. *J Clin Invest* 97: 1978-1982

Siragy HM, Carey RM (1997) The subtype 2 (AT₂) angiotensin receptor mediates renal production of nitric oxide in conscious rats. *J Clin Invest* 100: 264-269

Sramek P, Simeckova M, Jansky L, Savlikova J, Vybiral S (2000) Human physiological responses to immersion into water of different temperatures. *European journal of applied physiology* 81: 436-442

Stamler JS, Simon DI, Osborne JA, Mullins ME, Jaraki O, Michel T, Singel DJ, Loscalzo J (1992) S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 444-448

Steffen Y, Gruber C, Schewe T, Sies H (2008) Mono-O-methylated flavanols and other flavonoids as inhibitors of endothelial NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys* 469: 209-219

Storey KB (1996) Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Braz J Med Biol Res* 29: 1715-1733

Sun Z (2011) Cardiovascular responses to cold exposure. *Front Biosci (Elite Ed)* 2: 495-503

Sureda A, Batle JM, Ferrer MD, Mestre-Alfaro A, Tur JA, Pons A (2012) Scuba diving activates vascular antioxidant system. *International journal of sports medicine* 33: 531-536

Sureda A, Ferrer MD, Batle JM, Tauler P, Tur JA, Pons A (2009) Scuba diving increases erythrocyte and plasma antioxidant defenses and spares NO without oxidative damage. *Med Sci Sports Exerc* 41: 1271-1276

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

Takemoto M, Sun J, Hiroki J, Shimokawa H, Liao JK (2002) Rho-kinase mediates hypoxia-induced downregulation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 106: 57-62

Taubert D, Roesen R, Lehmann C, Jung N, Schomig E (2007) Effects of low habitual cocoa intake on blood pressure and bioactive nitric oxide: a randomized controlled trial. *Jama* 298: 49-60

Teede HJ, McGrath BP, DeSilva L, Cehun M, Fassoulakis A, Nestel PJ (2003) Isoflavones reduce arterial stiffness: a placebo-controlled study in men and postmenopausal women. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 23: 1066-1071

Tessier F, Marconnet P (1995) Radicaux libres, systèmes antioxydants et exercice. *Science & Sports* 10: 1-13

Thijssen DH, Black MA, Pyke KE, Padilla J, Atkinson G, Harris RA, Parker B, Widlansky ME, Tschakovsky ME, Green DJ (2011) Assessment of flow-mediated dilation in humans: a methodological and physiological guideline. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 300: H2-12

Thijssen DH, Bullens LM, van Bommel MM, Dawson EA, Hopkins N, Tinken TM, Black MA, Hopman MT, Cable NT, Green DJ (2009) Does arterial shear explain the magnitude of

flow-mediated dilation?: a comparison between young and older humans. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 296: H57-64

Thompson-Torgerson CS, Holowatz LA, Flavahan NA, Kenney WL (2007) Cold-induced cutaneous vasoconstriction is mediated by Rho kinase in vivo in human skin. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 292: H1700-1705

Ungvari Z, Bagi Z, Feher A, Recchia FA, Sonntag WE, Pearson K, de Cabo R, Csiszar A (2010) Resveratrol confers endothelial protection via activation of the antioxidant transcription factor Nrf2. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 299: H18-24

Valic Z, Duplancic D, Bakovic D, Ivancev V, Eterovic D, Wisloff U, Brubakk AO, Dujic Z (2005) Diving-induced venous gas emboli do not increase pulmonary artery pressure. *Int J Sports Med* 26: 626-631

Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S (1992) Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet* 339: 572-575

van der Schouw YT, Pijpe A, Lebrun CE, Bots ML, Peeters PH, van Staveren WA, Lamberts SW, Grobbee DE (2002) Higher usual dietary intake of phytoestrogens is associated with lower aortic stiffness in postmenopausal women. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 22: 1316-1322

Vanhoutte PM (1989) Endothelium and control of vascular function. State of the Art lecture. *Hypertension* 13: 658-667

Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P, Hogg N, Masters BS, Karoui H, Tordo P, Pritchard KA, Jr. (1998) Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 9220-9225

Vazquez-Medina JP, Zenteno-Savin T, Tift MS, Forman HJ, Crocker DE, Ortiz RM (2011) Apnea stimulates the adaptive response to oxidative stress in elephant seal pups. *The Journal of experimental biology* 214: 4193-4200

Versari D, Daghini E, Viridis A, Ghiadoni L, Taddei S (2009) Endothelium-dependent contractions and endothelial dysfunction in human hypertension. *Br J Pharmacol* 157: 527-536

Vince RV, McNaughton LR, Taylor L, Midgley AW, Laden G, Madden LA (2009) Release of VCAM-1 associated endothelial microparticles following simulated SCUBA dives. *European journal of applied physiology* 105: 507-513

Viridis A, Ghiadoni L, Taddei S (2010) Human endothelial dysfunction: EDCFs. *Pflugers Arch* 459: 1015-1023

- Vlachopoulos C, Aznaouridis K, Alexopoulos N, Economou E, Andreadou I, Stefanadis C (2005) Effect of dark chocolate on arterial function in healthy individuals. *Am J Hypertens* 18: 785-791
- Walford G, Loscalzo J (2003) Nitric oxide in vascular biology. *J Thromb Haemost* 1: 2112-2118
- Wang J, Wolin MS, Hintze TH (1993) Chronic exercise enhances endothelium-mediated dilation of epicardial coronary artery in conscious dogs. *Circ Res* 73: 829-838
- Wang JF, Schramm DD, Holt RR, Ensunsa JL, Fraga CG, Schmitz HH, Keen CL (2000) A dose-response effect from chocolate consumption on plasma epicatechin and oxidative damage. *J Nutr* 130: 2115S-2119S
- Wang XQ, Vaziri ND (1999) Erythropoietin depresses nitric oxide synthase expression by human endothelial cells. *Hypertension* 33: 894-899
- Warkander DE, Norfleet WT, Nagasawa GK, Lundgren CE (1992) Physiologically and subjectively acceptable breathing resistance in divers' breathing gear. *Undersea biomedical research* 19
- Warren BA, Philp RB, Inwood MJ (1973) The ultrastructural morphology of air embolism: platelet adhesion to the interface and endothelial damage. *Br J Exp Pathol* 54: 163-172
- Waterhouse AL, Shirley JR, Donovan JL (1996) Antioxidants in chocolate. *Lancet* 348: 834
- Wheeler-Jones CP (2008) Regulation of endothelial prostacyclin synthesis by protease-activated receptors: mechanisms and significance. *Pharmacol Rep* 60: 109-118
- Widdop RE, Jones ES, Hannan RE, Gaspari TA (2003) Angiotensin AT2 receptors: cardiovascular hope or hype? *Br J Pharmacol* 140: 809-824
- Wilms LC, Kleinjans JC, Moonen EJ, Briede JJ (2008) Discriminative protection against hydroxyl and superoxide anion radicals by quercetin in human leucocytes in vitro. *Toxicol In Vitro* 22: 301-307
- Wisloff U, Richardson RS, Brubakk AO (2003) NOS inhibition increases bubble formation and reduces survival in sedentary but not exercised rats. *J Physiol* 546: 577-582
- Wisloff U, Richardson RS, Brubakk AO (2004) Exercise and nitric oxide prevent bubble formation: a novel approach to the prevention of decompression sickness? *J Physiol* 555: 825-829
- Wlodek L (2002) Beneficial and harmful effects of thiols. *Pol J Pharmacol* 54: 215-223

Wolin MS, Ahmad M, Gupte SA (2005) The sources of oxidative stress in the vessel wall. *Kidney Int* 67: 1659-1661

Xia N, Daiber A, Habermeier A, Closs EI, Thum T, Spanier G, Lu Q, Oelze M, Torzewski M, Lackner KJ, Munzel T, Forstermann U, Li H (2010) Resveratrol reverses endothelial nitric-oxide synthase uncoupling in apolipoprotein E knockout mice. *J Pharmacol Exp Ther* 335: 149-154

Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T (1988) A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332: 411-415

You D, Loufrani L, Baron C, Levy BI, Widdop RE, Henrion D (2005) High blood pressure reduction reverses angiotensin II type 2 receptor-mediated vasoconstriction into vasodilation in spontaneously hypertensive rats. *Circulation* 111: 1006-1011

Zeng G, Quon MJ (1996) Insulin-stimulated production of nitric oxide is inhibited by wortmannin. Direct measurement in vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 98: 894-898

Zhang H, Zhang J, Ungvari Z, Zhang C (2009) Resveratrol improves endothelial function: role of TNF α and vascular oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29: 1164-1171

Zhilyaev SY, Moskvina AN, Platonova TF, Gutsaeva DR, Churilina IV, Demchenko IT (2003) Hyperoxic vasoconstriction in the brain is mediated by inactivation of nitric oxide by superoxide anions. *Neuroscience and behavioral physiology* 33: 783-787

Zieman SJ, Melenovsky V, Kass DA (2005) Mechanisms, pathophysiology, and therapy of arterial stiffness. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 25: 932-943

ANNEXE 1 : ARTICLE PUBLIÉ DANS L'*UNDERSEA AND HYPERBARIC MEDICINE*

UHM 2013, VOL. 40, NO. 2 – ENDOTHELIAL FUNCTION IN SCUBA AND BREATH-HOLD DIVING

Nitric oxide-related endothelial changes in breath-hold and scuba divers

S. Theunissen ^{1,2}, F. Guerrero ², N. Sponsiello ^{1,3,4}, D. Cialoni ^{1,3,4}, M. Pieri ³, P. Germonpré ^{1,5}, G. Obeid ⁵,
F. Tillmans ¹, V. Papadopoulou ^{1,6}, W. Hemelryck ¹, A. Marroni ³, D. De Bels ^{1,7}, C. Balestra ^{1,3,4}

¹ Haute Ecole Paul Henri Spaak, Environmental, Occupational & Aging Physiology Lab., Brussels, Belgium;

² Université de Bretagne Occidentale, UFR Sciences et Techniques, Brest, France;

³ DAN Europe Research, Brussels, Belgium;

⁴ DAN Europe, Apnea Task Force, Roseto, Italy;

⁵ Center for Hyperbaric Oxygen Therapy, Military Hospital Queen Astrid, Brussels, Belgium;

⁶ Department of Bioengineering, Imperial College London, London, UK;

⁷ Intensive Care Department, Brugmann University Hospital, Brussels, Belgium

CORRESPONDING AUTHOR: Sigrid Theunissen M.Sc. – sigtheunissen@gmail.com

ABSTRACT

Objective: Scuba and breath-hold divers are compared to investigate whether endothelial response changes are similar despite different exposure(s) to hyperoxia.

Design: 14 divers (nine scuba and five breath-holding) performed either one scuba dive (25m/25 minutes) or successive breath-hold dives at a depth of 20 meters, adding up to 25 minutes of immersion time in a diving pool.

Flow-mediated dilation (FMD) was measured using echography. Peripheral post-occlusion reactive hyperemia (PORH) was assessed by digital plethysmography and plasmatic nitric oxide (NO) concentration using a nitrate/nitrite colorimetric assay kit.

Results: The FMD decreased in both groups. PORH was reduced in scuba divers but increased in breath-hold divers. No difference in circulating NO was observed for the scuba group. Oppositely, an increase in circulating NO was observed for the breath-hold group.

Conclusion: Some cardiovascular effects can be explained by interaction between NO and superoxide anion during both types of diving ending to less NO availability and reducing FMD. The increased circulating NO in the breath-hold group can be caused by physical exercise. The opposite effects found between FMD and PORH in the breath-hold group can be assimilated to a greater responsiveness to circulating NO in small arteries than in large arteries.

INTRODUCTION

During a self-contained underwater breathing apparatus (scuba) dive, divers are exposed to various external influences, which may affect cardiovascular function. Indeed, previous studies have shown that scuba diving is associated with an increased pulmonary artery pressure [1], reduced cardiac output [2] as well as right ventricular overload, impaired left ventricular diastolic performance [3] and arterial endothelial function [4,5]. Most of these changes are still present post-dive. Several hypotheses have been proposed to explain the post-dive endothelial dysfunction such as venous gas emboli (VGE) formation acting on endothelial cells [6,7] or presence of reactive oxygen species (ROS) [8] related to the increased oxygen partial pressure.

Intravascular bubbles are treated as a foreign body which has been shown to activate the complement pathway *in vitro* [9,10] and may lead to endothelial damage [6,7,11]. VGE are often observed during decompression following a dive, be it wet [12] or dry [13]. Brubakk *et al.* [5] reported that a single air dive produces endothelial dysfunction. The production of venous gas emboli has been questioned for breath-hold divers since they dive on a single breath and are not supplied with pressurized gas throughout the dive as are scuba divers [14]. It could thus be expected that in the case of very few and possibly no bubble formation while breath-hold diving, there would be no or limited endothelial dysfunction.

Sustained hyperoxia during scuba diving leads to an

increased presence of ROS which are known to have an effect on endothelial function. This can be reduced by four weeks of oral antioxidant supplementation [15]. Hyperoxia also leads to alterations in cardiovascular function and autonomic control during the exposure and after the return to normoxic breathing [16].

On the contrary, during breath-hold diving, the oxygen partial pressure increases during the deep phase, but for a limited period of time. Breath-hold diving is then associated with transient hyperoxia followed by hypoxia and a build-up of CO₂, chest-wall compression and significant hemodynamic changes.

Therefore the aim of the study is to compare scuba and breath-hold divers to investigate the effect of breath-hold diving (intermittent hyperoxia) on endothelial-dependent vasodilation, especially since a vasoconstriction can be observed during longer hyperoxia [17].

MATERIALS AND METHODS

Study population

After written informed consent and Ethics Committee approval, nine male experienced scuba divers (minimum certification “Autonomous Divers” according to ISO 24801-2 with at least 50 logged dives) and five breath-hold divers (at least four years of experience) volunteered for this pilot study. They were selected from a large sports divers population in order to obtain a consistent group for age, body composition and health status: non-smokers with regular but not excessive physical activity (aerobic exercise one to three times a week).

Prior to entering the study, they were assessed on fitness to dive. None of the subjects had a history of previous cardiac abnormalities, and none of them were under any cardio-active medication.

