



**HAL**  
open science

# Etude de l'implication des microparticules circulantes dans la dysfonction endothéliale chez les sujets obèses et effet de l'exercice physique

Saloua Dimassi

## ► To cite this version:

Saloua Dimassi. Etude de l'implication des microparticules circulantes dans la dysfonction endothéliale chez les sujets obèses et effet de l'exercice physique. Cardiologie et système cardiovasculaire. Université d'Avignon; Université de Carthage (Tunisie), 2016. Français. NNT : 2016AVIG0711 . tel-01391675

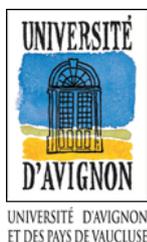
**HAL Id: tel-01391675**

**<https://theses.hal.science/tel-01391675>**

Submitted on 3 Nov 2016

**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.



## THESE en cotutelle

En vue de l'obtention du titre de

**Docteur de l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, spécialité Physiologie**

**Docteur de l'Université de Carthage, spécialité Biologie**

---

# Etude de l'implication des microparticules circulantes dans la dysfonction endothéliale chez les sujets obèses et effet de l'exercice physique

---

**Saloua DIMASSI**

Date de soutenance : **29 avril 2016**

Membres du jury

**Pr Pascale DUCHE**, Université de Clermont Ferrand, Rapporteur

**Pr Abderraouf KENANI**, Université de Monastir, Rapporteur

**Pr Karim CHAHED**, Université de Sfax, Directeur de thèse

**Pr Pascal LAURANT**, Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, Directeur de thèse

**Dr Catherine RIVA**, Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, Directeur de thèse

# Sommaire

Liste des publications	4
Liste des abréviations	5
Liste des figures	7
Liste des tableaux	10
- <i>Introduction</i> -	11
- <i>Revue de littérature</i> -	16
<b>I. Physiologie du système artériel</b>	<b>17</b>
1. Structure vasculaire	17
2. Le réseau artériel	18
<b>II. La fonction endothéliale</b>	<b>18</b>
1. L'endothélium vasculaire	18
2. Fonctions de régulation de l'endothélium	19
2.1. Facteurs endothéliaux vasodilatateurs	20
2.2. Facteurs endothéliaux vasoconstricteurs	27
3. La dysfonction endothéliale	28
3.1. Définition	28
3.2. Le stress oxydant : mécanisme clé dans la dysfonction endothéliale	29
3.3. Marqueurs de la dysfonction endothéliale	32
<b>III. Les microparticules</b>	<b>35</b>
1. Définition	35
2. Origine des MPs	36
3. Composition des MPs	37
3.1. Lipides	37
3.2. Protéines	38
3.3. Matériel génétique	39
4. Formation des MPs	39
5. Mode d'action des MPs	42
6. Implication des MPs dans les maladies cardiovasculaires	45
6.1. Effets délétères	45
6.2. Effets bénéfiques	46
<b>IV. L'obésité, facteur de risque de dysfonction endothéliale</b>	<b>47</b>
1. Définition	47
2. Epidémiologie	48
3. Les différents types d'obésité	50
4. Physiopathologie de l'obésité	51
5. Le tissu adipeux	52
5.1. En condition physiologique	52
5.2. Chez le sujet obèse	54
6. Complications liées à l'obésité	54

6.1. Complications métaboliques _____	54
6.2. Inflammation systémique _____	56
6.3. Altération de la fonction endothéliale _____	58
7. Les MPs sont-elles impliquées dans le développement de la dysfonction endothéliale ? 60	
<b>V. L'exercice physique comme stratégie d'amélioration de la fonction endothéliale</b>	<b>61</b>
1. L'exercice physique : définition et caractéristiques _____	61
2. Effets bénéfiques de l'exercice physique _____	63
2.1. Effets de l'exercice physique sur l'obésité _____	63
2.2. Effets de l'exercice physique sur la fonction vasculaire _____	64
2.3. Effets de l'exercice physique sur les microparticules circulantes _____	68
- <i>Objectifs</i> - _____	<b>70</b>
- <i>Méthodologie générale</i> - _____	<b>73</b>
Préambule _____	<b>74</b>
<b>I. Populations</b> _____	<b>75</b>
1. Etude 1 : Etude de l'intégrité de la fonction vasculaire au sein d'une population de sujets obèses _____	75
2. Etude 2 : La dysfonction endothéliale chez les sujets obèses : Implication des MPs circulantes ? _____	75
3. Etude 3 : Effet de l'exercice physique sur le contenu en miRs des MPs circulantes chez les sujets sains _____	75
4. Etude 4 : Effet de l'exercice physique sur une population de jeunes femmes obèses _	76
<b>II. Méthodologie</b> _____	<b>76</b>
1. Mesures anthropométriques et biologiques _____	76
2. Exploration de la fonction endothéliale _____	77
2.1. Etude de la vasodilatation endothélium-dépendante en réponse à l'acétylcholine	78
2.2. Etude de la vasodilatation endothélium-indépendante en réponse à la chaleur ____	79
2.3. Analyse des résultats obtenus par débitmétrie laser doppler couplée à l'iontophorèse _____	79
3. Mesure des marqueurs du stress oxydant _____	80
3.1. Dosage des nitrites _____	80
3.2. Mesure de la peroxydation lipidique par dosage des TBARS _____	80
3.3. Mesure de l'oxydation des protéines _____	81
3.4. Mesure du glutathion réduit (GSH) _____	81
4. Dosage des marqueurs inflammatoires _____	81
5. Etude des microparticules circulantes _____	82
5.1. Récupération des MPs _____	82
5.2. Quantification des MPs par cytométrie en flux _____	82
5.3. Etude de l'effet des MPs sur la réactivité vasculaire d'anneaux d'aorte de rat en chambre d'organe isolé ex vivo _____	83
5.4. Analyse de l'expression protéique dans les MPs par technique de Western Blot	85
5.5. Quantification des miR par RT-PCR quantitative _____	86
6. Programme d'activité physique _____	88
6.1. Détermination de la fréquence cible d'entraînement _____	88
6.2. Déroulement de la séance d'entraînement _____	89

7. Traitement statistique _____	90
<b>- Résultats - _____</b>	<b>91</b>
<b>Etude n°I : Etude de l'intégrité de la fonction vasculaire au sein d'une population de sujets obèses _____</b>	<b>92</b>
But de l'étude _____	92
Méthodologie _____	92
Résultats _____	93
1. Caractéristiques générales de la population d'étude _____	93
2. Mesures anthropométriques _____	93
3. Paramètres lipidiques et glycémie _____	94
4. Paramètres inflammatoires _____	96
5. Evaluation du stress oxydant _____	96
<b>Etude n°II : La dysfonction endothéliale chez les sujets obèses : implication des microparticules circulantes ? _____</b>	<b>101</b>
But de l'étude _____	101
Principaux résultats _____	101
Conclusion _____	102
Article _____	104
<b>Etude n°III : Effet de l'exercice physique sur le contenu en miRs des microparticules circulantes chez les sujets sains _____</b>	<b>132</b>
But de l'étude _____	132
Méthodologie _____	132
Principaux résultats _____	133
Conclusion _____	133
Article _____	135
<b>Etude n°IV : effet de l'exercice physique sur une population de jeunes femmes obèses _____</b>	<b>157</b>
But de l'étude _____	157
Méthodologie _____	157
Résultats _____	158
1. Caractérisation des groupes obèses et contrôle avant le protocole d'entraînement _____	158
2. Effet du programme d'exercice physique chez le groupe de sujets obèses _____	164
Discussion _____	169
<b>- Discussion &amp; conclusion - _____</b>	<b>175</b>
<b>- Références - _____</b>	<b>184</b>

# Liste des publications

## Articles dans des revues à « Facteur d'impact » (IF)

- **S. Dimassi**, K. Chahed, S. Boumiza, M. Canault, Z. Tabka, P. Laurant, C. Riva, Role of eNOS and NOX-containing microparticles in endothelial dysfunction in patients with obesity. *OBESITY sous presse 2016* IF : 3,734

## Article soumis dans des revues à « Facteur d'impact »

- **S. Dimassi**, E. Karkeni, S. Boumiza, P. Laurant, K. Chahed, Z. Tabka, JF. Landrier, C. Riva.  
Aerobic exercise training modulates microparticles miRNAs in healthy subjects. *Vasc. Pharmacol. Soumis 2016*, IF: 3,635

## Communications avec actes

- **S. Dimassi**, E. Karkeni, S. Boumiza, K. Chahed, JF Landrier, M. Canault, M-C Alessi, Z.Tabka, P. Laurant, C. Riva  
Microparticles-containing microRNAs: new players in the vascular endothelial dysfunction in obese patients Archives of Cardiovascular Diseases Supplements 7(2):149, April 2015 DOI: 10.1016/S1878-6480(15)30051-3, IF : 1,493

- **S. Dimassi\***, S. Boumiza, K. Chahed, M. Canault, M-C Alessi, Z.Tabka, P. Laurant, C. Riva  
Circulating markers of vascular endothelial dysfunction in obese patients Archives of Cardiovascular Diseases Supplements, Vol6, Supp:1-92, April 2014, DOI : 10.1016/S1878-6480 (14) 71333-3, \* prix du meilleur poster clinique 2014. IF: 1,493

## Communications par affiche:

- **S. Dimassi**, E. Karkeni, K. Chaheb, S. Boumiza, Z. Tabka, P. Laurant, JF. Landrier, C. Riva.  
Aerobic exercise training modulates microparticles miRNAs: link to improved endothelial function and regulation of inflammation? Printemps de la Cardiologie, 7-8 avril 2016, Dijon, France

- C. Riva, **S. Dimassi**, E. Karkeni, C. Meziat, JF. Landrier, C. Reboul, G. Walther, P. Laurant,  
Endothelial function and inflammation improvement by exercise training: cross talk between endothelial cells and perivascular adipose tissue thru miRNAs contained in microparticles. 33rd Annual Meeting of the European Section of the ISHR, 1-4 Juillet 2015, Bordeaux, France