Dive profile and timeline of measurements

All measurements were made in a pool environment (Nemo33, Brussels, Belgium) with a water temperature of 33°C, thus needing no thermal protection suit. All participants were asked to refrain from strenuous exercise for 48 hours before testing. The diet of all subjects was controlled, avoiding nitrate-rich foods [18]. All tests were done in the morning, and the last meal was about 10 hours prior to testing.

Each scuba diver performed a dive to a depth of 25 meters for 25 minutes. This depth-time profile falls within accepted “no-decompression limits” [19]. Descent speed was at 15 meters per minute; ascent speed was at 10 meters per minute to the surface, with no safety

stop (none required according to the U.S. Navy dive table used).

Each breath-hold diver performed successive dives to a depth of 20 meters for a total immersion time of 25 minutes. The breath-hold divers performed their dives in pairs so that each diver also served as safety buddy for the other.

Measurements

Endothelial function

Arterial endothelial function was assessed before and after each scuba dive or series of breath-hold dives by measuring the flow-mediated dilation (FMD) of the brachial artery [20]. Since it is the relative FMD variation which is of interest here, the FMD measurement was assessed according to the methodology used by Brubbakk *et al.* [5] for the same kind of in-field analysis following a standardized protocol and guidelines [21]. The FMD was measured with a 5-10 MHz transducer (Mindray DP 6600, Mindray, China). The brachial artery diameter was measured from longitudinal images with the lumen-intima interface visualized on both (anterior and posterior) walls. Boundaries for diameter measurement were identified automatically by means of a boundary tracking software (FMD-I software, FLOMEDI, Belgium) and optically controlled by a researcher.

Once the basal measurements were obtained, the sphygmomanometric cuff, placed above the ultrasound probe, was inflated and held at 50 mmHg above systolic pressure for five minutes. Occlusion up to five minutes produces a transient artery dilation attributable to NO synthesis [22].

After ischemia the cuff was rapidly deflated, and the brachial artery was monitored for an additional four minutes automatically. All measurements were taken by the same experienced operator to increase consistency of measurements. The FMD was computed as the percentage change in brachial artery diameter measured at peak dilation.

Post-occlusion reactive hyperemia (PORH)

The relative dilation of small arteries was measured by post-occlusion reactive hyperemia (PORH). This is a technique which was recently demonstrated useful in measuring peripheral vascular function [23]. A plethysmographic probe (Cardiovascular, FLOMEDI, Belgium) was placed on the index finger of both hands during the entire FMD procedure. During FMD, the

amplitude tracing of the two fingers was recorded. In the arm undergoing hyperemia, baseline amplitude was recorded. During cuff inflation, flow is occluded and restored after cuff release (hyperemic period). In the contralateral control finger, flow continues throughout and pulse amplitude undergoes minimal changes. In this test, the response of the pulse wave amplitude to hyperemia was calculated from the hyperemic fingertip as the ratio of the post-deflation pulse amplitude to the baseline amplitude.

To obtain the pulse amplitude ratio, we divided previous ratio by the corresponding ratio at the control hand as described in Kuznetsova *et al.* [23]. Photoplethysmography works by having an infrared light at a wavelength of 940 nm illuminate the skin and then measuring the amount of light reflected back to a photodiode, which converts it into an electrical current. The changes in light absorption measured reflect the path length that the light has to travel in the bloodstream and therefore the degree of dilation of the artery. The pulse trace was displayed and recorded.

The pulse amplitude ratio was calculated as the waveform amplitude just before occlusion, divided by the waveform amplitude at baseline. The percentage of pre-occlusion values, normalized to the magnitude of variation of the other arm, was automatically measured to avoid any environmental interference.

Circulating nitric oxide

Venous blood samples were collected in an EDTA tube before and after either the scuba or breath-hold dives and then immediately centrifuged at 1400g ($1400 \times 9.81\text{m/s}^2$) for 10 minutes at 4°C. Plasma samples were stored at -80°C and analyzed within the following six months. Plasma levels of nitrite and nitrate, NO metabolites, were determined by a colorimetric method (Fluka, Industriestrasse 25CH-9471 Buchs, Switzerland). The NO₂/NO₃ Assay Kit contains dyes, nitrate reductase, enzyme co-factor, buffer solution and NO₂, NO₃ solutions as standards. Total NO metabolites are thus detectable. The suitable NO₂ detection range is from 10 to 100 µM. At the time of the nitrite/nitrate (NO_x) assay, plasma samples were ultra-filtered through 10 kDa molecular weight cut-off filters and centrifuged at 4000g for 60 minutes at 20°C in order to remove hemoglobin, which is known to interfere with subsequent spectrophotometric measurements. NO_x concentration in different dilutions of plasma ultrafiltrate was determined by colorimetry based on the Griess reaction,

which consist of three main steps: 1) enzymatic conversion of nitrate into nitrite using nitrate reductase in the presence of NADPH; 2) incubation with Griess reagent to convert nitrite into a chromophore compound; and 3) quantitative estimation of nitrite concentration by spectrophotometric measurement of the absorbance at 550 nm. Standards for calibration curves were prepared with sodium nitrite and taken through the full assay procedure.

Statistical analysis

Statistical analyses were conducted using GraphPad Prism 5 (La Jolla, Calif., USA) on the computer. Data are given as a percentage of pre-dive values. The difference between the percentage of pre-dive values and 100% was compared by a two-tailed one-sample *t* test when normality of the sample was reached as assessed by the Kolmogorov-Smirnov test. Otherwise, the non-parametric Wilcoxon Rank Sum test was used. Statistical significance level was set at $p < 0.05$.

RESULTS

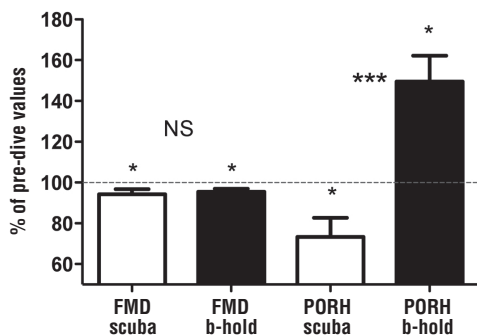
When comparing scuba and breath-hold divers, as far as age (40.1 ± 5.8 years vs. 34.4 ± 9.9 years), height (180.2 ± 5.2 cm vs. 182.6 ± 3.4 cm), weight (82.9 ± 10.3 kg vs. 78.5 ± 9.8 kg) are concerned; both groups are comparable. There was no significant difference in anthropometric data between groups ($p > 0.05$).

Because of the design of the study, the structure of the immersion was different between groups. Indeed, breath-hold divers were asked to perform a series of successive dives (up to 25 minutes of total immersion time). The average number of repetition was 10 ± 0.84 dives, with an average immersion time of 25.6 minutes ± 58 seconds. The mean recovery period between successive breath-hold dives was 4.91 ± 1.31 minutes. The breath-hold divers performed their dive in pairs, allowing each diver to serve as safety buddy for the other. The variation in recovery time is therefore understandable. All divers completed the study, and no one developed symptoms of decompression sickness.

Basal diameter of brachial artery and FMD

In the scuba group, the mean of basal diameters (pre-occlusion diameters) of the brachial artery was significantly reduced after compared to before scuba diving (85.76 ± 14.60 % of pre dive values, which corresponds to a reduction of 14.24%; $p = 0.019$). Similarly, a reduction of the FMD was observed

FIGURE 1 – FMD and PORH before and after diving



Flow-mediated dilation (FMD) and post-occlusion reactive hyperemia (PORH) before and after diving.

Results are shown in percentages of pre-dive values (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

after a scuba dive (94.26 ± 7.33 % of pre dive values which corresponds to a reduction of 5.74 %; $p = 0.047$). In breath-hold divers, a difference in basal diameters was observed, however non-significant, between pre and post dive (86.56 ± 24.19 % of pre dive values which corresponds to a reduction of 13.44 %; $p > 0.05$). Curiously, a FMD reduction was also observed after breath-hold diving (95.43 ± 3.51 % of pre dive values which corresponds to a reduction of 4.57 %; $p = 0.043$). There was no difference between the scuba and the breath-hold group. Results of FMD assessment are shown in Figure 1.

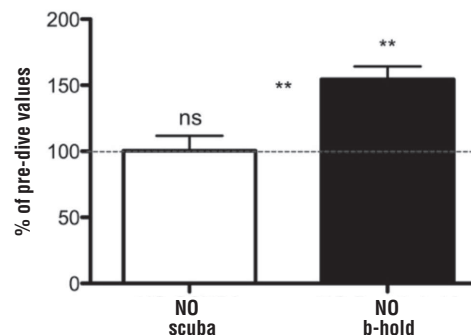
Post-occlusion reactive hyperemia (PORH)

A reduction of PORH was observed after scuba diving (73.38 ± 26.33 % of pre-dive values, which corresponds to a reduction of 26.62 %; $p = 0.024$), while an increase of PORH was observed after breath-hold diving (149.5 ± 28.37 % of pre-dive values which corresponds to an increase of 49.5%; $p = 0.017$). A significant difference was observed (Figure 1) for PORH between breath-hold and scuba divers ($p = 0.0004$).

Circulating nitric oxide

No significant difference in NO concentration was found before and after a single scuba dive of 25m/25 minutes (100.5 ± 35.33 % of pre-dive values, which corresponds to an increase of 0.5 %; $p > 0.05$) but circulating NO significantly increased after a series of suc-

FIGURE 2 – NO after BH or scuba



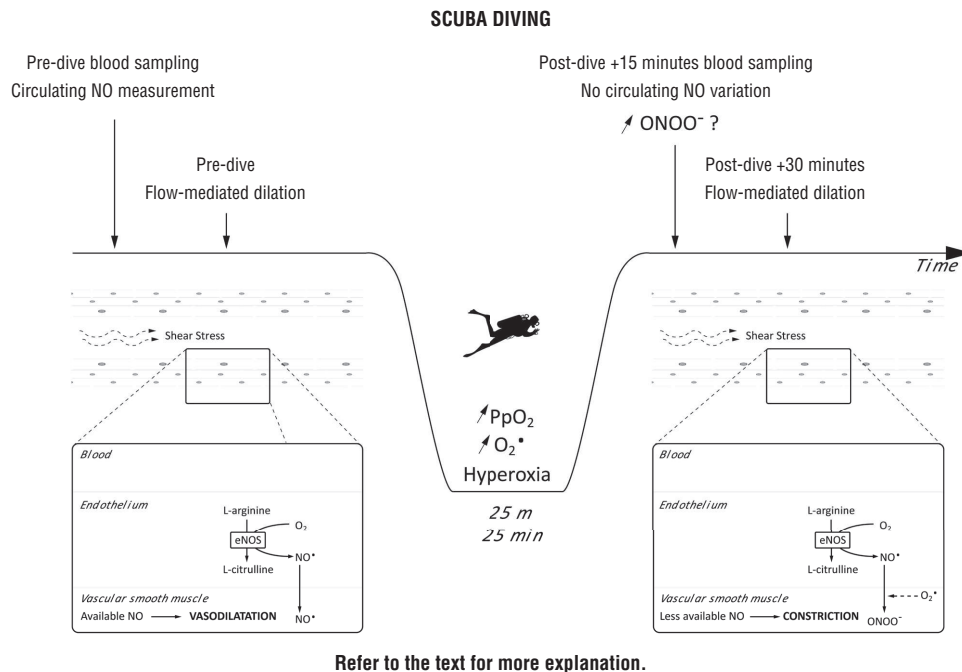
Evolution of circulating nitric oxide (NO) after breath-hold ($n = 5$) or scuba ($n = 9$) diving.

Results are shown in percentages of NO pre dive values (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

cessive breath-hold dives (154.4 ± 21.9 % of pre-dive values which corresponds to an increase of 54.4 %; $p = 0.005$). Unlike the FMD, which did not show any differences between the two groups ($p > 0.05$), in the breath-hold group the percentage of circulating NO after diving compared to pre-dive was significantly higher (Figure 2) than in the scuba group ($p = 0.008$).

DISCUSSION

In the current study, signs of endothelial dysfunction, indicated by a reduction of FMD, are found in both groups, and no significant difference was observed between the two groups. In scuba divers, the reduced FMD confirms the findings of other authors. (4,5,15,24,25). However in breath-hold diving the reduction of FMD is associated with an increase in circulating NO, whereas in scuba diving it is not. The mechanisms that cause endothelial dysfunction after scuba diving are not clear yet. Hyperoxia-induced oxidative stress has been evoked, since it is known that hyperoxia leads to vasoconstriction [26,27]. The generally accepted hypothesis is that the increase in oxygen partial pressure promotes oxidative stress, which is at the origin of endothelial dysfunction [26]. This is because it has been shown that hyperoxia enhances the production rate of anion superoxide [28], a powerful reactive oxygen species (ROS) which interacts with NO, leading to its destruction and to the production of

FIGURE 3 – Summary of the proposed mechanisms during scuba diving.

peroxynitrite (ONOO⁻) [29]. Indeed, the FMD reduction after scuba diving is partly prevented by administration of vitamins C and E for four weeks before the dive [4,15, 24]. ROS not only scavenge NO and decrease NO bio-availability, but also oxidize tetrahydrobiopterin (BH₄), a major co-factor of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) into dihydrobiopterin (BH₂), which induces a reduced liberation of NO by uncoupling of eNOS [30]. An impaired BH₄ bioactivity is involved in hypertension-induced endothelial dysfunction [31,32]. So, if a co-factor of eNOS is impaired, an FMD reduction will also be observed. Furthermore, oxidative stress causes a down-regulation of eNOS, which leads to a decrease of NO-production [33]. This in turn leads to reduced NO-mediated vasodilation, as assessed by decreased basal diameter (pre-occlusion) of the brachial artery and flow-mediated vasodilation.

As shown in Figure 3, flow-mediated dilation (FMD) and nitric oxide (NO) were measured before and after

the dive. No variation in NO is observed after the dive. Our hypothesis is that diving at 25m for 25 minutes leads to hyperoxia, increasing the amount of superoxide anion (O₂⁻). O₂⁻ reacts with NO to form ONOO⁻. NO is thus less available to participate in the FMD. Therefore, a reduced FMD is observed after the scuba dive.

Our data show that endothelial function is impaired in the microcirculation after a scuba dive, as indicated by a reduced PORH. However the lack of difference in nitrite/nitrate levels between pre- and post-dive values supports the assumption that the FMD reduction after scuba diving may not be due to changes in NO synthesis/release, but rather to a decreased availability of NO. This can be due to a bigger oxidative stress inactivating and/or sympathetic and parasympathetic activities as a consequence of hyperoxia. The latter leads to alterations in cardiovascular function and autonomic control during the exposure and even after coming to normoxic

breathing [16]. In addition, a decrease in volemia and cardiac preload have been commonly reported after water immersion [34] or diving [35]. Furthermore, one can hypothesize that the increased PO₂ during scuba diving will moderately increase vascular resistance as shown while breathing hyperoxic mixtures [16,36,37]. A reduction of cardiac stroke volume and cardiac output as well as a moderate reduction of ejection fraction have been reported during scuba diving (38,39); all are concomitant with the reduced FMD observed after a scuba dive.

In breath-hold diving an FMD reduction was also observed after a series of successive breath-hold dives. To our knowledge, these are the first results to be reported on breath-hold divers. Decreased FMD seems to indicate that breath-hold diving acts on endothelial function. Surprisingly, opposite effects on large arteries and peripheral circulation are observed, and the FMD reduction is accompanied by an increase in circulating NO. As peripheral vessels are smaller, shear stress is more important in these vessels than in the brachial artery. Moreover, it is known that there is an inverse relationship between artery size and the magnitude of endothelium-dilation [40]. Bigger arteries like the brachial artery are less sensitive to shear stress. It is not unusual to find a different reaction between endothelial function in large arteries and post-occlusive reactive hyperaemia in the finger [41].

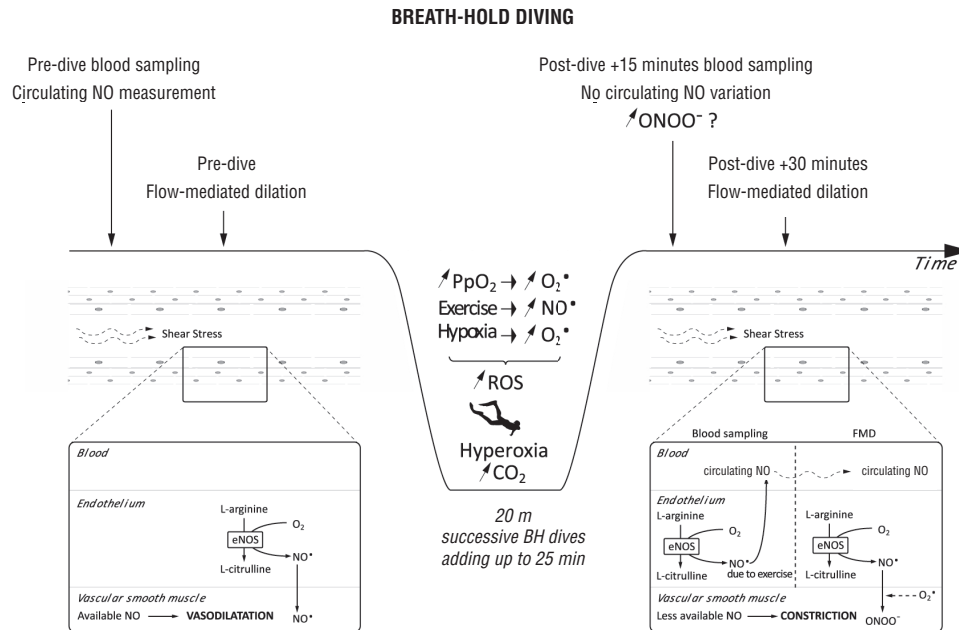
It is accepted that FMD is modulated by the NO production by endothelial cells [42,43]. An explanation for the increased circulating NO after breath-hold dives could be that it requires more physical effort than scuba diving. Indeed at the surface, breath-hold divers have positive buoyancy. They have to make efforts to go down during the first meters. When they come back to the surface, breath-hold divers have to fin from the bottom until they recover their neutral buoyancy. On the other hand, scuba divers are heavier and go down easily without doing exercise. To come back to the surface, scuba divers usually use their buoyancy control device and no important physical exercise.

It is known that physical exercise increases NO production [44], and under normal conditions exercise training improves endothelial function, which is directly related to an increase in NO bioavailability in the smooth muscle [45]. In this breath-hold diving experiment we could not find this effect. It is hypothesized that despite the increased NO production,

exercise produces oxidative stress [46,47]. Exercise and/or (at least in part) the intermittent hyperoxia and the subsequent hypoxia [48] during the dive, which both lead to a reduced availability of NO can explain this endothelial reduced response. Indeed, greater oxidative stress increases the level of superoxide anion (O₂⁻) which interacts readily with NO to form peroxynitrite, thus reducing the availability of NO in the vascular smooth muscle (See Figure 4). The increased PO₂ during breath-hold immersion is so short, that it is difficult to consider it significant; nevertheless it has been shown that for breath-hold divers even short hyperoxic [49] or hypoxic situations [50] act as a powerful trigger for physiological responses with successive breath-hold dives.

It seems thus that NO is inactivated during diving, even if hyperoxia is intermittent. We hypothesize that there is oxidative stress during breath-hold diving leading to endothelial dysfunction. In a following study, oxidative stress markers (as peroxynitrites) should be measured. It is of interest to estimate the amount of ROS produced during such activities. Of course, other concomitant factors can be present, as gas bubbles may lead to endothelial damage [6,7]. But this hypothesis is less supported because breath-hold divers dive on a single inhalation [14] of atmospheric air not really prone to provoke nitrogen supersaturation. Therefore, although physical exercise may well be responsible for an increase in NO production, the concomitant hyperoxia seems to have neutralized the NO, resulting in more circulating metabolites, while reducing the bioavailability of NO to participate in vasodilation.

Contrary to scuba diving, the reduction of the basal diameter of the brachial artery between pre- and post-breath-hold dives was not significant. Since PORH amplitude increases after breath-hold diving, this suggests a reduced peripheral vascular resistance, contrary to the FMD, which decreases. As circulating NO level increases after breath-hold diving, we can consider that the responsiveness to circulating NO is greater in small arteries, such as digital arteries [51], than in large arteries, chosen for FMD measurements. Indeed, Noon *et al.* [52] have suggested that endogenous nitric oxide production might be more important in regulating microvascular blood flow in regions like the fingertips. Furthermore, these authors administered an inhibitor of nitric oxide synthase, and nevertheless proved a reaction via laser-doppler flowmetry, showing that circulating NO might be of primary interest.

FIGURE 4 – Summary of the proposed mechanisms during breath-hold diving.

Nitric oxide (NO) and flow-mediated dilation (FMD) were measured before and after the dive. The divers had to perform successive breath-hold dives adding up to 25 minutes. An increased NO accompanied by a reduced FMD is observed after the dive. It is hypothesized that there is an increase of oxidative stress due to exercise or (at least in part) to the transient increase in PO₂ during the dive and/or an inhibition of the eNOS by the subsequent hypoxia, which both lead to a reduced availability of NO. Therefore, a reduced FMD is observed after the series of breath-hold dives.

CONCLUSION

After both scuba and breath-hold diving, a decreased FMD was observed. Simultaneously, an increase in circulating NO was observed in the breath-hold diving group, whereas no such variation was observed in scuba divers. As demonstrated in several studies, scuba diving induces an increase in oxidative stress, which induces a reduced reactive vasodilation. This is not linked to NO release because no variation in NO level is observed after a scuba dive. It can thus be due to an inactivation of NO, probably through oxidative stress.

During breath-hold diving a similar reduction of FMD can be shown despite increased plasmatic NO levels. Since the surrounding conditions were comparable between the scuba and the breath-hold group, we

can consider that the reduced FMD in both groups is due to a reduction of available NO at the level of vascular smooth muscle, and that the increased level of circulating NO in the breath-hold group was mainly due to the increased physical exercise compared to the scuba group. The response to exercise in the small arteries near the muscle is bigger than the effect of hyperoxia, leading to opposite effects on large arteries and peripheral circulation.

The reduction of bioavailable NO seems to be due either to the transient hyperoxia and/or to the subsequent moderate hypoxia in the breath-hold diving group. We conclude that both breath-hold and scuba diving reduce FMD but the implicated NO-dependent mechanisms are different. Nevertheless this is a study on a few breath-

hold divers, although statistical tests take into account this limited number of measurements, the results have to be viewed with caution. It would then be interesting to make this experiment again with more breath-hold subjects.

Acknowledgments

The authors wish to thank the divers for participating in this study, as well as Dr. N. Sponsiello for the circulating NO analysis and Ing. J. Beernaerts for accepting us in his diving

pool, Nemo 33, Brussels, Belgium. While the manuscript was being finalized, Patrick Musimu accidentally passed away. The authors wish to offer their condolences to his family. The study is part of the Phypode Project, financed by the European Union under a Marie Curie Initial Training Network program.

Conflict of interest: None.

REFERENCES

1. Dujic Z, Obad A, Palada I, Valic Z, Brubakk AO. A single open sea air dive increases pulmonary artery pressure and reduces right ventricular function in professional divers. *Eur J Appl Physiol.* Jul 2006;97(4):478-485.
2. Valic Z, Duplancic D, Bakovic D, et al. Diving-induced venous gas emboli do not increase pulmonary artery pressure. *Int J Sports Med.* Oct 2005;26(8):626-631.
3. Marabotti C, Chiesa F, Scalzini A, et al. Cardiac and humoral changes induced by recreational scuba diving. *Undersea Hyperb Med.* Fall 1999;26(3):151-158.
4. Obad A, Marinovic J, Ljubkovic M, et al. Successive deep dives impair endothelial function and enhance oxidative stress in man. *Clin Physiol Funct Imaging.* Nov 2010;30(6):432-438.
5. Brubakk AO, Duplancic D, Valic Z, et al. A single air dive reduces arterial endothelial function in man. *J Physiol.* Aug 1 2005;566(Pt 3):901-906.
6. Nossun V, Hjelde A, Brubakk AO. Small amounts of venous gas embolism cause delayed impairment of endothelial function and increase polymorphonuclear neutrophil infiltration. *Eur J Appl Physiol.* Jan 2002;86(3):209-214.
7. Nossun V, Koteng S, Brubakk AO. Endothelial damage by bubbles in the pulmonary artery of the pig. *Undersea Hyperb Med.* Spring 1999;26(1):1-8.
8. Giordano FJ. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *J Clin Invest.* Mar 2005;115(3):500-508.
9. Ward CA, Koheil A, McCullough D, Johnson WR, Fraser WD. Activation of complement at plasma-air or serum-air interface of rabbits. *J Appl Physiol.* May 1986;60(5):1651-1658.
10. Hjelde A, Bergh K, Brubakk AO, Iversen OJ. Complement activation in divers after repeated air/heliox dives and its possible relevance to DCS. *J Appl Physiol.* Mar 1995;78(3):1140-1144.
11. Warren BA, Philp RB, Inwood MJ. The ultrastructural morphology of air embolism: platelet adhesion to the interface and endothelial damage. *Br J Exp Pathol.* Apr 1973;54(2):163-172.
12. Germonpre P, Pontier JM, Gempp E, et al. Pre-dive vibration effect on bubble formation after a 30-m dive requiring a decompression stop. *Aviat Space Environ Med.* Dec 2009;80(12):1044-1048.
13. Blatteau JE, Gempp E, Balestra C, Mets T, Germonpre P. Pre-dive sauna and venous gas bubbles upon decompression from 400 kPa. *Aviat Space Environ Med.* Dec 2008;79(12):1100-1105.
14. Hooker SK, Fahlman A, Moore MJ, et al. Deadly diving? Physiological and behavioural management of decompression stress in diving mammals. *Proc Biol Sci.* Mar 22 2012;279(1731):1041-1050.
15. Obad A, Valic Z, Palada I, Brubakk AO, Modun D, Dujic Z. Antioxidant pretreatment and reduced arterial endothelial dysfunction after diving. *Aviat Space Environ Med.* Dec 2007;78(12):1114-1120.
16. Gole Y, Gargne O, Coulange M, et al. Hyperoxia-induced alterations in cardiovascular function and autonomic control during return to normoxic breathing. *Eur J Appl Physiol.* Jun 2011;111(6):937-946.
17. Demchenko IT, Boso AE, Bennett PB, Whorton AR, Piantadosi CA. Hyperbaric oxygen reduces cerebral blood flow by inactivating nitric oxide. *Nitric Oxide.* Dec 2000;4(6):597-608.
18. Engan HK, Jones AM, Ehrenberg F, Schagatay E. Acute dietary nitrate supplementation improves dry static apnea performance. *Respir Physiol Neurobiol.* Jul 1 2012;182(2-3):53-59.
19. NAVSEA. The air decompression table. In: NAVSEA, ed. *US Navy Diving Manual (Revision 6): SS521-AG-PRO-010/0910-LP-106-0957.* Vol 2: US Navy; 2008:62.
20. Raitakari OT, Celermajer DS. Testing for endothelial dysfunction. *Ann Med.* Jul 2000;32(5):293-304.
21. Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, et al. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol.* Jan 16 2002;39(2):257-265.