# Liste des abréviations

<b>AA</b>	Acide Arachidonique
<b>ACh</b>	Acétylcholine
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>ADNc</b>	ADN complémentaire
<b>AOPP</b>	Advanced Oxidation Protein Products
<b>ARN</b>	Acide RiboNucléique
<b>ARNm</b>	ARN messenger
<b>BH<sub>4</sub></b>	Tétrahydrobioptérine
<b>BSA</b>	Bovine Serum Albumin
<b>CRP<sub>us</sub></b>	Protéine Réactive C Ultra Sensible
<b>CVC</b>	Conductance Vasculaire Cutanée
<b>DTNB</b>	Acide 5-5' dithiobis(2-nitrobenzoïque)
<b>EDHF</b>	Facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (Endothelium Derived Hyperpolarizing Factor)
<b>eNOS</b>	Nitric Oxide synthase endothéliale
<b>ERO</b>	Espèces Réactives Oxygénées
<b>ET-1</b>	Endothéline-1
<b>FC<sub>effort</sub></b>	Fréquence Cardiaque d'effort
<b>FC<sub>max</sub></b>	Fréquence Cardiaque maximale
<b>FC<sub>réserve</sub></b>	Fréquence Cardiaque de réserve
<b>FMD</b>	Flow-Mediated Dilation
<b>GMPc</b>	Guanosine Monophosphate Cyclique
<b>GSH</b>	Glutathion réduit
<b>HDLc</b>	Lipoprotéine de haute densité (High Density Lipoprotein Cholesterol)
<b>HTA</b>	Hypertension artérielle
<b>IMC</b>	Indice de Masse Corporelle
<b>IL-6</b>	Interleukine-6
<b>iNOS</b>	Nitric Oxide synthase inductible
<b>KI</b>	Iodide de potassium

<b>LDLc</b>	Lipoprotéine de basse densité (Low Density Lipoprotein Cholesterol)
<b>LSH</b>	Local Skin Heat
<b>MAP</b>	Pression Artérielle Moyenne
<b>MDA</b>	MalonDiAldehyde
<b>MET</b>	Metabolic Equivalent Task
<b>MiR</b>	MicroARN
<b>MPs</b>	Microparticules
<b>NADPH</b>	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
<b>NED</b>	Naphtalène-Ethylénédiamine Dihydrochloride
<b>NO</b>	Monoxyde d'azote (nitric oxyde)
<b>NOS</b>	Nitric Oxide synthase
<b>NOX</b>	NADPH oxydase
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Anion superoxyde
<b>PAD</b>	Pression Artérielle Diastolique
<b>PAM</b>	Pression Artérielle Moyenne
<b>PAS</b>	Pression Artérielle Systolique
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>PE</b>	PhénylEphrine
<b>PFP</b>	Platelet-Free Plasma
<b>PGL<sub>2</sub></b>	Prostacyclines
<b>PRP</b>	Platel-Rich Plasma
<b>PS</b>	PhosphatidylSérine
<b>RTH</b>	Rapport tour de Taille/ tour de Hanches
<b>RT-PCR</b>	Réaction de polymérisation en chaîne en temps réel (Real Time PCR)
<b>SNP</b>	NitroPusside de Sodium
<b>TBA</b>	Acide ThioBarbiturique
<b>TBARS</b>	ThioBarbituric Acid Reactive Substances
<b>TCA</b>	Acide TriChloroacétique
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumor Necrosis Factor- $\alpha$
<b>TXA<sub>2</sub></b>	Thromboxane A <sub>2</sub>
<b>VO<sub>2max</sub></b>	Débit maximal d'oxygène

# Liste des figures

- Figure 1 Représentation schématique des différentes tuniques de la paroi artérielle
- Figure 2 Les différents agents vasoconstricteurs et vasodilatateurs produits par l'endothélium
- Figure 3 Les différentes voies de régulation de la vasorelaxation (Boulanger and Vanhoutte, 1997).
- Figure 4 Réaction de synthèse du Nitric Oxyde (NO) par les différents isoformes de Nitric Oxyde Synthase (NOS) ; nNOS, Nitric Oxyde Synthase neuronale ; iNOS, Nitric Oxyde Synthase inductible ; eNOS, Nitric Oxyde Synthase endothéliale
- Figure 5 Structure de la eNOS (Stocker and Keaney, 2004)
- Figure 6 Mécanismes de production du NO par la eNOS (d'après (Pellegrin et al., 2009)
- Figure 7 La famille des NADPH oxydases (Bedard and Krause, 2007)
- Figure 8 Taille des différents types de microvésicules libérées par les cellules (Lemoine et al., 2014)
- Figure 9 Formation des MPs à la surface des cellules stimulées. Les MPs sont marquées par des flèches blanches. Cliché de microscopie électronique à balayage réalisé après stimulation par interleukine  $\alpha 1$  de cultures endothéliales issues de veines ombilicales (Diamant et al., 2004)
- Figure 10 Représentation schématique des mécanismes impliqués dans la formation des MPs durant l'activation cellulaire (à gauche) et l'apoptose (à droite) (Martinez et al., 2011)
- Figure 11 Les différents modes de transfert intercellulaire de l'information par les MPs (Mause and Weber, 2010)
- Figure 12 Prévalence de l'obésité dans le monde (d'après l'OMS, 2015)
- Figure 13 Composition du tissu adipeux (modifié d'après (Ouchi et al., 2011)

- Figure 14 Protocole d'exploration de la fonction endothéliale par débitmétrie laser doppler couplée à l'iontophorèse
- Figure 15 Couplage laser doppler-iontophorèse au niveau anodal. L'ACh chargé positivement est diffusé à travers la peau au niveau de l'anode (+). La cathode (-) est fixée sur un patch de référence placé à distance. La sonde laser doppler est placée sur l'anode
- Figure 16 Principe de l'exploration ex vivo de la fonction endothéliale sur des anneaux d'aorte en chambre à organe isolé
- Figure 17 Protocole de mesure de la réactivité vasculaire des anneaux d'aorte de rat suite à des stimuli chimiques (PE, Ach en concentrations croissantes puis SNP)
- Figure 18 Paramètres anthropométriques chez les sujets obèses et contrôles
- Figure 19 Paramètres anthropométriques des sujets obèses et contrôles en fonction du sexe
- Figure 20 Paramètres lipidiques et glycémie chez les sujets obèses et contrôles
- Figure 21 Marqueurs inflammatoires pour le groupe obèse et contrôle avant le programme d'entraînement
- Figure 22 Paramètres du stress oxydant au niveau plasmatique pour le groupe obèse et contrôle avant le programme d'entraînement
- Figure 23 Taux de nitrites plasmatique pour le groupe obèse et contrôle avant le programme d'entraînement
- Figure 24 Paramètres inflammatoires pour le groupe obèse et contrôle avant le programme d'entraînement
- Figure 25 Taux de MPs circulantes pour le groupe obèse et contrôle avant le programme d'entraînement
- Figure 26 Expression des miRs contenus dans les MPs pour le groupe obèse et contrôle avant le programme d'entraînement
- Figure 27 Paramètres inflammatoires pour le groupe obèse avant et après le programme d'entraînement

Figure 28 Taux de microparticules circulantes pour le groupe obèse avant et après le programme d'entraînement

Figure 29 Expression des miRs contenus dans les MPs pour le groupe obèse avant et après le programme d'entraînement

# Liste des tableaux

Tableau I	Quelques exemples de marqueurs antigéniques permettant de caractériser l'origine des MPs (Zahra et al., 2011)
Tableau II	Classification de la corpulence en fonction des valeurs de l'IMC
Tableau III	Caractéristiques du groupe obèse et contrôle d'étude avant le programme d'entraînement
Tableau IV	Paramètres du stress oxydant pour le groupe obèse et contrôle avant le programme d'entraînement
Tableau V	Paramètres d'évaluation de la fonction endothéliale pour le groupe obèse et contrôle avant le programme d'entraînement
Tableau VI	Paramètres anthropométriques et biologiques pour le groupe obèse et contrôle avant le programme d'entraînement
Tableau VII	Paramètres du stress oxydant pour le groupe obèse avant et après le programme d'entraînement
Tableau VIII	Paramètres d'évaluation de la fonction endothéliale pour le groupe obèse avant et après le programme d'entraînement

# **- Introduction -**

Depuis plusieurs années, la généralisation d'un style de vie, basé essentiellement sur la suralimentation associée à la sédentarisation, a grandement favorisé le développement de nombreux troubles métaboliques tels que l'obésité. En effet, selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), l'obésité est devenue le nouveau fléau de notre société actuelle à tel point qu'elle a été qualifiée de première épidémie non contagieuse de l'histoire. A long terme, cette obésité favorise grandement le développement de maladies cardiovasculaires, actuellement considérées comme l'une des principales causes de mortalité dans le monde (« OMS | Maladies cardiovasculaires » 2015).

De ce fait, de nombreux travaux se sont focalisés sur l'étude des différents mécanismes impliqués dans l'obésité, et autres facteurs de risque cardiovasculaire, afin d'en comprendre les principaux acteurs impliqués et définir les meilleures stratégies d'intervention. Il a été rapidement observé qu'une dysfonction au niveau de l'endothélium vasculaire était généralement l'une des altérations les plus précoces qui pouvaient survenir lors du développement de ces troubles (Vanhoutte et al., 2009). Cette dysfonction endothéliale se traduit par un ensemble d'altérations affectant l'homéostasie vasculaire telles que la diminution de la réponse vasodilatatrice endothélium dépendante qui résulte généralement d'une baisse de la biodisponibilité du monoxyde d'azote (NO). Une diminution de la production du NO et/ou une augmentation de sa dégradation en est la principale raison (Avogaro et de Kreutzenberg, 2005). D'autres complications peuvent également être associées à la dysfonction endothéliale, telles que des déséquilibres de la balance du stress oxydatif ainsi que le développement d'une inflammation chronique.