22. Lieberman EH, Gerhard MD, Uehata A, et al. Flow-induced vasodilation of the human brachial artery is impaired in patients <40 years of age with coronary artery disease. *Am J Cardiol.* Dec 1 1996;78(11):1210-1214.
23. Kuznetsova T, Szczesny G, Thijs L, Jozeau D, D'hooge J, Staessen JA. Assessment of peripheral vascular function with photoplethysmographic pulse amplitude. *Artery Research.* 2011;5(2):58-64.
24. Obad A, Palada I, Valic Z, et al. The effects of acute oral antioxidants on diving-induced alterations in human cardiovascular function. *J Physiol.* Feb 1 2007;578(Pt 3):859-870.
25. Rasdal KV, Hjelde A, Mollerlokken A, Lundset N, Brubakk AO. Aortic function in rats after decompression without ultrasonically detectable bubble formation. *Aviat Space Environ Med.* Dec 2009;80(12):1006-1011.
26. Demchenko IT, Boso AE, O'Neill TJ, Bennett PB, Piantadosi CA. Nitric oxide and cerebral blood flow responses to hyperbaric oxygen. *J Appl Physiol.* Apr 2000;88(4):1381-1389.
27. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol.* Nov 1996;271(5 Pt 1):C1424-1437.
28. Jamieson D, Chance B, Cadenas E, Boveris A. The relation of free radical production to hyperoxia. *Annu Rev Physiol.* 1986;48:703-719.
29. Sureda A, Ferrer MD, Batle JM, Tauler P, Tur JA, Pons A. Scuba diving increases erythrocyte and plasma antioxidant defenses and spares NO without oxidative damage. *Med Sci Sports Exerc.* Jun 2009;41(6):1271-1276.
30. Forstermann U. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflugers Arch.* May 2010;459(6):923-939.
31. Guerrero F, Thioub S, Goanvec C, et al. Effect of tetrahydrobiopterin and exercise training on endothelium-dependent vasorelaxation in SHR. *J Physiol Biochem.* Sep 26 2012.
32. Landmesser U, Dikalov S, Price SR, et al. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest.* Apr 2003;111(8):1201-1209.
33. Ilan E, Tirosh O, Madar Z. Triacylglycerol-mediated oxidative stress inhibits nitric oxide production in rat isolated hepatocytes. *J Nutr.* Sep 2005;135(9):2090-2095.
34. Mourrot L, Wolf JP, Galland F, et al. Short-term vasomotor adjustments to post immersion dehydration are hindered by natriuretic peptides. *Undersea Hyperb Med.* Summer 2004;31(2):203-210.
35. Boussuges A, Blanc F, Carturan D. Hemodynamic changes induced by recreational scuba diving. *Chest.* May 2006;129(5):1337-1343.
36. Gole Y, Rossi P, Fontanari P, Gavarry O, Boussuges A. Arterial compliance in divers exposed to repeated hyperoxia using rebreather equipment. *Aviat Space Environ Med.* May 2009;80(5):482-484.
37. Rossi P, Boussuges A. Hyperoxia-induced arterial compliance decrease in healthy man. *Clin Physiol Funct Imaging.* Jan 2005;25(1):10-15.
38. Boussuges A, Pontier JM, Schmid B, Dussault C. Paradoxical gas embolism after SCUBA diving: Hemodynamic changes studied by echocardiography. *Scand J Med Sci Sports.* May 22 2012.
39. Marabotti C, Chiesa F, Scalzini A, et al. Cardiac and humoral changes induced by recreational scuba diving. *Undersea Hyperb Med.* Fall 1999;26(3):151-158.
40. Raitakari OT, Celermajer DS. Flow-mediated dilatation. *Br J Clin Pharmacol.* Nov 2000;50(5):397-404.
41. Cornelissen VA, Onkelinx S, Goetschalckx K, et al. Exercise-based cardiac rehabilitation improves endothelial function assessed by flow-mediated dilation but not by pulse amplitude tonometry. *Eur J Prev Cardiol.* Sep 7 2012.
42. Mullen MJ, Kharbanda RK, Cross J, et al. Heterogenous nature of flow-mediated dilatation in human conduit arteries in vivo: relevance to endothelial dysfunction in hypercholesterolemia. *Circ Res.* Feb 2 2001;88(2):145-151.
43. Pyke KE, Tschakovsky ME. The relationship between shear stress and flow-mediated dilatation: implications for the assessment of endothelial function. *J Physiol.* Oct 15 2005;568(Pt 2):357-369.
44. Wang J, Wolin MS, Hintze TH. Chronic exercise enhances endothelium-mediated dilation of epicardial coronary artery in conscious dogs. *Circ Res.* Nov 1993;73(5):829-838.
45. de Moraes C, Davel AP, Rossoni LV, 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.* 2008;8:12.
46. Duthie GG, Robertson JD, Maughan RJ, Morrice PC. Blood antioxidant status and erythrocyte lipid peroxidation following distance running. *Arch Biochem Biophys.* Oct 1990;282(1):78-83.
47. Davies KJ, Quintanilha AT, Brooks GA, Packer L. Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem Biophys Res Commun.* Aug 31 1982;107(4):1198-1205.
48. McQuillan LP, Leung GK, Marsden PA, Kostyk SK, Kourembanas S. Hypoxia inhibits expression of eNOS via transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *Am J Physiol.* Nov 1994;267(5 Pt 2):H1921-1927.
49. Balestra C, Germonpre P, Poortmans JR, Marroni A. Serum erythropoietin levels in healthy humans after a short period of normobaric and hyperbaric oxygen breathing: the "normobaric oxygen paradox". *J Appl Physiol.* Feb 2006;100(2):512-518.

- 50. de Bruijn R, Richardson M, Schagatay E. Increased erythropoietin concentration after repeated apneas in humans. *Eur J Appl Physiol.* Mar 2008;102(5):609-613.
- 51. Coffman JD. Effects of endothelium-derived nitric oxide on skin and digital blood flow in humans. *Am J Physiol.* Dec 1994;267(6 Pt 2):H2087-2090.
- 52. Noon JP, Haynes WG, Webb DJ, Shore AC. Local inhibition of nitric oxide generation in man reduces blood flow in finger pulp but not in hand dorsum skin. *J Physiol.* Jan 15 1996;490 (Pt 2):501-508.

♦

Original articles

Oxidative stress in breath-hold divers after repetitive dives

Sigrd Theunissen, Nicola Sponiello, Miroslav Rozloznik, Peter Germonpré, François Guerrero, Danilo Cialoni and Costantino Balestra

Abstract

(Theunissen S, Sponiello N, Rozloznik M, Germonpré P, Guerrero F, Cialoni D, Balestra C. Oxidative stress in breath-hold divers after repetitive dives. *Diving and Hyperbaric Medicine*. 2013 June;43(2):63-66.)

Introduction: Hyperoxia causes oxidative stress. Breath-hold diving is associated with transient hyperoxia followed by hypoxia and a build-up of carbon dioxide (CO₂), chest-wall compression and significant haemodynamic changes. This study analyses variations in plasma oxidative stress markers after a series of repetitive breath-hold dives.

Methods: Thirteen breath-hold divers were asked to perform repetitive breath-hold dives to 20 metres' depth to a cumulative breath-hold time of approximately 20 minutes over an hour in the open sea. Plasma nitric oxide (NO), peroxynitrites (ONOO⁻) and thiols (R-SH) were measured before and after the dive sequence.

Results: Circulating NO significantly increased after successive breath-hold dives ($169.1 \pm 58.26\%$ of pre-dive values; $P = 0.0002$). Peroxynitrites doubled after the dives ($207.2 \pm 78.31\%$ of pre-dive values; $P = 0.0012$). Thiols were significantly reduced ($69.88 \pm 19.23\%$ of pre-dive values; $P = 0.0002$).

Conclusion: NO may be produced by physical effort during breath-hold diving. Physical exercise, the transient hyperoxia followed by hypoxia and CO₂ accumulation would all contribute to the increased levels of superoxide anions (O₂²⁻). Since interaction of O₂²⁻ with NO forms ONOO⁻, this reaction is favoured and the production of thiol groups is reduced. Oxidative stress is, thus, present in breath-hold diving.

Key words

Freediving, breath-hold diving, hyperoxia, free radicals, nitric oxide, exercise

Introduction

At the end of the dive, breath-hold diving may result in hypoxia/hypercapnia, where alveolar oxygen partial pressure can be as low as 20–30 mmHg and arterial oxygen saturation around 50%.¹ Moreover, in order to increase the maximal breath-hold time, some divers perform hyperventilation, which reduces the partial pressure of carbon dioxide (PCO₂) before breath-holding and delays the urge to breathe. This procedure increases the risk of a hypoxic event during the dive. Whilst breath-hold divers may experience hypoxia during the ascent, the compression phase of the dive is associated with the reverse, hyperoxic conditions, because of increasing hydrostatic pressure leading to reduction of the intra-pulmonary gas volume and compression of the chest wall (Boyle's Law).² This, in turn, induces a reduction of cardiac output during the dive.³ Oxidative stress has also been involved in cardiovascular pathologies and hypertension.⁴⁻⁶

In a previous study, decreased flow-mediated dilatation (FMD) of the brachial artery was observed after a series of breath-hold dives.⁶ Interestingly, circulating nitric oxide (NO) was increased in these conditions. It was hypothesised that the production of reactive oxygen species (ROS) was increased during breath-hold diving, and that these ROS react with nitric oxide (NO) to form peroxynitrites (ONOO⁻) which, in turn, reduce the ability of NO to achieve vasodilation.⁶ The increased NO production could be due

to physical exercise.⁷ Different factors can be involved in the increased oxidative stress, including transient hyperoxia followed by hypoxia and CO₂ build up and/or an impaired tetrahydrobiopterin bioactivity, as found in hypertension-induced endothelial dysfunction.⁸ Alternatively, in the absence of oxidative stress, a decreased FMD could result from alterations in cardiovascular function and autonomic control.⁹

The aim of this study was to observe whether oxidative stress markers are increased in breath-hold diving in order to confirm/refute the hypothesis that NO reacts with ROS to form ONOO⁻ leading to a decrease in its bioactivity.

Methods

STUDY POPULATION

After written informed consent and institutional ethics committee approval (B200-2009-39), 13 non-smoking, experienced (at least four years of experience) male breath-hold divers volunteered for the study. Prior to entering the study, they were assessed as fit to dive by a qualified diving physician. None of the subjects had a history of previous cardiac abnormalities and none of them was on any cardio-active medication. All participants were asked to refrain from performing strenuous exercise for 48 hours before testing. For all the subjects, the daily diet was controlled by a medical nutritionist (author NS), avoiding nitrate-rich

food. All blood samples were drawn from an antecubital fossa vein during the morning and the last meal was dinner more than 10 hours before. The study was conducted in accordance with the Helsinki Declaration.

DIVE PROFILE AND TIMELINE OF MEASUREMENTS

Each breath-hold diver performed successive dives to a depth of 20 metres' sea water (msw) for a cumulative breath-hold time of approximately 20 minutes. Dives were organised in pairs allowing each diver to act as the safety buddy for the other (the thirteenth diver buddied with a safety diver). The total time in the water was approximately one hour. All dives were performed (after breathing air) in the open sea off Santa Maria di Leuca, Italy. Water temperature at the surface was approximately 30°C, and 18°C at depth. Air temperature was 35°C. A 3 mm wetsuit was used by all divers.

MEASUREMENTS

Blood samples were collected on-shore one hour before diving and soon after the dives, on returning to the dive centre 15 minutes away from the dive site by boat. The samples were drawn into an EDTA tube and centrifuged according to the protocol (1,000 rpm for 15 min for the NO, 3,500 rpm for 10 min for the ONOO⁻ and 13,400 rpm for 15 min for the R-SH at 4°C) in order to separate blood cells and plasma. The plasma was then stored at -80°C in a fridge installed specifically for this purpose in the diving centre. All analyses were performed within the following six months on the same microplate (one for each test) in order to analyse all the samples at the same time and avoid variance bias.

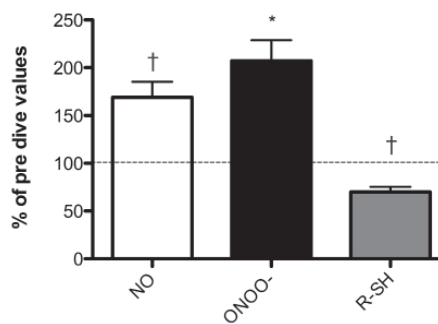
Plasma levels of nitrite and nitrate, NO metabolites, were determined by a colorimetric method (Fluka, Industriestrasse 25CH-9471, Buchs, Switzerland) according to the manufacturer's instructions. Peroxynitrites were measured using the OxiSelect™ Nitrotyrosine ELISA kit. The plasma samples or nitrated bovine serum albumin (BSA) standards were first added to a nitrated BSA preabsorbed EIA plate. After a brief incubation, an anti-nitrotyrosine antibody was added, followed by a horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody. The protein nitrotyrosine content in the samples was determined by comparing with a standard curve prepared from predetermined nitrated BSA standards.

Thiols are extremely efficient antioxidants which are able to protect cellular lipids, proteins, and nucleic acids against peroxidative damage owing to their strong reductive capacity and their ability to react with free radicals.¹⁰ The assessment of thiols (R-SH) in plasma was performed by the microanalysis method of Ellman.¹¹

STATISTICAL ANALYSIS

Statistical analyses were conducted using GraphPad Prism 5 (La Jolla, CA, USA) on a PC. Data are expressed as a

Figure 1
Evolution of nitric oxide (NO), peroxynitrite (ONOO⁻) and thiols (R-SH) after repetitive breath-hold dives to 20 msw with a cumulative submergence time of 20.6 ± 1.5 min; results are expressed in percentage of pre-dive values (* $P = 0.0012$; † $P = 0.0002$)



percentage of pre-dive values. The difference between the percentage of pre-dive values and 100% was compared by a two-tailed one-sample t-test when normality of the sample was reached as assessed by the Kolmogorov-Smirnov test. Otherwise, the Wilcoxon Signed Rank test was used. Statistical significance level was set at $P < 0.05$.

Results

The divers (age 29 ± 4.7 years; height 176.5 ± 4.4 cm; weight 73.9 ± 4.6 kg) performed an average of 9 ± 2 dives with a mean cumulative breath-hold time of 20.6 ± 1.5 minutes. The mean individual duration time in the water was 61.47 ± 8.17 minutes. The mean surface interval between successive breath-hold dives was 4.5 ± 1.45 min. Variations in recovery time were dependent on the breath-hold times, which varied amongst the pairs of divers. All divers completed the study and no one developed symptoms of decompression sickness.

The plasma concentration of nitrate and nitrite, a marker of circulating NO, significantly increased after the dives ($169.1 \pm 58.26\%$ of pre-dive values; $P = 0.0002$; Figure 1).

Nitrotyrosine, a marker of peroxynitrite level, doubled after the dives. ($207.2 \pm 78.31\%$ of pre-dive values; $P = 0.0012$; Figure 1). Thiols were significantly reduced after the dives ($69.88 \pm 19.23\%$ of pre-dive values; $P = 0.0002$; Figure 1).

Discussion

We observed an increase in circulating NO and peroxynitrites (ONOO⁻) concomitant with a decrease in thiols (R-SH). NO derives from the transformation of L-arginine into L-citrulline and NO by nitric oxide synthase. This reaction needs five electrons and is dependent on NADPH

as the electron donor. It is the most important vasoprotector identified thus far. Some of the NO formed in endothelial cells is released into the circulation. Because of its affinity for erythrocytic haemoglobin, circulating NO undergoes multiple reactions with haemoglobin that lead to a decrease in its bioavailability in the vascular compartment.¹²

NO reacts and interacts with ROS, and this crosstalk can also have important effects on cardiac function.¹³ To our knowledge, there are limited data on the time course of vascular alterations after breath-hold diving.¹⁴ In scuba diving, decreases in intravascular volume and cardiac preload have been reported commonly after diving.¹⁵ This is concomitant with a moderate increase in vascular resistance and may be the result of an inactivation of NO, probably through oxidative stress.¹⁶ Indeed, plasma nitrite and oxidative stress markers remain altered during the 15-min recovery phase after hyperoxia.¹⁷

The present results confirm our previous data, which showed an increased circulating level of NO after a series of breath-hold dives.⁶ This might be explained by acute moderate physical exercise, which is known to increase NO production.⁷ Breath-hold divers have positive buoyancy at the surface and in the first metres of descent; physical effort is required to overcome this. When they ascend at the end of the dive, breath-hold divers have to fin upwards until the depth at which they recover their positive buoyancy.

Oxidative stress is associated with the generation of ROS, including superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$). This free radical reacts with NO to generate peroxynitrite (ONOO⁻), which causes additional oxidative stress by increasing oxidase activity and inactivating antioxidant enzymes.¹⁸ In this study, more ONOO⁻ and less thiol (R-SH) were observed, which shows that oxidative stress is present during breath-hold diving.

To our knowledge, this is the first time these changes (in ONOO⁻ and R-SH) have been reported in breath-hold divers. Hyperoxia found during the deep phase of breath-hold diving enhances the production rate of superoxide anion which is converted into hydrogen peroxide (H_2O_2) or reacts with NO to form ONOO⁻.^{19,20} Reacting rapidly with it, extracellular superoxide anions can decrease the bioavailability of NO.²¹ The reduced availability of NO caused by $O_2^{\cdot-}$ leads to vasoconstriction and impairs NO-dependent vasodilation, which is consistent with recent findings on breath-hold divers.^{6,22} Although H_2O_2 is a weak oxidant and relatively inert with most molecules, it oxidizes cysteine thiole (R-SH) groups within the protein molecule. This reversible reaction modifies their structure and function.²³ When ROS are present at physiological levels, NO reacts with proteins to form R-SH. But an increased level of $O_2^{\cdot-}$ facilitates its interaction with NO to form ONOO⁻, instead of R-SH.²⁴ The total amount of R-SH is therefore reduced, as observed in this study. Superoxide anion also tends to react with itself. This phenomenon is termed 'dismutation' and leads to

the production of water and oxygen through the action of superoxide dismutase (SOD).

Trained free divers increase SOD activity during breath-hold diving, and acute changes in antioxidant enzyme activities suggest that they may be protected from excessive antioxidant depletion and oxidative stress during breath-hold diving.²⁵ Suppression of the post-apnea oxidative stress by an increased concentration of thiobarbituric acid reactive substances after three months of breath-hold training has been reported.²⁶ In parallel, an activation of the plasma antioxidant system against oxidative stress has been reported in seals and in scuba diving.^{27,28}

The increase in PO_2 during breath-hold immersion is so short-lived that it is difficult to believe that it could play a significant role. Nevertheless, it has been shown that for breath-hold divers even short hyperoxic or hypoxic periods act as a powerful trigger for physiological responses with successive breath-hold dives.^{29,30} Thus, it seems that ONOO⁻ is generated during such diving, even if hyperoxia is intermittent. This production leads to an inactivation of NO reducing the bioavailability of NO to participate in vasodilation. This may be a factor contributing to the endothelial dysfunction observed after breath-hold diving.⁶

Conclusion

After breath-hold diving, more circulating NO is observed with an increase in ONOO⁻ and a reduction of R-SH. NO may be produced by the physical effort of breath-hold diving. Physical exercise, the transient hyperoxia followed by hypoxia and accumulation of CO_2 increase the level of superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$). This facilitates interaction of $O_2^{\cdot-}$ with NO to form ONOO⁻, opposed to a production of R-SH. Oxidative stress is thus present in breath-hold diving.

Acknowledgements

The authors thank the divers for participating in this study. The study is part of the Phypode Project (grant no. 264816) under a Marie Curie Initial Training Network programme.

References

- 1 Overgaard K, Friis S, Pedersen RB, Lykkeboe G. Influence of lung volume, glossopharyngeal inhalation and P(ET) O_2 and P(ET) CO_2 on apnea performance in trained breath-hold divers. *Eur J Appl Physiol*. 2006;97:158-64.
- 2 Muth CM, Radermacher P, Pittner A, Steinacker J, Schabana R, Hamich S, et al. Arterial blood gases during diving in elite apnea divers. *Int J Sports Med*. 2003;24:104-7.
- 3 Marabotti C, Scalzini A, Cialoni D, Passera M, L'Abbate A, Bedini R. Cardiac changes induced by immersion and breath-hold diving in humans. *J Appl Physiol*. 2009;106:293-7.
- 4 Guazzi M, Arena R. Endothelial dysfunction and pathophysiological correlates in atrial fibrillation. *Heart*. 2009;95:102-6.

- 5 Serg M, Kampus P, Kals J, Zagura M, Zilmer M, Zilmer K, et al. Nebivolol and metoprolol: long-term effects on inflammation and oxidative stress in essential hypertension. *Scand J Clin Lab Invest*. 2012;72:427-32.
- 6 Theunissen S, Guerrero F, Sponsiello N, Cialoni D, Pieri M, Germonpré P, et al. Nitric oxide-related endothelial changes in breath-hold and scuba divers. *Undersea Hyperb Med*. 2013;40(2):135-44.
- 7 Jenkins NT, Witkowski S, Spangenburg EE, Hagberg JM. Effects of acute and chronic endurance exercise on intracellular nitric oxide in putative endothelial progenitor cells: role of NADPH oxidase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009;297:H1798-805.
- 8 Guerrero F, Thioub S, Goanvec C, Theunissen S, Feray A, Balestra C, et al. Effect of tetrahydrobiopterin and exercise training on endothelium-dependent vasorelaxation in SHR. *J Physiol Biochem*. 2012;69:277-87. doi: 10.1007/s13105-012-0210-y. Epub 2012 Sep 26.
- 9 Christina AJ, Alwin Jose M, Heison Robert SJ, Kothai R, Chidambaranathan N, Muthumani P. Effect of *Indigofera aspalathoides* against Dalton's aspic lymphoma. *Fitoterapia*. 2003;74:280-3.
- 10 Wlodek L. Beneficial and harmful effects of thiols. *Pol J Pharmacol*. 2002;54:215-23.
- 11 Ellman G, Lysko H. A precise method for the determination of whole blood and plasma sulfhydryl groups. *Anal Biochem*. 1979;93:98-102.
- 12 Piantadosi CA. Regulation of mitochondrial processes by protein S-nitrosylation. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1820:712-21.
- 13 Khan SA, Lee K, Minhas KM, Gonzalez DR, Raju SV, Tejani AD, et al. Neuronal nitric oxide synthase negatively regulates xanthine oxidoreductase inhibition of cardiac excitation-contraction coupling. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101:15944-8.
- 14 Dujic Z, Breskovic T. Impact of breath holding on cardiovascular respiratory and cerebrovascular health. *Sports Med*. 2012;42:459-72.
- 15 Boussuges A, Blanc F, Carturan D. Hemodynamic changes induced by recreational scuba diving. *Chest*. 2006;129:1337-43.
- 16 Gole Y, Gargne O, Coulange M, Steinberg JG, Bouhaddi M, Jammes Y, et al. Hyperoxia-induced alterations in cardiovascular function and autonomic control during return to normoxic breathing. *Eur J Appl Physiol*. 2011;111:937-46.
- 17 Modun D, Krnic M, Vukovic J, Kokic V, Kukoc-Modun L, Tsikas D, et al. Plasma nitrite concentration decreases after hyperoxia-induced oxidative stress in healthy humans. *Clin Physiol Funct Imaging*. 2012;32:404-8.
- 18 Wolin MS, Ahmad M, Gupta SA. The sources of oxidative stress in the vessel wall. *Kidney Int*. 2005;67:1659-61.
- 19 Jamieson D, Chance B, Cadenas E, Boveris A. The relation of free radical production to hyperoxia. *Annu Rev Physiol*. 1986;48:703-19.
- 20 Sureda A, Ferrer MD, Batle JM, Tauler P, Tur JA, Pons A. Scuba diving increases erythrocyte and plasma antioxidant defenses and spares NO without oxidative damage. *Med Sci Sports Exerc*. 2009;41:1271-6.
- 21 Demchenko IT, Oury TD, Crapo JD, Piantadosi CA. Regulation of the brain's vascular responses to oxygen. *Circ Res*. 2002;91:1031-7.
- 22 Zhilyaev SY, Moskvina AN, Platonova TF, Gutsaeva DR, Churilina IV, Demchenko IT. Hyperoxic vasoconstriction in the brain is mediated by inactivation of nitric oxide by superoxide anions. *Neurosci Behav Physiol*. 2003;33:783-7.
- 23 Angermuller S, Islinger M, Volk A. Peroxisomes and reactive oxygen species, a lasting challenge. *Histochem Cell Biol*. 2009;131:459-63.
- 24 Ferdinandy P, Danial H, Ambrus I, Rothery RA, Schulz R. Peroxynitrite is a major contributor to cytokine-induced myocardial contractile failure. *Circ Res*. 2000;87:241-7.
- 25 Bulmer AC, Coombes JS, Sharman JE, Stewart IB. Effects of maximal static apnea on antioxidant defenses in trained free divers. *Med Sci Sports Exerc*. 2008;40:1307-13.
- 26 Joulia F, Steinberg JG, Faucher M, Jamin T, Ulmer C, Kipson N, et al. Breath-hold training of humans reduces oxidative stress and blood acidosis after static and dynamic apnea. *Respir Physiol Neurobiol*. 2003;137:19-27.
- 27 Vazquez-Medina JP, Zenteno-Savin T, Tift MS, Forman HJ, Crocker DE, Ortiz RM. Apnea stimulates the adaptive response to oxidative stress in elephant seal pups. *J Exp Biol*. 2011;214:4193-200.
- 28 Sureda A, Batle JM, Ferrer MD, Mestre-Alfaro A, Tur JA, Pons A. Scuba diving activates vascular antioxidant system. *Int J Sports Med*. 2012;33:531-6.
- 29 De Bels D, Theunissen S, Devriendt J, Germonpré P, Lafere P, Valsamis J, et al. The 'normobaric oxygen paradox': does it increase haemoglobin? *Diving Hyperb Med*. 2012;42:67-71.
- 30 de Bruijn R, Richardson M, Schagatay E. Increased erythropoietin concentration after repeated apneas in humans. *Eur J Appl Physiol*. 2008;102:609-13.

Submitted: 22 December 2012

Accepted: 12 March 2013

S. Theunissen^{1,2}, N. Sponsiello^{3,4}, M. Rozložnik¹, P. Germonpré^{2,5}, F. Guerrero², D. Cialoni^{1,3,4}, C. Balestra^{1,3,4}

¹ Haute Ecole Paul-Henri Spaak, Environmental & Occupational Physiology Lab., Brussels, Belgium

² Université de Bretagne Occidentale, UFR Sciences et Techniques, 6 avenue Le Gorgeu, CS 93837, Brest

³ DAN Europe Research, Brussels, Belgium

⁴ DAN Europe, Apnea Task Force, Contrada PADUNE, Roseto, Italy

⁵ Center for Hyperbaric Oxygen Therapy, Military Hospital Queen Astrid, Brussels, Belgium.

Address for correspondence:

Sigrid Theunissen

Environmental Occupational & Ageing Physiology Department

Pôle Universitaire de Bruxelles Wallonie

Haute Ecole Paul Henri Spaak

91, Av. C. Schaller

B 1160 Brussels, Belgium

E-mail: <sigtheunissen@gmail.com>

Dark chocolate reduces endothelial dysfunction after successive breath-hold dives in cool water

Sigrid Theunissen · Julie Schumacker · François Guerrero · Frauke Tillmans · Antoine Boutros · Kate Lambrechts · Aleksandra Mazur · Massimo Pieri · Peter Germonpré · Costantino Balestra

Received: 15 June 2013 / Accepted: 16 September 2013
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

Abstract

Objective The aim of this study is to observe the effects of dark chocolate on endothelial function after a series of successive apnea dives in non-thermoneutral water.

Methods Twenty breath-hold divers were divided into two groups: a control group (8 males and 2 females) and a chocolate group (9 males and 1 female). The control group was asked to perform a series of dives to 20 m adding up to 20 min in the quiet diving pool of Conflans-Ste-Honorine (Paris, France), water temperature was 27 °C. The chocolate group performed the dives 1 h after ingestion of 30 g of dark chocolate. Flow-mediated dilatation (FMD), digital photoplethysmography, nitric oxide (NO), and peroxynitrite (ONOO⁻) levels were measured before and after each series of breath-hold dives.

Results A significant decrease in FMD was observed in the control group after the dives (95.28 ± 2.9 % of pre-dive values, $p < 0.001$) while it was increased in the chocolate group (104.1 ± 2.9 % of pre-dive values, $p < 0.01$). A decrease in the NO level was observed in the control group (86.76 ± 15.57 %, $p < 0.05$) whereas no difference was shown in the chocolate group (98.44 ± 31.86 %, $p > 0.05$). No differences in digital photoplethysmography and peroxynitrites were observed between before and after the dives. **Conclusion** Antioxidants contained in dark chocolate scavenge free radicals produced during breath-hold diving. Ingestion of 30 g of dark chocolate 1 h before the dive can

thus prevent endothelial dysfunction which can be observed after a series of breath-hold dives.

Keywords Free radicals · Nitric oxide · Peroxynitrites · Flavonoids · Flow-mediated dilation

Abbreviations

AT II	Angiotensin II
BH ₂	Dihydrobiopterin
BH ₄	Tetrahydrobiopterin
cGMP	Cyclic guanosine monophosphate
eNOS	Endothelial nitric oxide synthase
ET-1	Endothelin-1
FMD	Flow-mediated dilation
GTP	Guanosine triphosphate
H ₂ O ₂	Hydrogen peroxide
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NO	Nitric oxide
ONOO ⁻	Peroxynitrites
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PO ₂	Oxygen pressure
PPT	Peak-to-peak time
RAAS	Renin-angiotensin-aldosterone system
rpm	Revolutions per minute
sGC	Soluble guanylate cyclase
SI	Stiffness index
<i>t</i> test	Student's test

Communicated by Dag Linnarsson.