Depuis peu, l'évaluation de l'intégrité vasculaire peut être effectuée par l'étude de nouveaux biomarqueurs appelés microparticules (MPs) (Sabatier et al., 2011a). Ces

MPs sont principalement libérées dans la circulation sanguine par plusieurs types cellulaires et diffèrent en fonction de leurs cellules d'origine et des stimuli ayant conduit à leur génération (Chironi et al., 2008). Des taux plasmatiques élevés de MPs circulantes ont été observés pour la plupart des pathologies à risque cardiovasculaire notamment cardiométaboliques, comme le syndrome métabolique, l'hypertension artérielle, le diabète de type 2 ou encore l'obésité (Goichot et al., 2006; Müller, 2012; Preston et al., 2003; Sabatier et al., 2002). Cette élévation des taux plasmatiques serait le reflet d'une atteinte vasculaire d'où l'intérêt d'utiliser les MPs comme biomarqueurs notamment dans le cas des facteurs de risque cardiovasculaire tels que l'obésité.

De plus, les MPs sont capables d'interagir avec d'autres cellules. Leur composition, en protéines, lipides mais également en matériel génétique, qui est le reflet de leurs cellules d'origine, constitue un vecteur intercellulaire d'échange d'information. C'est par ailleurs dans le cadre de leurs diverses interactions que les MPs provoquent des modifications structurelles et fonctionnelles, notamment au niveau de la paroi vasculaire et en particulier de l'endothélium, pouvant avoir des conséquences physiologiques et pathologiques (Martin et al., 2004). Ainsi, certains travaux suggèrent que les MPs, en plus d'être des marqueurs de l'intégrité vasculaire, contribuent aux mécanismes associés à l'altération de la fonction endothéliale (Boulangier et al., 2001). Des MPs ont également été associés aux processus inflammatoires (Barry et al., 1998; Nomura et al., 2001). Toutefois, ces études se sont essentiellement basées sur des MPs générées *in vitro* et ces mêmes effets n'ont pas pu être observés *in vivo* dans certaines études (Huo et al., 2003). En plus des effets délétères, il a été rapporté des effets bénéfiques associés aux MPs (Dalli et al., 2008; Dignat-George et Boulangier, 2011). Les études s'intéressant à l'implication des MPs et aux rôles qu'elles jouent dans la physiopathologie endothéliale au niveau vasculaire restent donc assez hétérogènes. Cependant, l'action des MPs est

déterminée par son contenu, en protéines, lipides ou matériel génétique. De ce fait, afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'altération de la fonction endothéliale au niveau vasculaire, il nous est apparu intéressant d'étudier les MPs générés *in vivo* dans des conditions physiopathologiques, telles que l'obésité.

Les MPs circulantes voient leur concentration plasmatique et leur contenu varier non seulement en conditions pathologiques qui dérèglent le milieu vasculaire, mais également dans certaines conditions qui stimulent favorablement l'endothélium vasculaire telles que l'exercice physique. L'exercice physique, reconnu comme la meilleure stratégie de lutte contre les pathologies cardiovasculaires, est en effet un puissant stimulant du milieu vasculaire qui possède à la fois des vertus thérapeutiques mais également préventives (Pedersen et Saltin, 2006; Pellegrin et al., 2009). Par ailleurs, ces effets bénéfiques ont pu être observés chez les sujets sains (Clarkson et al., 1999) mais également chez des sujets obèses (Moien-Afshari et al., 2008; Sciacqua et al., 2003). Certains travaux, qui se sont intéressés à l'effet de l'exercice physique sur les MPs, ont observé que la concentration plasmatique de MPs d'origine endothéliale, était diminuée chez des sujets sains après un programme d'entraînement de moyenne durée (Babbitt et al., 2013) tandis que l'inactivité physique entraînait, au contraire, une augmentation des concentrations plasmatiques (Boyle et al., 2013; Navasolava et al., 2010). Toutefois, ces travaux ne se sont intéressés, pour la plupart, qu'aux taux plasmatiques sans pour autant explorer le contenu de ces MPs, qui pourrait jouer un rôle important dans les variations observées sous l'effet de l'exercice physique.

Lors de cette thèse, nous nous sommes donc intéressés à ces MPs et aux rôles qu'elles pouvaient jouer 1/ dans un contexte physiologique sain 2/ dans un contexte d'obésité, qui est considérée comme un important facteur de risque cardiovasculaire favorable à la survenue d'altérations au niveau de l'endothélium vasculaire 3/ suite à un

exercice physique chronique, censé avoir des effets favorables au niveau vasculaire, en condition physiologique mais également pathologique (obésité).

**- Revue de littérature -**

# I. Physiologie du système artériel

## 1. Structure vasculaire

La paroi artérielle est formée de trois tuniques morphologiquement distinctes, de la lumière vers l'extérieur des vaisseaux : l'intima, la média et l'adventice (Figure 1).

- **L'adventice** : représentant la couche la plus externe des vaisseaux sanguins, est composée de collagène, de fibroblastes et d'éléments lymphatiques et nerveux.
- **La média** : elle constitue la couche la plus épaisse et confère aux artères deux propriétés importantes : l'élasticité et la contractilité. Elle est principalement formée de cellules musculaires lisses, indispensables pour la relaxation et la contraction des artères, et d'une matrice extracellulaire constituée de fibres d'élastine et de collagène.
- **L'intima ou endothélium** : représentant la couche la plus interne des vaisseaux, est constitué d'une couche monocellulaire de cellules endothéliales et d'une fine couche de tissu conjonctif formant la base extracellulaire (collagène, glycoprotéines). Les cellules endothéliales sont directement en contact avec le sang circulant ce qui leur confère un rôle primordial dans l'homéostasie vasculaire.

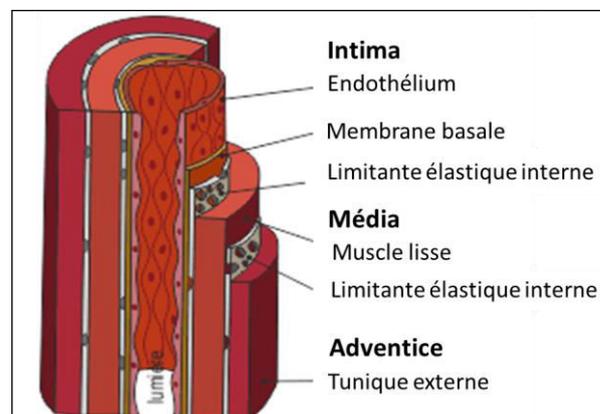


Figure 1 : Représentation schématique des différentes tuniques de la paroi artérielle

## 2. Le réseau artériel

La structure et l'importance de ces différentes tuniques varient en fonction des secteurs artériels ce qui confère à ces derniers des caractéristiques bien particulières. Nous pouvons donc diviser le système artériel, en fonction des propriétés mécaniques et structurales de la paroi artérielle, en deux secteurs :

\* **Les artères de conductance**, élastiques et de gros calibre, dont la paroi est relativement mince par rapport à leur diamètre, et leur tunique moyenne, constituée de feuillets musculo-élastiques, contient plus de fibres élastiques que de cellules musculaires lisses. De ce fait, elles opposent une très faible résistance au débit sanguin et se dilatent pour laisser passer un volume accru de sang au moment de l'éjection ventriculaire.

\* **Les artères de résistance**, musculaires, de moyens ou de petits calibres. Leur paroi est relativement épaisse par rapport à leur diamètre, principalement à cause de la quantité importante des cellules musculaires lisses. Elles subissent donc plus de contraintes physiques du flux sanguin par rapport aux artères de conductance, en raison de leur moindre élasticité. Ces artères se divisent ensuite pour former des artérioles, de plus petits diamètres, qui ont une composition semblable à celle des artères musculaires et qui jouent un rôle important dans la régulation de la pression artérielle. Les plus petites artérioles déversent leur contenu dans le réseau capillaire. Les capillaires étant de très fins vaisseaux d'environ 5 à 8  $\mu\text{m}$  de diamètre, sont constitués uniquement d'une couche de cellules endothéliales avec une lame basale et quelques fibres de collagène. La structure de ces capillaires est adaptée à leur fonction fondamentale qui est de permettre les échanges de substances entre le sang et les tissus vascularisés.

## II. La fonction endothéliale

### 1. L'endothélium vasculaire

L'endothélium vasculaire a initialement été décrit comme une simple interface entre le sang et les tissus dont le principal rôle se limitait à celui d'une barrière sélective servant à prévenir la diffusion des macromolécules du sang vers le milieu interstitiel. Par la suite, il s'est rapidement avéré que, de par sa localisation stratégique dans les vaisseaux, cette paroi jouait diverses fonctions comprenant le contrôle du tonus vasculaire, de la perméabilité endothéliale, l'agrégation plaquettaire mais aussi l'adhésion des plaquettes et des leucocytes, la prolifération des cellules musculaires lisses et la régulation de divers paramètres plasmatiques et de la fibrinolyse (Busse et Fleming, 1995; Vanhoutte, 1989).

Actuellement, l'endothélium est perçu comme un véritable organe endocrinien qui intervient directement dans la régulation de plusieurs processus biologiques, lesquels ont un impact certain sur la structure et l'activité vasculaire et donc sur la santé vasculaire. Par ailleurs, les cellules endothéliales réagissent à de nombreuses molécules transportées par le sang, au contact avec des éléments figurés et enfin aux variations de pression de tension (strain) et de contrainte de cisaillement que le flux et la pression sanguine exerce sur la paroi des vaisseaux. De façon générale, le fonctionnement normal de la paroi artérielle dépend de différents facteurs de régulation, regroupés en facteurs endothélium-dépendants, d'origine endothéliale, et en facteurs endothélium-indépendants, d'origine sanguine, musculaire lisse et nerveuse. Cette grande variabilité dans les mécanismes de régulation du tonus vasculaire traduit une certaine plasticité et adaptabilité fonctionnelle de la paroi vasculaire.

## **2. Fonctions de régulation de l'endothélium**

Le tonus artériel, qui représente l'état de contraction ou de relâchement de la paroi musculaire des artères, peut être régulé par de nombreux facteurs vasoconstricteurs ou vasodilatateurs endothéliaux. Les facteurs vasoconstricteurs sont le monoxyde d'azote

(NO), la prostacycline ( $PGI_2$ ) et le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF). Les facteurs vasoconstricteurs sont principalement composés de thromboxane  $A_2$  ( $TXA_2$ ), des espèces réactives oxygénées (ERO), sous forme d'anions superoxydes, de l'endothéline-1 (ET-1), de la prostaglandine  $H_2$  ( $PGH_2$ ) et de l'angiotensine II (Figure 2) (Vanhoutte 1989).

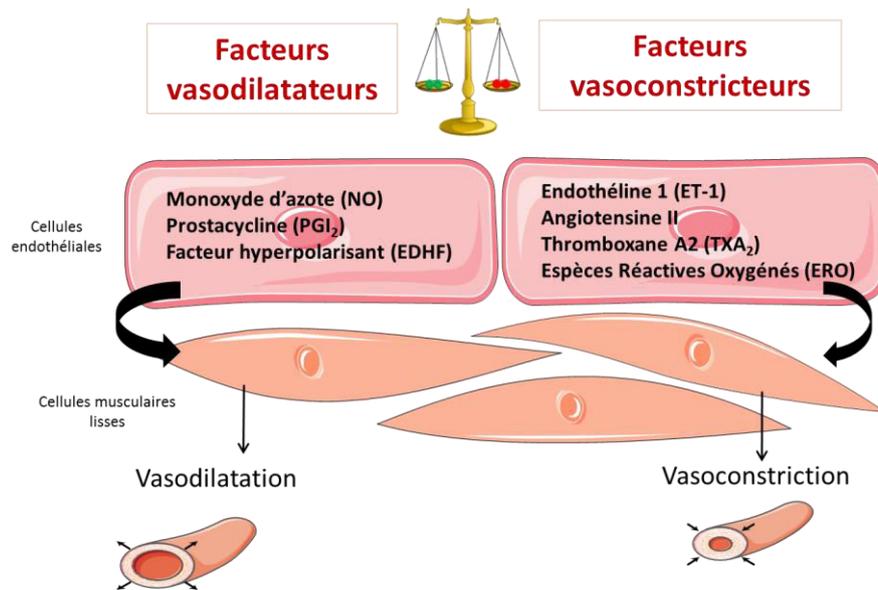


Figure 2 : Les différents agents vasoconstricteurs et vasodilatateurs produits par l'endothélium

## 2.1. Facteurs endothéliaux vasodilatateurs

L'activation de la cellule endothéliale, par un stimulus mécanique (pression artérielle, forces de cisaillement) ou humoral (hormones...), entraîne la synthèse et le relargage de facteurs relaxants conduisant à la relaxation de la cellule lisse sous-jacente (Vanhoutte, 2012). Par ailleurs, expérimentalement, l'acétylcholine (ACh) représente l'un des stimuli les plus utilisés pour l'étude de la vasorelaxation endothélium-dépendante chez l'homme mais également chez l'animal. Les propriétés vasodilatatrices des artères sont régulées principalement par trois voies (Figure 3).

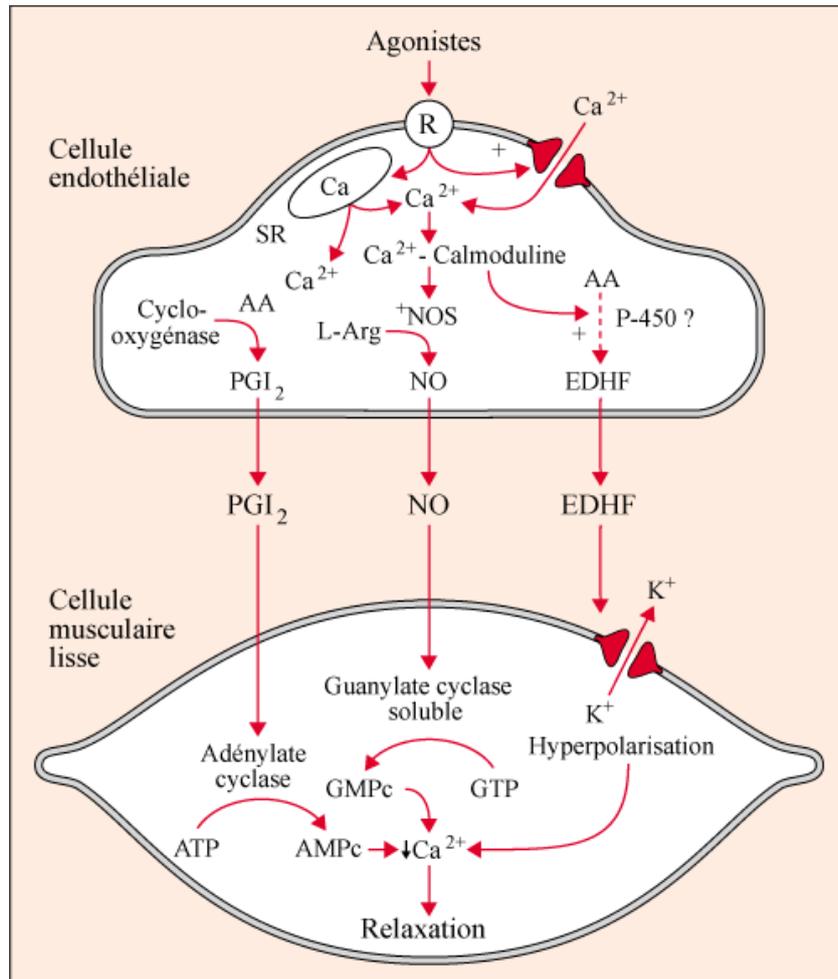


Figure 3 : Les différentes voies de régulation de la vasorelaxation (Boulanger and Vanhoutte, 1997). La prostacycline PGI<sub>2</sub> active l'adénylate cyclase qui augmente la production d'AMPc. Le NO active la guanylate cyclase et le niveau de GMPC. L'EDHF active les canaux potassiques sensibles au Ca<sup>2+</sup> sur la cellule musculaire lisse. AA : acide arachidonique ; NOS : NO synthase ; L-arg : L-arginine ; X : précurseur inconnu.

- **La voie des prostacyclines (PGI<sub>2</sub>) ou COX :**

La PGI<sub>2</sub> est synthétisée au niveau endothélial par les cyclooxygénases endothéliales (COX-1) à partir de l'acide arachidonique (AA). Les phospholipides membranaires vont être utilisés par la phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) pour libérer l'AA, substrat de la COX-1. La production de PGI<sub>2</sub> est activée par différents facteurs, tels que l'hypoxie, les contraintes

de cisaillement, la bradykinine. Elle est dépendante de la concentration intracellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$ .

- **La voie du facteur hyperpolarisant dérivant de l'endothélium (EDHF)**

L'EDHF est actuellement défini comme une combinaison de médiateurs et de processus coordonnés par la stimulation de l'endothélium, induisant une relaxation vasculaire via des mécanismes d'augmentation de conductance potassique et d'hyperpolarisation des cellules musculaires lisses vasculaires (Fleming and Busse, 2003). Toutefois, les bases moléculaires de ces relaxations ne sont pas encore bien déterminées puisqu'elles varient en fonction de plusieurs paramètres tels que le lit vasculaire, l'espèce, le sexe, le vieillissement, la pathologie... (McGuire et al., 2001).

- **La voie du NO**

Le NO représente le médiateur primaire des relaxations endothélium-dépendantes au niveau des artères de gros calibre. Ainsi, en conditions physiologiques, la voie du NO est prédominante par rapport aux autres voies. Par ailleurs, le NO endothélial peut diffuser vers les couches cellulaires sous-jacentes et exercer localement plusieurs effets. Il peut inhiber le tonus vasculaire, la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses ainsi que la synthèse de protéines de la matrice extracellulaire (Yetik-Anacak et Catravas, 2006).

Au niveau des cellules musculaires lisses, le NO se fixe sur la guanylate cyclase, sa principale cible, entraînant une augmentation de son activité de conversion de la guanosine triphosphate (GTP) en guanosine monophosphate cyclique (GMPc) (Figure 3). L'afflux de GMPc dans les cellules musculaires lisses provoque alors une réduction du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire, entraînant une relaxation des fibres musculaires lisses vasculaires, via une diminution de l'état contractile et/ou une hyperpolarisation cellulaire (Friebe et

Koesling, 2003). Par ailleurs, l'augmentation du GMPc active la protéine kinase C (PKC) provoquant ainsi la phosphorylation des protéines impliquées dans les processus de relaxation musculaire, de prolifération cellulaire, d'agrégation plaquettaire et d'expression de molécules d'adhésion (Schlossmann et al., 2003).

### 2.1.1. Le NO : principal acteur dans la vasorelaxation

Le NO est une molécule de signalisation ubiquitaire générée par la famille des NO synthases (NOS) pouvant agir de manière paracrine ou autocrine. Les NOS utilisent la L-arginine, l'oxygène et la NADPH (Nicotilamide Adénine Dinucléotide Phosphate) pour aboutir à la formation du NO et de la L-citrulline (Figure 4).