S. Theunissen (✉) · J. Schumacker · F. Guerrero · F. Tillmans · A. Boutros · K. Lambrechts · A. Mazur · M. Pieri · P. Germonpré · C. Balestra
Haute Ecole Paul Henri Spaak Brussels, Brussels, Belgium
e-mail: sigtheunissen@gmail.com

Introduction

Summertime in warmer climate regions is the ideal time for breath-hold divers and snorkelers to return to their favorite activities in a natural environment. Although these

Published online: 28 September 2013

 Springer

occasional breath-hold divers do not in general dive very deep and for long, professionals such as spear-fishermen, pearl collectors or competitions divers do (Schipke et al. 2006). These divers sometimes stay several hours in the sea where the temperature does not exceed 27° and sometimes without thermal protection. To our knowledge all studies on endothelial function in relation to breath-hold diving were performed in thermoneutral conditions (Theunissen et al. 2013a). Endothelial dysfunction accompanied by an increase in circulating nitric oxide (NO) had been noted after a series of successive breath-hold dives at 20 m depth. This NO increase had been associated with the cardiovascular effort required by breath-hold diving. By contrast, endothelial dysfunction observed by a decrease of flow-mediated dilation (FMD) was explained by a lesser availability of NO to participate in the FMD, either by its combination to superoxide anions or by another phenomenon independent from NO such as an autonomous nervous system action. Breath-hold diving is indeed associated with a change in sympathetic- and parasympathic activity (Foster and Sheel 2005).

The cold inhibits NO synthase expression and provokes a vasoconstriction (Sun 2011). Intaking antioxidants, however, induces a vasodilation by NO release from endothelial cells (Cruz et al. 2006; Nakayama et al. 2013) and/or by enhancing its bioavailability (Zhang et al. 2009). Endothelial dysfunction can thus be reduced by supplementing antioxidants for 4 weeks (Obad et al. 2007b). Dark chocolate has been proven to have positive effects on endothelial function (Grassi et al. 2012; Monahan 2012). This study therefore has two principal aims: (1) verify whether the underlying mechanisms to endothelial dysfunction are maintained in cold water conditions below 27° and (2) observe whether eating dark chocolate before a series of successive breath-hold dives can limit the endothelial dysfunction generally observed post-apnea.

Methods

Study population

After written informed consent, 20 non-smoking experienced (at least 4 years of experience) breath-hold divers volunteered for the study. Prior to entering the study, they were assessed fit to dive by a qualified diving physician. None of the subjects had a history of previous cardiac abnormalities and none of them were on any cardio-active medication. All participants were asked to refrain from strenuous exercise and nitrate-rich food for 48 h before the tests and not to dive for 72 h before testing. They were divided into a chocolate group (9 males and 1 female) and a control group (8 males and 2 females).

Dive profile and timeline of measurements

Each breath-hold diver performed successive dives to a depth of 20 m for a cumulative breath-hold time of 20 min. Dives were organized in pairs allowing each diver to act as the other's safety buddy. The total time in the water was around 1 h. At the surface, the divers were asked not to do any cardiovascular effort. All dives were performed (after breathing air) in a calm diving pool (Conflans-Ste-Honorine, France). The air temperature was 30° and the water temperature was 27 °C. The divers did not use wet suits.

The chocolate group performed the same dives in the same conditions as the control group 1 h after ingestion of 30 g of a commercially available Belgian dark chocolate with 86 % cocoa. The amount of polyphenols was 135.8 ± 2.9 μmol of catechin equivalents per gram.

Measurements

Endothelial function

Arterial endothelial function was assessed before and after each series of breath-hold dives by measuring the FMD of the brachial artery (Raitakari and Celermajer 2000). Since it is the relative FMD variation which is of interest here, the FMD measurement was assessed according to the methodology used by Brubakk et al. (2005) for the same kind of in-field analysis following a standardized protocol and guidelines (Corretti et al. 2002). The FMD was measured with a 5–10 MHz transducer (Mindray DP 6600, Mindray, China). The brachial artery diameter was measured from longitudinal images with the lumen–intima interface visualized on both (anterior and posterior) walls. Boundaries for diameter measurement were identified automatically by means of a boundary tracking software (FMD-I software, FLOMEDI, Belgium) and optically controlled by an experimenter. Once the basal measurements were obtained, the sphygmomanometric cuff, placed above the ultrasound probe, was inflated and held at 50 mmHg above systolic pressure for 5 min. Occlusion up to 5 min produces a transient artery dilation attributable to NO synthesis (Lieberman et al. 1996). After ischemia the cuff was rapidly deflated and the brachial artery was monitored for an additional 4 min automatically. A single experienced experimenter performed and read all vascular studies. The FMD was computed as the percentage change in brachial artery diameter measured at peak dilation.

Digital photoplethysmography

Arterial stiffness of large arteries was estimated from pulse wave obtained at the finger by an infrared sensor (Pulse Trace PCA 2, Micro Medical, UK). This non-invasive

method is very easy to use and non-experimenter-dependent (Allen 2007). The waveform depends on vascular tone in the arterial tree. The contour of the wave exhibits two peaks. The first peak is formed by pressure transmitted along a direct path from the left ventricle to the finger. The second peak is formed in part by pressure transmitted along the aorta and large arteries to sites of impedance mismatch in the lower body (Millasseau et al. 2002). The peak-to-peak time (PPT) is the time taken for pressure to propagate along the aorta and large arteries to the major site of reflection in the lower body and back to the root of the subclavian artery. The waveform volume in the finger is thus directly related to the time it takes for the pulse waves to travel through the arterial tree. This PPT is proportional to subject height, and the stiffness index (SI) was formulated as h/PPT where h corresponds to the height expressed in m and PPT is the Peak-to-peak time expressed in seconds. Large artery stiffness decreases the time taken for pressure waves reflected from the periphery of the circulation to return to the aorta. Reflected waves arrive earlier in the cardiac cycle and may in part explain the change in pulse contour (Nicholas et al. 1990).

Blood analysis

Blood samples were collected before diving and 15 min after the series of dives. The samples were drawn from an antecubital fossa vein into an EDTA tube and centrifuged according to the protocol (1,000 rpm for 15 min for the NO and 3,500 rpm for 10 min for the peroxynitrites (ONOO⁻) at 4 °C) in order to separate blood cells and plasma. The plasma was then stored at -80 °C and all analyses were performed within the following 6 months on the same microplate (one for each test) in order to analyze all the samples at the same time and avoid variance bias.

Plasma levels of nitrite and nitrate, NO metabolites, were determined by a colorimetric method (Cayman, Ann Arbor, MI, USA) according to the manufacturer's instructions. The NO₂/NO₃ Assay Kit contains dyes, nitrate reductase, enzyme cofactor, buffer solution and NO₂, NO₃ solutions as standards. Total NO metabolites are thus detectable. Nitrite/nitrate (NO_x) concentration in different dilutions of plasma ultrafiltrate was determined by colorimetry based on the Griess reaction (Theunissen et al. 2013a).

Peroxyntites were measured according to the manufacturer's instructions using the OxiSelectTM Nitrotyrosine ELISA kit.

All experimental procedures were conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and were approved by the Academic Ethical Committee of Brussels. All methods and potential risks were explained to the participants in detail and they gave their written informed consent before the experiment.

Statistical analysis

Statistical analyses were conducted using GraphPad Prism 5 (La Jolla, CA, USA). Data are given as a percentage of pre-dive values. The difference between the percentage of pre-dive values and 100 % was compared by a two-tailed one-sample *t* test when normality of the sample was reached as assessed by the Kolmogorov-Smirnov test. Otherwise, the non-parametric Wilcoxon Rank Sum test was used. Statistical significance level was set at $p < 0.05$.

Results

When comparing control and chocolate divers, as far as age (47.3 ± 12.5 years vs. 49.7 ± 8.3 years, $p = 0.63$), height (178.4 ± 7.6 cm vs. 179.8 ± 6.1 cm, $p = 0.65$), weight (76.1 ± 11.5 kg vs. 77.3 ± 7.6 kg, $p = 0.78$) are concerned; both groups are comparable. The divers were asked to perform a series of breath-hold dives to 20 m in order to dive a cumulative breath-hold time of 20 min.

The mean number of breath-hold repetitions was 10 ± 2 dives in the control group with an immersion time of 19.57 ± 2.41 min and 9 ± 2 dives with a mean immersion time of 18.53 ± 3.5 min in the chocolate group. The mean recovery period between successive breath-hold dives was 4.55 ± 1.19 min. The duration time in the water was about 1 h. All divers completed the study and no one developed symptoms of decompression sickness.

Brachial artery diameter and flux-dependent dilation

No increase in pre-occlusion brachial artery diameter was observed for either the control group (102.1 ± 5.5 % of pre-dive values, $p > 0.05$) or the chocolate group (99.9 ± 1.5 % of pre-dive values, $p > 0.05$).

An FMD decrease was however observed in the control group between pre- and post-dive (95.3 ± 2.9 % of pre-dive values, $p < 0.001$) whereas the FMD was increased in the chocolate group (104.1 ± 2.9 % of pre-dive values, $p < 0.01$). The difference between the control group and that having eaten chocolate an hour before diving is statistically significant ($p < 0.001$). FMD changes are presented in Figs. 1, 2.

Digital photoplethysmography

In the microcirculation, we do not find any variation between the values of pre- and post-dive in the two groups of the PPT (100.8 ± 21.5 % of pre-dive values, $p > 0.05$ for the control group and 108.7 ± 25.1 %, $p > 0.05$ for the chocolate group). Furthermore, no variation is observed for the arterial rigidity (SI is 103.1 ± 20.9 % of pre-dive

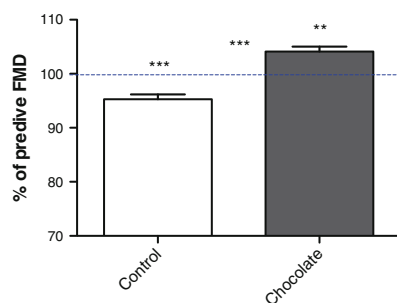


Fig. 1 Evolution of flow-mediated dilation (FMD) in the control group and in the group of breath-hold divers having eaten 30 g of dark chocolate an hour before the dives. Results are given in mean and standard error of the mean (SEM). The FMD of the control group is significantly reduced post-dives compared to its pre-dive value (***), whereas that of the divers having eaten chocolate significantly increases (**). The difference of FMD between the two groups is highly significant (***) (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

values, $p > 0.05$ after a series of successive dives and $96.2 \pm 20.6\%$, $p > 0.05$ postdive with chocolate ingestion).

Circulating nitric oxide and peroxynitrites

A reduction in circulating NO is observed after a series of successive dives to 20 m totaling a cumulative breath-hold time of 20 min ($86.8 \pm 15.6\%$ of pre-dive values, $p < 0.05$) whereas no NO variation is observed after the series of successive breath-hold dives preceded by chocolate ingestion ($98.4 \pm 31.9\%$ of pre-dive values, $p > 0.05$).

Looking at the oxidative stress markers, no variation in ONOO^- is observed, neither for the control group ($112.8 \pm 40.1\%$ of pre-dive values, $p > 0.05$) nor for the chocolate group ($105.1 \pm 34.6\%$ of pre-dive values, $p > 0.05$).

The absolute values of the different parameters cited above are given in Table 1.

Discussion

In order to achieve a total of 20 min of cumulative breath-hold time, the divers participating in this study had to stay around 1 h almost still in water at a temperature of 27° . These conditions were chosen in order to be comparable to those a diver doing breath-hold diving would encounter in the sea during summer. Indeed these conditions caused most of our divers to feel cold, as would be the case at sea. Our results point towards the same mechanisms than earlier

studies (Theunissen et al. 2013a, b) but the cold could have decreased the NO-related values.

As a reminder, diving comprises of three phases: First a descent phase when the divers have to make an effort to descend during the first meters. Then a hyperoxic phase at 20 m, due to an increase in PaO_2 . This phase is rapidly followed by a hypercapnic hypoxic phase due to the oxygen (O_2) consumption, which induces carbon dioxide (CO_2) production. Finally, during the return to the surface, the divers have to make a physical effort until they recover their neutral buoyancy. This hypercapnic hypoxic phase increases with the pressure decrease.

The activation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) to form NO is mediated by the protein kinase Akt (Lehoux and Tedgui 2004), in turn phosphorylated by the phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) (Dimmeler et al. 1998). The NO thus produced by eNOS activates the soluble guanylate cyclase (sGC), an enzyme catalysing guanosine triphosphate into cyclic guanosine monophosphate (cGMP), second messenger of vascular relaxation (Pellegrin et al. 2009). Previous studies (Theunissen et al. 2013a, b) have shown an increase of NO production during breath-hold diving. This increase has been associated to the cardiovascular effort done during this type of diving. It is indeed known that physical exercise increases NO production (Pellegrin et al. 2009; Wang et al. 1993) and that, under normal conditions, physical training enhances endothelial function (Pellegrin et al. 2009), which is directly linked to an increase in bioavailability of NO in vascular smooth muscle (de Moraes et al. 2008). One could also consider the NO availability and the efficiency of eNOS in the pulmonary vascular system having a protective effect on the onset of edema in breath-hold divers (Cialoni et al. 2012) hence the eventual benefits of dark chocolate supplementation.