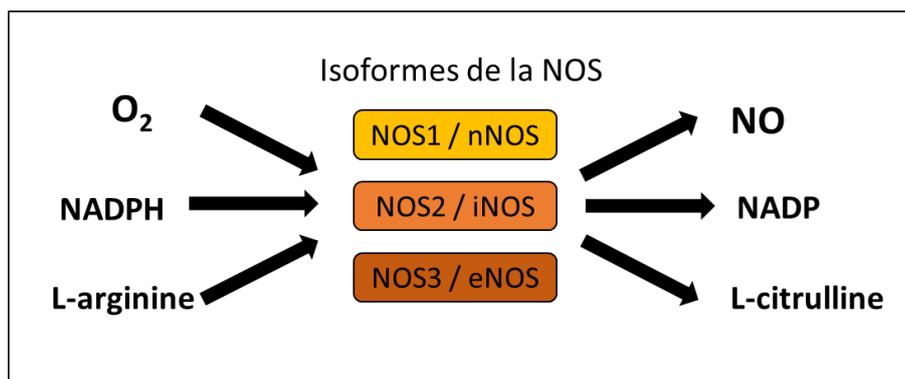


Figure 4 : Réaction de synthèse du monoxyde d'azote (NO) par les différents isoformes de Nitric Oxyde Synthase (NOS) ; nNOS, Nitric Oxyde Synthase neuronale ; iNOS, Nitric Oxyde Synthase inductible ; eNOS, Nitric Oxyde Synthase endothéliale

Dans la paroi vasculaire, le NO diffuse de l'endothélium vers la cellule musculaire lisse. En milieu biologique, sa demi-vie est estimée entre 1 et 5s (voire 30s). En effet, le NO est un radical libre étant donné qu'une de ses orbitales externes contient un électron non apparié. De ce fait, il peut réagir avec les fers des noyaux hémiques, avec les dérivés de l'oxygène ainsi qu'avec les groupements thiols. Le NO est donc rapidement inactivé par les ions superoxydes ou transformé, au contact de l'oxygène, en métabolites inactifs; les nitrites (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) et les nitrates (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Ces métabolites sont d'ailleurs fréquemment

dosés au niveau plasmatique, en tant que marqueur de biodisponibilité du NO (Bryan et Grisham 2007). Toutefois, il a été démontré que seuls les nitrites plasmatiques reflétaient véritablement des variations de la production du NO (Lauer et al., 2001). Ceci s'explique principalement par le fait que les nitrates plasmatiques peuvent varier en fonction des nombreuses sources d'apport en nitrates, indépendantes de la production de NO, en particulier par l'alimentation. De plus, les nitrites constituent le principal produit d'oxydation du NO et sont considérés comme un véritable réservoir à partir duquel le NO pourra être redistribué (Gladwin et al., 2005). Il a également été démontré que les concentrations en nitrites plasmatiques étaient bien corrélées avec les taux de NO et l'activité de la eNOS ce qui en fait un bon indicateur pour l'évaluation indirecte de la biodisponibilité du NO (Kleinbongard et al., 2003).

Il existe trois isoformes de NOS dont deux sont constitutives, la Nitric Oxyde Synthase neuronale (nNOS) et la Nitric Oxyde Synthase endothéliale (eNOS), et une inductible par des cytokines ou endotoxines, la Nitric Oxyde Synthase inductible (iNOS) (Figure 4). La nNOS ou NOS 1 possède une localisation cytosolique et se retrouve essentiellement dans certains neurones centraux et périphériques. Toutefois, elle peut également être localisée au niveau de cellules non-neuronales, telles que les myocytes, les cellules épithéliales, les neutrophiles et les cellules musculaires lisses. La iNOS ou NOS 2, est exprimée dans divers types cellulaires, dont les macrophages, les neurones et les cellules endothéliales. Elle a également une localisation cytoplasmique et son activité est indépendante du calcium cytoplasmique. Elle est généralement induite suite à une stimulation par certains médiateurs impliqués dans l'inflammation tels que l'interleukine-1 (IL-1), le tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), ou encore par des endotoxines microbiennes ou des lipopolysaccharides. Elle est régulée principalement au niveau transcriptionnel et synthétise en général de fortes concentrations de NO, de l'ordre du  $\mu$ M qui sont associées

à des effets bactéricides et cytotoxiques contre les micro-organismes ou les cellules tumorales. (Cooke et Dzau, 1997; Förstermann et Sessa, 2012). Toutefois, malgré son rôle important dans la défense de l'organisme contre les infections, l'induction excessive de cet isoforme peut être nocif dans certains cas et engendrer d'importants dommages tissulaires. Il a en effet été suggéré que la iNOS était impliquée dans le développement de troubles métaboliques, caractérisés par une inflammation chronique tels que l'obésité (Perreault et Marette, 2001). La eNOS, ou NOS 3, est ancrée à la membrane plasmique des cellules endothéliales des vaisseaux de gros et de moyens calibres, des myocytes cardiaques et des plaquettes (Dussaule et Chatziantoniou, 1996).

### 2.1.2. La NO synthase endothéliale : structure et régulation

La eNOS est une métalloenzyme provenant de l'assemblage de 2 monomères composés d'un domaine réductase C-terminal liant le NADPH et les cofacteurs flaviniques FMN et FAD et d'un domaine oxygénase N-terminal capable de lier le complexe calcium-calmoduline (CaM) (figure 5). Isolés, ces deux monomères ont une très faible capacité de transfert électronique et sont incapables de lier le substrat (la L-arginine) et le cofacteur principal (la tétrahydrobioptérine (BH<sub>4</sub>)). L'enzyme n'est donc active et ne produit du NO que sous sa forme dimérique (Münzel et al., 2005).

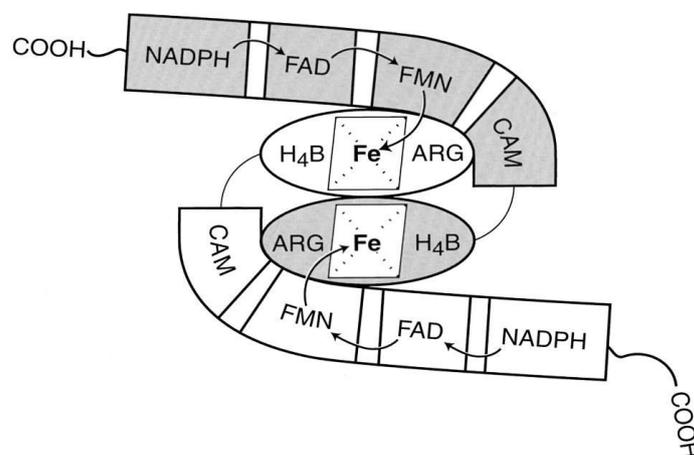


Figure 5 : Structure de la eNOS (d'après Stocker et Keaney, 2004)

L'activité de la eNOS est conditionnée par de nombreuses modifications transcriptionnelles et post-traductionnelles. Ainsi, des mécanismes de phosphorylation et de déphosphorylation de certains résidus sérine et thréonine d'eNOS modulent son activité en réponse à des stimuli pharmacologiques ou mécaniques. En effet, la phosphorylation de la sérine 1177 induit une activation de la eNOS alors que la phosphorylation de la thréonine 459 l'inhibe (Fleming et Busse, 2003). L'activité catalytique de l'enzyme est également dépendante de la biodisponibilité de son substrat principal, L-arginine et de ses cofacteurs FAD, FMN, NADPH et particulièrement le BH<sub>4</sub>, qui représente le cofacteur limitant essentiel à la stabilisation et l'activation de l'enzyme (Schmidt et Alp, 2007). Par ailleurs, dans certaines conditions, telles que la diminution de la biodisponibilité de la L-arginine ou l'oxydation du BH<sub>4</sub>, la eNOS peut se retrouver sous forme découplée. Elle produit alors des anions superoxydes au lieu du NO (Münzel et al., 2005).

Bien que l'activité de la eNOS soit couplée à une augmentation du niveau du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire, son activation peut également être effectuée par d'autres mécanismes permettant sa phosphorylation ou sa déphosphorylation. En effet, il a été démontré que les forces de cisaillement, ou shear stress, exercées par la vitesse de l'écoulement sanguin, activent la eNOS en induisant la phosphorylation des résidus sérine par la voie PI3-kinase/Akt, indépendamment de l'élévation du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire (Fleming et Busse, 2003) (Figure 6).

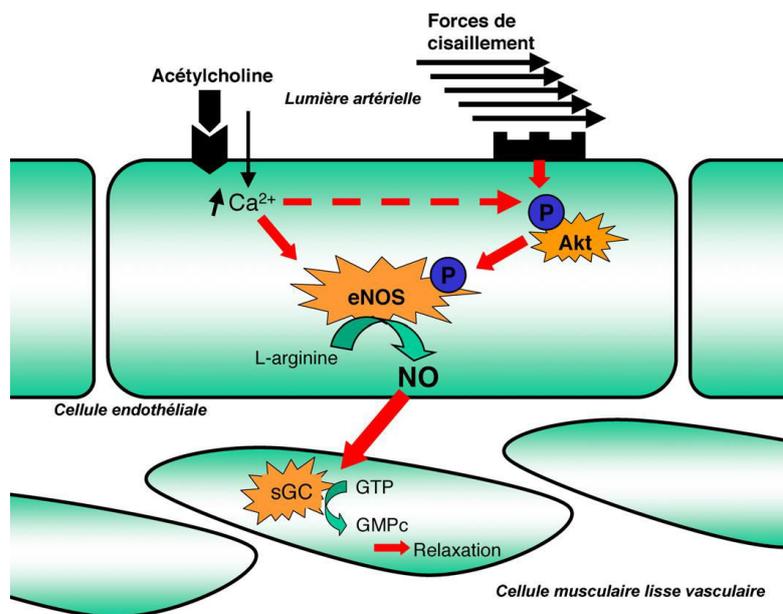


Figure 6 : Mécanismes de production du NO par la eNOS (d'après Pellegrin et al., 2009)

## 2.2.Facteurs endothéliaux vasoconstricteurs

L'endothélium peut également générer des facteurs vasoconstricteurs, qui en équilibre avec les facteurs vasodilatateurs, permettent de maintenir un équilibre du tonus vasculaire (Vanhoutte, 1989).

- **L'endothéline 1 (ET-1)**

L'endothéline est l'un des plus puissants vasoconstricteurs identifiés à ce jour. Il existe trois isoformes à ce peptide mais seul l'isoforme ET-1 est produit par les cellules endothéliales. ET-1 produit son effet vasoconstricteur en se liant à son récepteur type A (ET<sub>A</sub>) au niveau des cellules musculaires lisses (Miyachi et Masaki, 1999). Il existe un deuxième type de récepteur de ET-1, appelé ET<sub>B</sub>, exprimé au niveau des cellules endothéliales, ainsi qu'au niveau des cellules musculaires lisses mais à des taux beaucoup plus faibles que ET<sub>A</sub>. La liaison de ET-1 avec ET<sub>B</sub> permet de médier la synthèse et la

libération de certains facteurs vasorelaxants, tels que le NO et la PGI<sub>2</sub>, lesquels s'opposent aux effets vasoconstricteurs médiés par le récepteur ET<sub>A</sub>. Ceci a pour effet d'atténuer la vasoconstriction d'ET-1 (Hirata et al., 1993).