This phenomenon was not found in this study: we have instead found a decrease in NO in the control group. We hypothesize that the NO production induced by exercise was counterbalanced by several factors:

1. Despite the increase in NO production, exercise produces also an oxidative stress (Davies et al. 1982; Duthie et al. 1990). A bigger oxidative stress, however, increases the amount of superoxide anions. These can quickly interact with NO to form ONOO^- , thus decreasing NO availability in the vascular smooth muscle. Theunissen et al. (2013b) have already demonstrated the presence of oxidative stress post breath-hold dive.
2. The hyperoxia brought by the last phase of the descent portion of the breath-hold dive also results in an increase of superoxide anions production, free radicals. This can be transformed in H_2O_2 , a powerful oxidant,

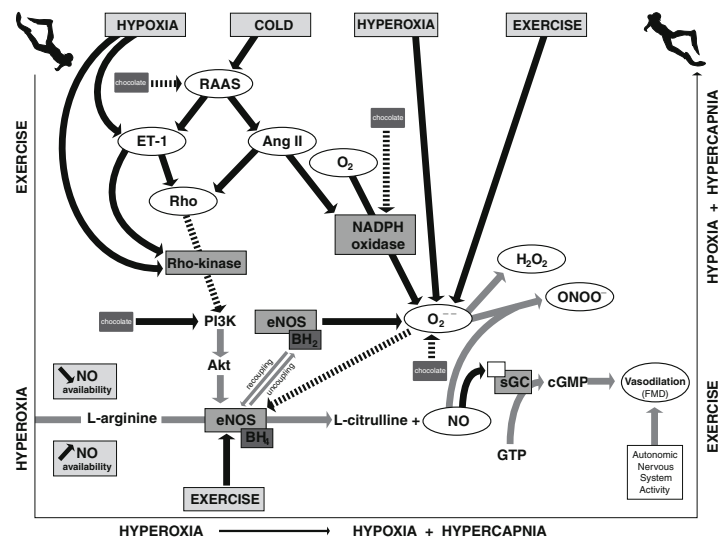


Fig. 2 Influence of exercise, hypoxia, hyperoxia, cold exposure and antioxidants on nitric oxide (NO) bioavailability. In normal conditions NO is produced from L-arginine by the endothelial nitric oxide synthase (eNOS). This enzyme needs a cofactor, tetrahydrobiopterin (BH₄). The NO produced by eNOS activates the soluble guanylate cyclase (sGC), which catalyzes the formation of cyclic guanosine monophosphate 3,5 (cGMP) from guanosine triphosphate (GTP) inducing vasodilation as observed by flow-mediated dilation (FMD). Exercise contributes to an increased NO production through eNOS activation but is also associated with oxidative stress, including production of superoxide anions (O₂⁻). These are formed by NADPH oxidase from oxygen. Hyperoxia also induces superoxide anions production. The latter oxidize BH₄ into dihydrobiopterin (BH₂) reducing BH₄ levels. This induces an uncoupling of eNOS leading to production of superoxide anions by eNOS instead of NO. This enhances oxidative stress. Indeed, superoxide anions can combine with NO to form peroxynitrite (ONOO⁻) or be converted into hydrogen peroxide (H₂O₂). Exposure to cold activates the renin–

angiotensin–aldosterone system (RAAS) increasing production of endothelin-1 (ET-1) and angiotensin (Ang II). Both increase the amount of Rho. This induces an increased activity of Rho-kinase, resulting in decreased eNOS activation and therefore reduced NO production, due to the inactivation of phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K). Furthermore, Ang II increases the presence of NADPH oxidase and therefore promotes formation of superoxide anions. This consequently increases oxidative stress leading to a reduced bioavailability of NO. Hypoxia activates ET-1 production and Rho-kinase activity leading to a downregulation of eNOS. NO produced by exercise is thus counterbalanced by the combination of eNOS inhibitions and reduced NO availability by oxidative stress. When eating dark chocolate antioxidants reduce the RAAS system and NADPH oxidase activity, activate PI3K production and scavenge superoxide anions. All these effects lead to a better activity of eNOS. Continue black lines activation/production, Discontinue black lines inhibition/scavenging, Gray lines transformation

or reacts with NO to form ONOO⁻ (Jamieson et al. 1986; Sureda et al. 2009), thus creating oxidative stress and decreasing NO bioavailability (Demchenko et al. 2002). The hypothesis that the increase of PO₂ favors oxidative stress, and therefore endothelial dysfunction, is generally accepted (Demchenko et al. 2000). Hyperoxia is also associated with a decrease in tetrahydrobiopterin (BH₄), a major cofactor of eNOS (Fisman et al. 2013). The lack of BH₄ in endothelial cells exposed to an oxidative stress can induce a decoupling of eNOS leading to a production of superoxide anions by the eNOS instead of NO (Vasquez-Vivar et al. 1998). This induces a reduced activity of eNOS and a lesser release of NO (Fisman et al. 2013; Forstermann 2010; Ilan et al. 2005). This

reduced NO production is observed by a decrease in vasodilation shown by the FMD reduction. Nevertheless, we can consider that free radicals produced during deep breath hold diving perhaps are not completely bad and actually may contribute to a “training effect” for breath hold divers since recent studies are reporting beneficial effect of oxidative stress and, on the contrary, a more mitigated effect for antioxidant intake (Nikolaidis et al. 2012).

3. Hypoxia also increases the expression and activity of Rho-kinase (Takemoto et al. 2002). Rho-kinase however facilitates the downregulation of the eNOS expression induced by hypoxia (Takemoto et al. 2002), thus reducing the endothelial production of NO. Furthermore, hypoxia increases endothelin-1

Table 1 Absolute values of the pre-occlusion diameters of the brachial artery, of the flow-mediated dilation, of the photoplethysmographic and haematological parameters before (pre-dive) and after (post-dive) a series of successive breath-hold dives to 20 m depth totalling a cumulative breath-hold time of 20 min for the control and the chocolate groups

	Control (<i>n</i> = 10)				<i>t</i> test
	Pre-dive		Post-dive		
	Mean	SD	Mean	SD	
Pre-occlusion brachial diameter (mm)	4.4	0.7	4.4	0.6	NS
Flow-mediated dilation (%)	113.9	4.3	108.5	5.2	***
Peak-to-peak time (ms)	177.6	50.8	177.1	53.7	NS
Stiffness index (m/s)	10.8	3	11.1	3.8	NS
Nitric oxide (NO) (μM)	8.4	4	7.6	4.6	*
Peroxynitrites (ONOO [−]) (μM)	23.8	6.5	25.7	6.2	NS
Dark chocolate (<i>n</i> = 10)					
Pre-occlusion brachial diameter (mm)	4.6	0.4	4.6	0.4	NS
Flow-mediated dilation (%)	112.7	6.6	117.3	6.6	**
Peak-to-peak time (ms)	192.5	39.4	204.4	40.7	NS
Stiffness index (m/s)	9.7	2.1	9.1	2.1	NS
Nitric oxide (NO) (μM)	10.5	4.5	10.1	4.5	NS
Peroxynitrites (ONOO [−]) (μM)	22.7	7.8	23.4	8.4	NS

Results are given in mean and standard deviation (SD). The Student's *t* test compares the values of pre- and post-dive for each group (NS *p* > 0.05, * *p* < 0.05, ** *p* < 0.01 and *** *p* < 0.001)

(ET-1) levels (Pisarcik et al. 2013) having an effect on the eNOS inhibition via the Rho-kinase activation. Exercise and/or, at least partially, intermittent hyperoxia and subsequent hypoxia (McQuillan et al. 1994) during the dive could explain the decrease in the endothelial response since hyperoxia and hypoxia both lead to a reduction in NO bioavailability. The increase in PO₂ during breath-hold diving is very short, nevertheless it has been shown that even very short hyperoxic (Balestra et al. 2006) or hypoxic (de Bruijn et al. 2008) situations played a powerful triggering role provoking physiological responses found after successive breath-hold dives.

- The cold could also intervene in this decrease of circulating NO observed. Exposure to cold indeed activates the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS), which in turn reduces the expression of eNOS and the formation of NO (Sun 2011). Indeed, RAAS regulates the production of ET-1 due to the cold (Sun 2011). ET-1 as well as angiotensin II (AT II), increases the amount of Rho (Budzyn et al. 2005). This activation induces an increase in Rho-kinase, which by PI3K inactivation results in a decrease in the activity of eNOS (Budzyn et al. 2005). Bailey (2005) and Dubraca (2005) show also an increase in Rho-kinase activity when vessels are exposed to a particular physiological stress, such as a change in the status of redox (Thompson-Torgerson et al. 2007).

The studies of Theunissen et al. (2013a, b) present an increase in circulating NO after a series of successive breath-hold dives. It is noteworthy that the conditions of the dives, with the exception of the water temperature, were the same as those in that study. Therefore oxidative stress, hyperoxia and hypoxia, parameters all going against NO bioavailability and linked to breath-hold diving, were already present in these previous studies. We could therefore consider that here the decrease in circulating NO in the control group is due to the additional effect of cold. The increase in NO production linked to the cardiovascular effort would here not be enough to compensate the combined effect of oxidative stress, hyperoxia at the start of the dive, hypoxia at the end of the dive and the cold.

In addition a portion of the remaining NO is inactivated due to its transformation in ONOO⁻. This decrease leads to a vasoconstriction and alters the NO-dependent vasoconstriction, which agrees with recent discoveries on breath-hold divers (Theunissen et al. 2013a; Zhilyaev et al. 2003).

In this study our results do not show a modification in ONOO⁻ amounts. The ONOO⁻ are coming from NO combination to superoxide anions. If a reduction of NO is observed, the reaction forming ONOO⁻ is thus reduced. This could therefore explain the stability of ONOO⁻ amount despite an increase in oxidative stress, but questions the use of ONOO⁻ as a marker of oxidative stress. Other markers have indeed shown a change after breath-hold diving, such as an increase in thiobarbituric acid

reactive substances (Joulia et al. 2002), or of the activity of superoxide dismutase and glutathione peroxidase (Rousseau et al. 2006).

In the group supplemented with dark chocolate, NO and ONOO⁻ values stay constant, pre- and post-dive. Taking flavonoids has antioxidant effects on endothelial cells by reducing, on the one hand, the expression and activity of NADPH oxidase and, on the other hand, by diminishing oxidative stress (Andriantsitohaina et al. 2012), thus limiting the available quantity of free radicals in blood, including that of superoxide anions. Flavonoids are indeed associated with a direct decrease in NADPH oxidase (source of superoxide anions), to a decrease in RAAS activity (activating system for NADPH oxidase) and to an increase in the expression of antioxidative enzymes and PI3K amount (which intervenes in the activation of eNOS) (Andriantsitohaina et al. 2012).

Consequently the amounts of BH₄ and PI3K, as well as enzymatic activity of eNOS, are increased. However the divers were cold, which induced the mechanisms already described above for the control group reducing the activity and expression of eNOS. The combined effect of exercise with taking antioxidants has therefore induced an increased activity and expression of the eNOS. However this increase seems, from our results, to have been counteracted by hyperoxia, hypoxia, cold and exercise-induced oxidative stress, all of which reduce the activity of this enzyme. Given that the amount of NO is stable and that taking antioxidants has reduced the amount of superoxide anions present in the blood, the equilibrium of the reaction forming the ONOO⁻ has not been perturbed, which explains why the ONOO⁻ amount stayed stable.

In this study signs of endothelial dysfunction, indicated by an FMD reduction, were found in the control group after a series of successive breath-hold dives. Conversely, a significant increase in FMD was found in the group which was supplemented with chocolate.

In the control group the reduction of the FMD confirms the results obtained previously (Theunissen et al. 2013a). The FMD decrease seems to confirm that breath-hold diving has an influence on endothelial function and could be partially explained by the reduced NO bioavailability.

Conversely the divers supplemented with dark chocolate presented an increase in FMD. This could be explained by the antioxidative characteristics of dark chocolate. However, the increase in FMD despite an amount of NO which was not modified points towards the latter being due to another factor than the NO-cGMP pathway. This agrees with the results of Theunissen et al. (2013a) after a series of successive breath-hold dives in 33° water where the FMD was reduced despite a significantly increased circulating NO. Breath-hold diving is accompanied by a change in the sympa- and para-sympathic activities (Foster and Sheel

2005). In our study, however, the diameters of pre-occlusion are not modified, neither in the control group nor in the group that ate chocolate. We could therefore hypothesize that the autonomous nervous system effect is not a main factor responsible for the increase in FMD in divers having been supplemented with chocolate. Nevertheless, other authors point out that hyperoxia leads to cardiovascular function and autonomous nervous system alterations during the exposition and after the return to normoxic breathing (Gole et al. 2011). The increased FMD could then be due to a relaxation of the vascular smooth muscle by the antioxidant effects of chocolate. Indeed, it has been suggested that in the process of vascular dysfunction during diving, functional changes in the vessel wall may not be limited to the endothelium and may be mediated by alterations in vascular smooth muscle (Lambrechts et al. 2013). But the vascular responses to oral nitroglycerin administration are not altered by chocolate/cocoa (Heiss et al. 2007; Monahan et al. 2011), what proves that the increase FMD after chocolate intake is not due to a greater reactivity of the vascular smooth muscle. The antioxidant characteristics of chocolate are then maybe responsible for the FMD increase without circulating NO increase after the dive, but the underlying mechanisms remain to be determined.

Contrary to FMD, photoplethysmography did not show any changes in either group. Previous studies have already observed a different reaction between flux-dependent dilation and photoplethysmography (Cornelissen et al. 2012; Obad et al. 2007a; Theunissen et al. 2013a). Llauradó et al. (2013) report that a change in endothelial function is not associated with an arterial stiffness in diabetic patients of type 1. The stiffness of arterial trunk comprises complex modifications of the structural organization of the different components of the arterial wall (Zieman et al. 2005) which lead to a reduction of its distensibility. They suggest that endothelial dysfunction precedes arterial rigidity (Llauradó et al. 2013). Diving provokes an oxidative stress which attacks the endothelium and could therefore increase arterial stiffness over longer time. This could be avoided by the input of flavonoids (Teede et al. 2003; van der Schouw et al. 2002) but this study, because of its limited duration, does probably not allow showing it.

Conclusion

In this study we observe a decrease in FMD and of circulating NO level after a series of successive breath-hold dives. The FMD decrease seems to confirm that breath-hold diving has a negative influence on endothelial function and could partially explain the decrease in NO bioavailability. We hypothesize that the NO production induced by exercise is counterbalanced by several factors,

like hyperoxia, hypoxia, cold and the oxidative stress produced by exercise. However, an increase in FMD without change of NO amount was observed after a series of successive breath-hold dives carried out in the same conditions but for divers having eaten dark chocolate. This could be explained by the ingestion of the dark chocolate. The antioxidants in the dark chocolate could indeed decrease the production of free radicals during the breath-hold dive. The combined effect of exercise and taking antioxidants could therefore have induced an increase in activity and expression of eNOS. However, this increase would seem to have been counteracted by the combined action of hyperoxia, hypoxia, cold and the oxidative stress produced by exercise. The lack of change of NO, together with an FMD modification, suggests that the latter may be due to another factor than the NO-cGMP pathway. Despite an increase in oxidative stress associated to breath-hold diving, the amount of ONOO⁻ did not change, with or without antioxidants input. The production of ONOO⁻ being NO dependent, it could have been slowed down by the lack of NO increase. This could therefore explain the stability of ONOO⁻ amount despite an increase in oxidative stress, but challenges the use of ONOO⁻ level as a marker of oxidative stress.