- **Les espèces réactives oxygénées (ERO)**

Les espèces réactives oxygénées (ERO) sont des espèces chimiques dérivées de l'oxygène que l'on peut séparer en deux groupes : 1/ les radicaux oxygénés, possédant un ou plusieurs électrons non appariés sur leur couche externe, tels que l'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) et le radical hydroxyle (OH·) ; et 2/ les dérivés non radicalaires tels que le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ou le peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>). L'anion superoxyde représente le précurseur des ERO. Il est formé après réduction de l'oxygène O<sub>2</sub> par un électron et en présence du cofacteur NADPH. Cet anion est très instable et peut traverser la membrane plasmique (Mao et Poznansky, 1992). Le peroxyde d'hydrogène, quant à lui, est une espèce réactive non chargée qui, contrairement à l'anion superoxyde, est suffisamment stable pour diffuser vers d'autres cellules et y initier des événements spécifiques de signalisation (Cai, et al. 2003).

Les ERO jouent de nombreux rôles physiologiques et sont impliqués dans la transmission de nombreuses informations biologiques. En conditions physiologiques, elles existent en faibles concentrations puisqu'elles sont hautement contrôlées par les systèmes antioxydants enzymatiques et non-enzymatiques. Toutefois, en conditions pathologiques, ces ERO peuvent être libérées de façon excessive pouvant entraîner un stress oxydant (Madamanchi et al., 2005).

### **3. La dysfonction endothéliale**

#### **3.1. Définition**

Le terme de dysfonction endothéliale englobe un ensemble d'altérations affectant l'homéostasie vasculaire pouvant se manifester soit par un déséquilibre entre vasodilatation et vasoconstriction, un déséquilibre entre action antithrombogène et procoagulante, ou encore comme une anomalie de la perméabilité (Avogaro et de Kreutzenberg, 2005). Cette dysfonction endothéliale est associée à la plupart des maladies cardiovasculaires comme l'hypertension artérielle, les maladies coronariennes, l'insuffisance cardiaque chronique, le diabète ou encore l'insuffisance rénale chronique. Par ailleurs, cette altération survient dès les premiers stades de l'atteinte vasculaire (Bonetti et al., 2003; Vanhoutte et al., 2009).

Toutefois, la majorité des études réduisent la fonction endothéliale aux fonctions vasomotrices et plus particulièrement à une altération de la réponse vasodilatatrice dépendante du NO due à une diminution de la biodisponibilité du NO. Ceci est généralement associé à une diminution de la production par la eNOS et/ou à l'augmentation de sa dégradation (Williams et al., 2002). Dans le premier cas, la réduction de la production du NO peut être consécutive à une réduction de l'expression et/ou de l'activité de la eNOS, une réduction de la biodisponibilité de son substrat (et/ou d'un ou plusieurs de ses cofacteurs essentiels à sa production), ou encore une augmentation de la production de facteurs contractants, ce qui aurait pour effet de compromettre, entre autres, les actions vasorelaxantes du NO (Ulker et al., 2003). D'autre part, une dégradation accrue du NO peut être causée par un stress oxydatif dû à une production excessive d'ERO (Holvoet, 2012).

### **3.2. Le stress oxydant : mécanisme clé dans la dysfonction endothéliale**

Le stress oxydant est caractérisé par la formation accrue d'ERO. Dans les conditions physiologiques normales, il existe une balance entre la production et la dégradation de ces ERO. En revanche, lorsqu'un dysfonctionnement apparaît entre la

formation des ERO et les capacités antioxydantes de défense, il en découle une augmentation de la biodisponibilité des ERO et le stress oxydant s'installe favorisant ainsi le développement de nombreuses pathologies cardiovasculaires. En effet, ces ERO peuvent réguler plusieurs gènes, notamment des molécules d'adhésion, facteurs chimiotactiques, enzymes antioxydantes et substances vasoactives. La régulation positive des molécules d'adhésion et des molécules chimiotactiques par ces ERO est d'une grande importance dans la dysfonction endothéliale puisque ces molécules favorisent l'adhésion et la migration des monocytes au niveau de la paroi vasculaire et donc le processus inflammatoire et l'installation d'une inflammation chronique athérogène (Cooper et al., 2002).

### **3.2.1. NADPH oxydase : principale source de production des ERO**

Initialement décrite dans les cellules phagocytaires, la NADPH oxydase est également présente dans de nombreux tissus et tout particulièrement dans le système cardiovasculaire (paroi vasculaire, cardiomyocytes). Cette enzyme transfère successivement des électrons du NADPH jusqu'à l'accepteur final  $O_2$  pour générer des anions superoxydes. Il existe 7 homologues dans la famille des NADPH oxydases : NOX1 à 5 et DUOX (Dual oxidase) 1 et 2, dont le nom correspond à celui de la plus grande sous-unité membranaire (Brandes et al., 2010). La NOX2, également appelée NADPH oxydase phagocytaire, est la première NOX à avoir été décrite. Elle se compose de sous-unités membranaires (NOX2 et p22) et de sous-unités catalytiques, telles que p47. En réponse à des facteurs physiopathologiques, les sous-unités cytosoliques de la NADPH oxydase vont être phosphorylées et transloquées au niveau du complexe membranaire pour former la NADPH oxydase active. Il existe, par ailleurs, des NOX, tels que la NOX4, qui ne possèdent pas de sous-unités cytosoliques (figure 7).

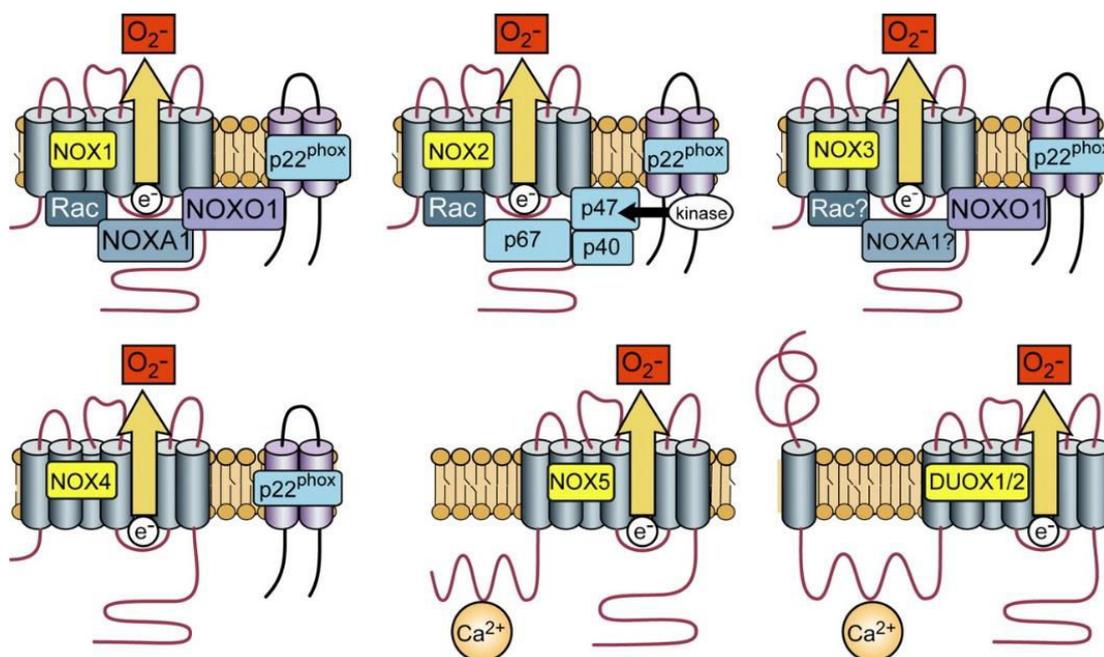


Figure 7 : La famille des NADPH oxydases (d'après Bedard and Krause, 2007)

### 3.2.2. Les principaux dommages oxydatifs

Les ERO peuvent induire différents dommages oxydatifs au niveau cellulaire en particulier au niveau des lipides, des protéines et des acides nucléiques. Ces altérations peuvent conduire à des pertes de fonction et d'intégrité, voire la mort cellulaire.

- La peroxydation lipidique :** Les premières cibles des ERO sont les lipides et plus particulièrement les acides gras insaturés. Les cibles concernent les lipoprotéines circulantes mais également les phospholipides membranaires. Dans le premier cas, l'oxydation lipidique aboutit à la formation de LDL oxydés qui peuvent être captés par les macrophages et former les dépôts lipidiques de la plaque d'athérome. Dans le second cas, l'attaque des phospholipides membranaires peut fragiliser la membrane cellulaire en modifiant sa fluidité, sa perméabilité ainsi que son excitabilité (Favier, 2003). Parmi les produits formés suite à la peroxydation lipidique, l'isoprostane, le malondialdéhyde (MDA), le 4-hydroxynonanal (4-HNE) et les produits réagissant à

l'acide thiobarbiturique (TBARS, Thiobarbituric acid reactive substances) sont très souvent utilisés en tant que marqueurs de la peroxydation lipidique et des dommages oxydatifs de façon générale. Ils sont d'ailleurs retrouvés en fortes concentrations lors de différents stades de l'athérosclérose (Vincent et Taylor, 2005). Par ailleurs, la production de radicaux libres chez les obèses est favorisée du fait de l'élévation des acides gras au niveau plasmatique, qui représentent des cibles privilégiées des attaques radicalaires. Ceci a pour conséquence de favoriser le développement du stress oxydant chez les sujets obèses (Vincent et Taylor, 2005).

- **L'oxydation des protéines :** Les protéines peuvent également être la cible des ERO ce qui peut engendrer divers types de modifications tels que la fragmentation de la protéine, l'oxydation des chaînes latérales des acides aminés ou la formation de liaisons croisées entre deux protéines (Bonfont-Rousselot et al 2001). Ces dommages sont irréparables et peuvent entraîner des modifications fonctionnelles irréversibles (non-reconnaissance d'un récepteur par un ligand, perte d'activité enzymatique). De plus, même si les protéines sont moins sensibles que les lipides aux attaques des ERO, leur oxydation peut entraîner la mort cellulaire (Guidet, 1992).

- **Les dommages de l'ADN :** Les dommages de l'ADN causés par le stress oxydant peuvent engendrer une oxydation des bases de l'ADN ou encore des cassures au niveau du brin d'ADN (Favier, 2003). Ceci peut entraîner des mutations carcinogènes engendrant la synthèse de séquences protéiques incorrectes et des fonctions cellulaires détériorées favorisant le développement de certains cancers et/ou des phénomènes de vieillissement (Bohr et al., 1998).

### **3.3. Marqueurs de la dysfonction endothéliale**

Etant donné que la dysfonction endothéliale est l'une des premières altérations survenant dans les complications cardiovasculaires, plusieurs travaux se sont intéressés au développement de méthodes permettant la détection de l'intégrité de cette fonction endothéliale. Actuellement, l'exploration clinique de la fonction endothéliale est réalisée au moyen de méthodes fonctionnelles, qui étudient de façon directe l'endothélium d'un segment vasculaire donné, et de méthodes biologiques, qui évaluent l'endothélium vasculaire au moyen d'indicateurs circulants, témoignant de son activité ou de son intégrité de façon plus globale (Deanfield et al., 2007).

### **3.3.1. Exploration fonctionnelle de l'endothélium**

Dans le cas des explorations fonctionnelles, des épreuves pharmacologiques peuvent être utilisées et consistent à étudier le fonctionnement de l'endothélium en mesurant généralement les effets vasomoteurs qui accompagnent l'administration de substances agissant par son intermédiaire. Ces substances, principalement l'acétylcholine (ACh), la substance P ou encore la bradykinine, se fixent sur des récepteurs spécifiques situés à la surface de l'endothélium et entraînent la libération dans la lumière vasculaire et au sein de la paroi de facteurs, tels que le NO, qui agissent sur les cellules musculaires lisses sous-jacentes en les relaxant (Deanfield et al., 2007). La réponse vasomotrice mesurée représente la réponse endothélium-dépendante mais une mesure de la réponse endothélium-indépendante doit toujours être prise en compte. En effet, si l'intégrité fonctionnelle des cellules musculaires lisses de la paroi est altérée, une réponse endothélium-dépendante diminuée sera observée même si la fonction endothéliale est normale (Nitenberg et Antony, 2004). Parmi les méthodes pharmacologiques, nous pouvons citer par exemple la technique de débitmétrie laser doppler qui permet d'évaluer la vasoréactivité vasculaire au niveau microcirculatoire (Léger, 2005).

Outre les agents pharmacologiques, l'exploration fonctionnelle de l'endothélium peut être effectuée par des agents mécaniques tels que la vitesse d'écoulement du sang (contrainte de cisaillement longitudinale) qui peut être augmentée par l'administration d'un vasodilatateur endothélium-indépendant augmentant le débit au niveau du site de mesure (dilatation flux-dépendante). Ces épreuves physiologiques sont généralement utilisées pour l'étude des artères de conductance (Deanfield et al., 2007).

### **3.3.2. Mesure de marqueurs biologiques**

La mesure de certains marqueurs biologiques peut renseigner sur l'intégrité vasculaire, sans toutefois être spécifique d'un territoire vasculaire donné. Ces marqueurs présentent cependant l'avantage de leur simplicité sur le plan clinique car il s'agit généralement de dosages de facteurs circulants, réalisés à partir de prélèvements sanguins ou urinaires. Les marqueurs les plus utilisés sont les facteurs vasoactifs d'origine endothéliale tels que le NO, qui est évalué de façon indirecte par la mesure de ses métabolites et principalement les nitrites (Kleinbongard et al., 2003). Les marqueurs solubles d'activation endothéliale et d'inflammation sont également considérés comme de bons indicateurs et incluent par exemple les molécules d'adhésion intercellulaire et vasculaire (ICAM-1, VCAM-1, PCAM), la protéine C-réactive (CRP) ou les cytokines tels que TNF $\alpha$  (Deanfield et al., 2007).

Toutefois, il apparaît depuis quelques années que l'étude de marqueurs circulants de type cellulaire soit une meilleure alternative aux biomarqueurs biochimiques classiques (Burger and Touyz, 2012). Parmi ces biomarqueurs, nous pouvons citer les cellules endothéliales circulantes, les progéniteurs endothéliaux et les microparticules (MPs) (Lekakis et al., 2011; Sabatier et al., 2011b). Seules ces dernières seront détaillées dans le chapitre suivant.

### III. Les microparticules

#### 1. Définition

Les MPs sont des vésicules membranaires, de taille comprise entre 0,1 et 1 $\mu$ m, libérées dans l'espace extracellulaire suite à une activation ou une apoptose de la cellule. Initialement identifiées, il y a plus de 35 ans, comme de simples « poussières de cellules », ou encore des débris inertes sans fonctions spécifiques (Wolf, 1967), ces MPs suscitent de plus en plus d'intérêt depuis quelques années. En effet, plusieurs études ont démontré qu'elles seraient des biomarqueurs d'intérêt dans de nombreuses pathologies et participeraient même au développement de leur physiopathologie en tant qu'importants systèmes de transport de molécules bioactives (Mause et Weber, 2010). Cependant, il est important de bien différencier les MPs des autres vésicules extracellulaires libérées par les différentes cellules. Ces vésicules sont généralement réparties en trois catégories, exosomes, corps apoptotiques et MPs, en fonction de leur taille, leur contenu et de leur mécanisme de formation (Figure 8).

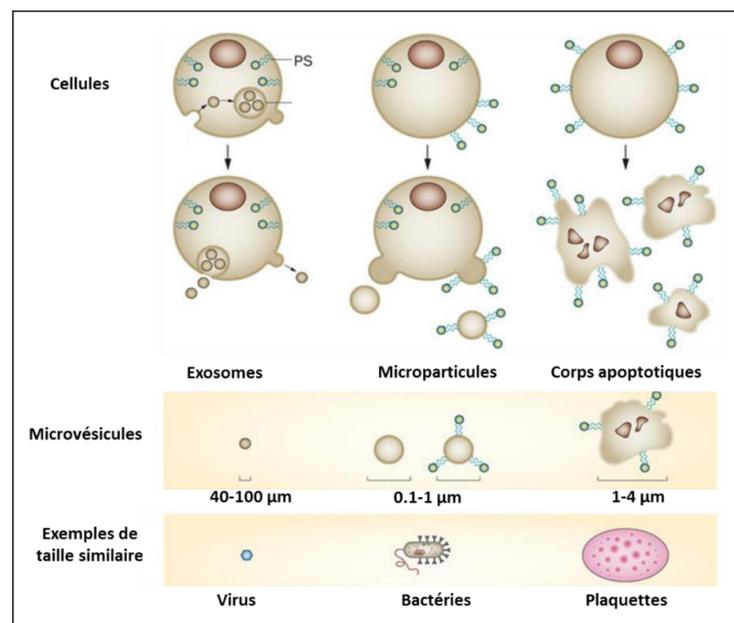


Figure 8: Taille des différents types de microvésicules libérées par les cellules (d'après Lemoinne et al., 2014)

- **Les exosomes** : ce terme désigne les plus petites vésicules extracellulaires avec une taille comprise entre 30 et 100 nm de diamètre. Elles sont formées par bourgeonnement vers l'intérieur des membranes endosomales et sont enfermées dans des particules intracellulaires qui libèrent leur contenu par la suite dans l'environnement extracellulaire (György et al., 2011).
- **Les corps apoptotiques** : ils ont une taille comprise entre 1 et 5  $\mu\text{m}$  approximativement et résultent principalement de la déformation et de la fragmentation de la cellule apoptotique. Ils peuvent être libérés par tous les types cellulaires lors des dernières étapes de l'apoptose et peuvent contenir de l'ARN et de l'ADN provenant de la fragmentation du noyau (György et al., 2011).
- **Les MPs** : elles sont identifiées comme une population hétérogène de particules phospholipidiques anucléées formées à partir des membranes cellulaires suite à des mécanismes spécifiques induisant leur libération (Diamant et al., 2004).

## 2. Origine des MPs

En condition normale, les MPs peuvent être retrouvées dans la circulation sanguine de sujets sains dans des concentrations physiologiques. Elles peuvent être libérées par différents types cellulaires suite à des stimuli physiologiques mais sont principalement d'origine plaquettaire et, en quantité moindre, d'origine leucocytaire, endothéliale et érythrocytaire (Tushuizen et al., 2011). Ces MPs peuvent être caractérisées par l'expression membranaire d'antigènes spécifiques de leur cellule d'origine (Tableau I). Ces mêmes antigènes sont d'ailleurs utilisés pour permettre le phénotypage des MPs.

Tableau I : Quelques exemples de marqueurs antigéniques permettant de caractériser l'origine des MPs (d'après Zahra et al., 2011).

Origine cellulaire des MPs	Antigène
Cellules endothéliales	CD31 (molécule d'adhésion PECAM-1)
	CD34
	CD62E (molécule d'adhésion E-sélectine)
	CD51 (molécule d'adhésion $\alpha$ v intégrine)
	CD105 (endogline)
	CD144 (VE-cadhérine)
	CD146
Globules rouges	CD235a (glycophorine A)
Lymphocytes	CD45
Monocytes	CD14
Plaquettes	CD41 (GPIIb)
	CD61 (GPIIIa)

Toutefois, en conditions pathologiques, de nombreuses études ont observé une augmentation significative de leurs concentrations plasmatiques ainsi qu'un changement des proportions de chaque type cellulaire d'origine (Barteneva et al., 2013).

### 3. Composition des MPs

Les MPs sont formées d'une membrane cytoplasmique entourant un contenu cytosolique, tous deux originaires de la « cellule mère ». Plusieurs antigènes de surface, caractéristiques de la membrane « mère », ainsi que des constituants cytosoliques peuvent ainsi être retrouvés dans ces MPs. Toutefois, leur composition est étroitement dépendante du type cellulaire ainsi que des circonstances physio-pathologiques de leur libération.

#### 3.1. Lipides

Les MPs possèdent une membrane formée par une bicouche de phospholipides résultant du phénomène de bourgeonnement de la membrane cytoplasmique de leur cellule d'origine. Toutefois, au contraire des membranes cellulaires, ces MPs se caractérisent par un feuillet externe présentant des phospholipides chargés négativement tels que la phosphatidylsérine (PS). Ceci est principalement dû à leur mécanisme de formation impliquant un réarrangement de la membrane plasmique (voir chapitre 4 : Formation des MPs). Cette composition lipidique des MPs pourrait également jouer un important rôle dans la détermination de l'activité protéique des MPs. En effet, certains travaux ont démontré, par exemple, qu'un enrichissement en cholestérol de monocytes humains induisait la génération de MPs au potentiel fortement pro-coagulant (Liu et al., 2007).