This study does not allow observing the effects of flavonoids on arterial stiffness. To do so would require a study over a longer period of time.

Nevertheless it is clear from our study that ingesting 30 g of dark chocolate an hour before the dive could be an effective way of preventing the endothelial dysfunction observed after a series of successive breath-hold dives.

Acknowledgments The authors wish to thank the divers for participating in this study. The study is part of the Phypode Project under a Marie Curie Initial Training Network programme.

Conflict of interest The authors have no conflict of interest to declare.

References

- Allen J (2007) Photoplethysmography and its application in clinical physiological measurement. *Physiol Meas* 28:R1–R39
- Andriantsitohaina R, Auger C, Chataigneau T, Etienne-Selloum N, Li H, Martinez MC, Schini-Kerth VB, Laher I (2012) Molecular mechanisms of the cardiovascular protective effects of polyphenols. *Br J Nutr* 108:1532–1549
- Bailey SR, Mitra S, Flavahan S, Flavahan NA (2005) Reactive oxygen species from smooth muscle mitochondria initiate cold-induced constriction of cutaneous arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289:H243–H250
- Balestra C, Germonpre P, Poortmans JR, Marroni A (2006) Serum erythropoietin levels in healthy humans after a short period of normobaric and hyperbaric oxygen breathing: the “normobaric oxygen paradox”. *J Appl Physiol* 100:512–518
- Brubakk AO, Duplancic D, Valic Z, Palada I, Obad A, Bakovic D, Wisloff U, Dujic Z (2005) A single air dive reduces arterial endothelial function in man. *J Physiol* 566:901–906
- Budzyn K, Marley PD, Sobey CG (2005) Opposing roles of endothelial and smooth muscle phosphatidylinositol 3-kinase in vasoconstriction: effects of rho-kinase and hypertension. *J Pharmacol Exp Ther* 313:1248–1253
- Cialoni D, Sponsiello N, Marabotti C, Marroni A, Pieri M, Maggiorelli F, Tonerini M, Frammartino B (2012) Prevalence of acute respiratory symptoms in breath-hold divers. *Undersea Hyperb Med* 39:837–844
- Cornelissen VA, Onkelinx S, Goetschalckx K, Thomaes T, Janssens S, Fagard R, Verhamme P, Vanhees L (2012) Exercise-based cardiac rehabilitation improves endothelial function assessed by flow-mediated dilation but not by pulse amplitude tonometry. *Eur J Prev Cardiol*
- Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA, Deanfield J, Drexler H, Gerhard-Herman M, Herrington D, Vallance P, Vita J, Vogel R, International Brachial Artery Reactivity Task Force (2002) Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol* 39:257–265
- Cruz MN, Luksha L, Logman H, Poston L, Agewall S, Kublickiene K (2006) Acute responses to phytoestrogens in small arteries from men with coronary heart disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290:H1969–H1975
- Davies KJ, Quintanilha AT, Brooks GA, Packer L (1982) Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem Biophys Res Commun* 107:1198–1205
- de Bruijn R, Richardson M, Schagatay E (2008) Increased erythropoietin concentration after repeated apneas in humans. *Eur J Appl Physiol* 102:609–613
- de Moraes C, Davel AP, Rossoni LV, Antunes E, Zanesco A (2008) Exercise training improves relaxation response and SOD-1 expression in aortic and mesenteric rings from high caloric diet-fed rats. *BMC Physiol* 8:12
- Demchenko IT, Boso AE, O'Neill TJ, Bennett PB, Piantadosi CA (2000) Nitric oxide and cerebral blood flow responses to hyperbaric oxygen. *J Appl Physiol* 88:1381–1389
- Demchenko IT, Oury TD, Crapo JD, Piantadosi CA (2002) Regulation of the brain's vascular responses to oxygen. *Circ Res* 91:1031–1037
- Dimmeler S, Assmus B, Hermann C, Haendeler J, Zeiher AM (1998) Fluid shear stress stimulates phosphorylation of Akt in human endothelial cells: involvement in suppression of apoptosis. *Circ Res* 83:334–341
- Dubroca C, You D, Levy BI, Loufrani L, Henrion D (2005) Involvement of RhoA/Rho kinase pathway in myogenic tone in the rabbit facial vein. *Hypertension* 45:974–979
- Duthie GG, Robertson JD, Maughan RJ, Morrice PC (1990) Blood antioxidant status and erythrocyte lipid peroxidation following distance running. *Arch Biochem Biophys* 282:78–83
- Fismen L, Eide T, Hjelde A, Svardal AM, Djurhuus R (2013) Hyperoxia but not ambient pressure decreases tetrahydrobiopterin level without affecting the enzymatic capability of nitric oxide synthase in human endothelial cells. *Eur J Appl Physiol*
- Forstermann U (2010) Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflügers Arch* 459:923–939
- Foster GE, Sheel AW (2005) The human diving response, its function, and its control. *Scand J Med Sci Sports* 15:3–12
- Gole Y, Gargne O, Coulange M, Steinberg JG, Bouhaddi M, Jammes Y, Regnard J, Boussuges A (2011) Hyperoxia-induced alterations in cardiovascular function and autonomic control during return to normoxic breathing. *Eur J Appl Physiol* 111:937–946

- Grassi D, Desideri G, Necozione S, Ruggieri F, Blumberg JB, Stornello M, Ferri C (2012) Protective effects of flavanol-rich dark chocolate on endothelial function and wave reflection during acute hyperglycemia. *Hypertension* 60:827–832
- Heiss C, Finis D, Kleinbongard P, Hoffmann A, Rassaf T, Kelm M, Sies H (2007) Sustained increase in flow-mediated dilation after daily intake of high-flavanol cocoa drink over 1 week. *J Cardiovasc Pharmacol* 49:74–80
- Ilan E, Tirosh O, Madar Z (2005) Triacylglycerol-mediated oxidative stress inhibits nitric oxide production in rat isolated hepatocytes. *J Nutr* 135:2090–2095
- Jamieson D, Chance B, Cadenas E, Boveris A (1986) The relation of free radical production to hyperoxia. *Annu Rev Physiol* 48:703–719
- Joulia F, Steinberg JG, Wolff F, Gavarry O, Jammes Y (2002) Reduced oxidative stress and blood lactic acidosis in trained breath-hold human divers. *Respir Physiol Neurobiol* 133:121–130
- Lambrechts K, Pontier JM, Balestra C, Mazur A, Wang Q, Buzzacott P, Theron M, Mansourati J, Guerrero F (2013) Effect of a single, open-sea, air SCUBA dive on human micro- and macro-vascular function. *Eur J Appl Physiol* 113(10):2637–2645
- Lehoux S, Tedgui A (2004) Shear and signal transduction in the endothelial cell. *Med Sci* 20:551–556
- Lieberman EH, Gerhard MD, Uehata A, Selwyn AP, Ganz P, Yeung AC, Creager MA (1996) Flow-induced vasodilation of the human brachial artery is impaired in patients < 40 years of age with coronary artery disease. *Am J Cardiol* 78:1210–1214
- Llauradó G, Ceperuelo-Mallafre V, Vilardell C, Simó R, Albert L, Berlanga E, Vendrell J, Gonzalez-Clemente JM (2013) Impaired endothelial function is not associated with arterial stiffness in adults with type 1 diabetes. *Diabetes Metab* 39(4):355–362
- McQuillan LP, Leung GK, Marsden PA, Kostyk SK, Kourembanas S (1994) Hypoxia inhibits expression of eNOS via transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *Am J Physiol* 267:H1921–H1927
- Millasseau SC, Kelly RP, Ritter JM, Chowienczyk PJ (2002) Determination of age-related increases in large artery stiffness by digital pulse contour analysis. *Clin Sci (Lond)* 103:371–377
- Monahan KD (2012) Effect of cocoa/chocolate ingestion on brachial artery flow-mediated dilation and its relevance to cardiovascular health and disease in humans. *Arch Biochem Biophys* 527:90–94
- Monahan KD, Feehan RP, Kunselman AR, Preston AG, Miller DL, Lott ME (2011) Dose-dependent increases in flow-mediated dilation following acute cocoa ingestion in healthy older adults. *J Appl Physiol* 111:1568–1574
- Nakayama H, Tsuge N, Sawada H, Higashi Y (2013) Chronic intake of onion extract containing quercetin improved postprandial endothelial dysfunction in healthy men. *J Am Coll Nutr* 32:160–164
- Nicholas WW, O'Rourke MF, McDonald DA (1990) McDonald's blood flow in arteries : theoretic, experimental, and clinical principles. Lea & Febiger, Philadelphia
- Nikolaïdis MG, Kerksick CM, Lamprecht M, McNulty SR (2012) Does vitamin C and E supplementation impair the favorable adaptations of regular exercise? *Oxid Med Cell Longev* 2012:707941
- Obad A, Palada I, Valic Z, Ivancev V, Bakovic D, Wisloff U, Brubakk AO, Dujic Z (2007a) The effects of acute oral antioxidants on diving-induced alterations in human cardiovascular function. *J Physiol* 578:859–870
- Obad A, Valic Z, Palada I, Brubakk AO, Modun D, Dujic Z (2007b) Antioxidant pretreatment and reduced arterial endothelial dysfunction after diving. *Aviat Space Environ Med* 78:1114–1120
- Pellegrin M, Mazzolai L, Berthelot A, Laurant P (2009) Dysfonction endothéliale et risque cardiovasculaire. L'exercice protège la fonction endothéliale et prévient la maladie cardiovasculaire. *Sci Sports* 24:63–73
- Pisarcik S, Maylor J, Lu W, Yun X, Undem C, Sylvester JT, Semenza GL, Shimoda LA (2013) Activation of hypoxia-inducible factor-1 in pulmonary arterial smooth muscle cells by endothelin-1. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 304:L549–L561
- Raitakari OT, Celermajer DS (2000) Testing for endothelial dysfunction. *Ann Med* 32:293–304
- Rousseau AS, Richer C, Richard MJ, Favier A, Margaritis I (2006) Plasma glutathione peroxidase activity as a potential indicator of hypoxic stress in breath-hold diving. *Aviat Space Environ Med* 77:551–555
- Schipke JD, Gams E, Kallweit O (2006) Decompression sickness following breath-hold diving. *Res Sports Med* 14:163–178
- Sun Z (2011) Cardiovascular responses to cold exposure. *Front Biosci (Elite Ed)* 2:495–503
- Sureda A, Ferrer MD, Batle JM, Tauler P, Tur JA, Pons A (2009) Scuba diving increases erythrocyte and plasma antioxidant defenses and spares NO without oxidative damage. *Med Sci Sports Exerc* 41:1271–1276
- Takemoto M, Sun J, Hiroki J, Shimokawa H, Liao JK (2002) Rho-kinase mediates hypoxia-induced downregulation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 106:57–62
- Teede HJ, McGrath BP, DeSilva L, Cehun M, Fassoulakis A, Nestel PJ (2003) Isoflavones reduce arterial stiffness: a placebo-controlled study in men and postmenopausal women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:1066–1071
- Theunissen S, Guerrero F, Sponsiello N, Cialoni D, Pieri M, Germonpre P, Obeid G, Tillmans F, Papadopolou V, Hemelryck W, Marroni A, De Bels D, Balestra C (2013a) Nitric oxide-related endothelial changes in breath-hold and scuba divers. *Undersea Hyperb Med* 40:135–144
- Theunissen S, Sponsiello N, Rozloznik M, Germonpré P, Guerrero F, Cialoni D, Balestra C (2013b) Oxidative stress in breath-hold divers after repetitive dives. *Diving Hyperb Med* 43:63–66
- Thompson-Torgerson CS, Holowatz LA, Flavahan NA, Kenney WL (2007) Cold-induced cutaneous vasoconstriction is mediated by Rho kinase in vivo in human skin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292:H1700–H1705
- van der Schouw YT, Pijpe A, Lebrun CE, Bots ML, Peeters PH, van Staveren WA, Lamberts SW, Grobbee DE (2002) Higher usual dietary intake of phytoestrogens is associated with lower aortic stiffness in postmenopausal women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:1316–1322
- Vasquez-Vivar J, Kalyanaram B, Martasek P, Hogg N, Masters BS, Karoui H, Tordo P, Pritchard KA Jr (1998) Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:9220–9225
- Wang J, Wolin MS, Hintze TH (1993) Chronic exercise enhances endothelium-mediated dilation of epicardial coronary artery in conscious dogs. *Circ Res* 73:829–838
- Zhang H, Zhang J, Ungvari Z, Zhang C (2009) Resveratrol improved endothelial function: role of TNF[alpha] and vascular oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29:1164–1171
- Zhilyaev SY, Moskvina AN, Platonova TF, Gutsaeva DR, Churilina IV, Demchenko IT (2003) Hyperoxic vasoconstriction in the brain is mediated by inactivation of nitric oxide by superoxide anions. *Neurosci Behav Physiol* 33:783–787
- Zieman SJ, Melenovsky V, Kass DA (2005) Mechanisms, pathophysiology, and therapy of arterial stiffness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:932–943

ANNEXE 4 : ACCORD DU COMITE D'ETHIQUE

Academic Ethical Committee Brussels Alliance for Research and Higher Education

PROJECT TITLE :

Compréhension des altérations environnementales chez le plongeur sain

SUBMITTED BY :

Sigrid Theunissen - Costantino Balestra

DECISION : ACCEPTED

Study Type : Physiological Prospective
Observational ---

Acceptance Number : ISEK - 2009-12-14 - vs 1 - Theunissen - Compréhension des altérations environnementales chez le plongeur sain

Amendments:

B200 - 2009 - 39

If rejected (Rejection Reasons): Without Object

Other:

Signatures:

Date : Monday, December 14, 2009


The block contains several handwritten signatures in black ink. In the center is a circular stamp for the 'Academic Bio-Ethical Committee' featuring a Vitruvian Man figure. Below the stamp, the words 'Human Research' are partially visible. To the right of the stamp, the name 'Vandeweyer' is written in cursive.