### **3.2. Protéines**

Les membranes des MPs contiennent des antigènes spécifiques de la cellule d'origine, mais également des molécules surexprimées ou transloquées dans la membrane suite à leur activation (Combes et al., 1999). Ces marqueurs de surface sont d'un grand intérêt lors de l'identification des MPs. Il est généralement admis que les MPs externalisent la PS ce qui en fait un bon marqueur d'identification. En effet, les microvésicules sont considérées comme des MPs si elles sont annexine V positive (l'annexine V se liant spécifiquement à la PS). Toutefois, plusieurs études ont pu identifier des MPs annexine V négative ce qui suggèrerait que ces microvésicules pourraient ne pas externaliser la PS (Connor et al., 2010). Ceci pourrait être expliqué par le fait que des voies de signalisation, autres que la perte de l'asymétrie membranaire, non reconnues à ce jour, seraient impliquées dans la formation des MPs (Boulanger et al., 2008). Une autre hypothèse serait que le site de liaison de la PS serait occupé par une autre protéine, empêchant ainsi l'interaction avec l'annexine V. Par exemple, la lactadhérine présente dans le sang peut

se lier fortement à la PS limitant ainsi l'interaction avec l'annexine V lors du dosage (Dasgupta et al., 2006).

### **3.3. Matériel génétique**

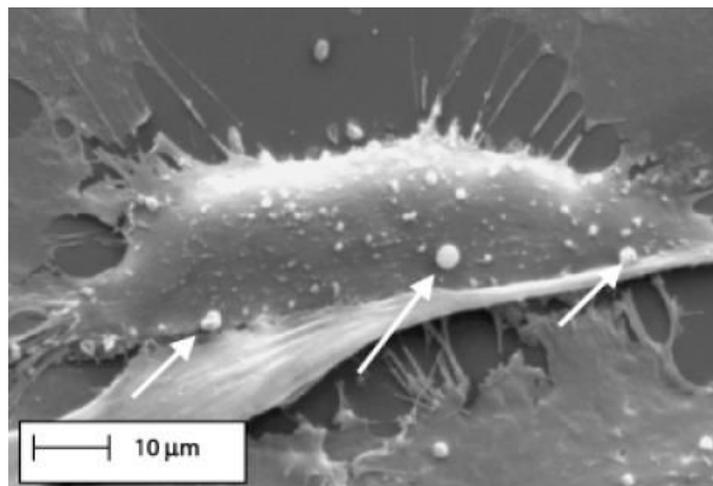
Plusieurs études ont démontré que les MPs pouvaient transporter des séquences d'ARN d'une cellule à une autre, pouvant ainsi contribuer à la « reprogrammation » phénotypique de la cellule-cible (Mause et Weber, 2010). Parmi ces ARN, les travaux les plus récents se sont particulièrement penchés sur les microARN (miR) qui sont des séquences non codantes d'une vingtaine de nucléotides intervenant dans la régulation posttranscriptionnelle de nombreux gènes d'intérêt. Ces miRs peuvent être retrouvés libres dans la circulation ou, le plus souvent, inclus dans microvésicules (MPs, exosomes et corps apoptotiques) avec toutefois les MPs comme principal vecteur de transport (Diehl et al., 2012). Ainsi, ces miRs peuvent aller réguler l'expression de gènes dans d'autres cellules, autres que leur cellule d'origine. Par exemple, il a été observé que certaines MPs pouvaient avoir des effets athéroprotecteurs grâce à leur contenu en miRs. En effet, il a été observé que des cellules HUVEC, stimulées par des forces de cisaillement ou shear stress, et enrichies en miR-143/145 pouvaient intervenir dans la régulation de gènes de cellules musculaires lisses, en coculture avec ces HUVEC, permettant ainsi la réduction de la formation de lésions athéromateuses au niveau de l'aorte de souris ApoE -/- (Hergenreider et al., 2012).

## **4. Formation des MPs**

En conditions physiologiques, les MPs peuvent être libérées de façon spontanée en faible quantité. Toutefois, différents stimuli, tels que les forces de cisaillement, i.e. shear stress, des agonistes physiologiques, une stimulation pro-apoptotique, peuvent induire la libération des MPs en fortes concentrations (György et al., 2011). Parmi ces

stimuli, nous pouvons par exemple citer certaines cytokines inflammatoires ( $\text{TNF}\alpha$ ), des inducteurs apoptotiques (i.e. staurosporine) ou encore un stress cellulaire qui permettent de générer des MPs à partir de cellules cultivées *in vitro* (Baron et al., 2012). Les médiateurs et les mécanismes impliqués dans la libération des MPs *in vivo* restent toutefois encore mal compris.

Il est cependant admis que la formation des MPs dépende essentiellement de deux grandes étapes : 1/ le phénomène de « flip-flop », qui va permettre l'externalisation des protéines du feuillet membranaire interne, et 2/ le réarrangement du cytosquelette, qui va induire le bourgeonnement de microvésicules à partir de la membrane et la libération de microparticules (Diamant et al., 2004) (Figure 9).



*Figure 9 : Formation des MPs à la surface des cellules stimulées. Les MPs sont marquées par des flèches blanches. Cliché de microscopie électronique à balayage réalisé après stimulation par interleukine  $\alpha 1$  de cultures endothéliales issues de veines ombilicales (Diamant et al., 2004).*

La membrane plasmique varie d'une cellule à l'autre mais il est généralement admis que le feuillet externe se compose majoritairement de phosphatidylcholine et de sphingomyéline alors que la phosphatidyléthanolamine et la PS sont retrouvées essentiellement sur le feuillet interne. En conditions physiologiques (i.e. absence de

stimuli), la membrane externe est non chargée tandis que celle interne est chargée négativement. Le maintien de ce déséquilibre de charge se fait grâce à différentes protéines transmembranaires. La scramblase (dont l'activité est calcium-dépendante) et la floppase (protéine ATP-dépendante responsable de l'externalisation de la PS en particulier) sont inactives tandis que la flippase, dont le rôle est l'internalisation des phospholipides chargés négativement, est activée (Barteneva et al., 2013).

Dans le cas de l'activation cellulaire, la concentration cytosolique en calcium, sous forme d'ions  $Ca^{2+}$ , va rapidement augmenter. Cette augmentation aura deux effets principaux : 1/ inhibition de la flippase et augmentation de l'activité de la scramblase ce qui va perturber l'équilibre lipidique de la surface cellulaire ; et 2/ activation de la calpaïne, une protéine qui va permettre de découper les filaments d'actine et détruire la taline, un constituant du cytosquelette (VanWijk et al., 2003).

Toutefois, les mécanismes de formation des MPs lors de l'activation cellulaire diffèrent de ceux retrouvés lors de l'apoptose. L'apoptose est en effet caractérisée par des contractions cellulaires, une fragmentation de l'ADN et un bourgeonnement dynamique au niveau membranaire. Il est admis que dans le cas de l'apoptose, le bourgeonnement membranaire dépend essentiellement de l'action de la Rho-associated kinase, ROCK I, activée par les caspases, et qui est responsable du remodelage de la structure du cytosquelette (Coleman et al., 2001) (Figure 10).

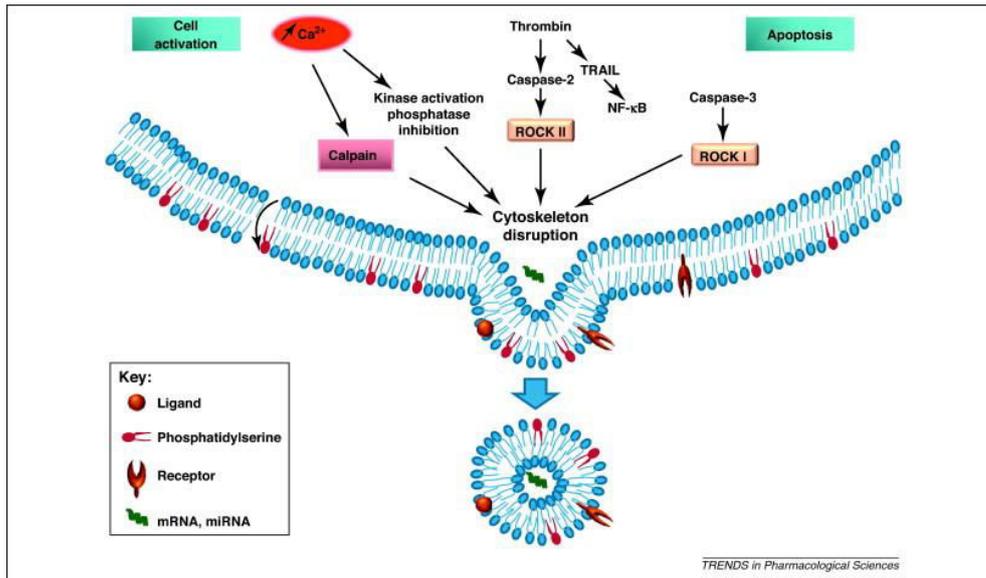


Figure 10 : Représentation schématique des mécanismes impliqués dans la formation des MPs durant l'activation cellulaire (à gauche) et l'apoptose (à droite) (Martinez et al., 2011).

## 5. Mode d'action des MPs

Il est admis que les MPs peuvent transférer des constituants de leur cellule d'origine vers d'autres cellules, participant ainsi à la communication intercellulaire. Différents mécanismes de transfert de l'information peuvent être observés. Les MPs peuvent transférer leurs composants membranaires ou contenu cytoplasmique aux cellules-cibles suite à une fusion membranaire ou encore par internalisation. Certains composants des MPs peuvent induire des cascades biologiques et une reprogrammation au niveau de la cellule-cible tandis que d'autres constituants de la membrane des MPs peuvent être recyclés au niveau de la membrane de la cellule-cible (Mause et Weber, 2010) (Figure 11).

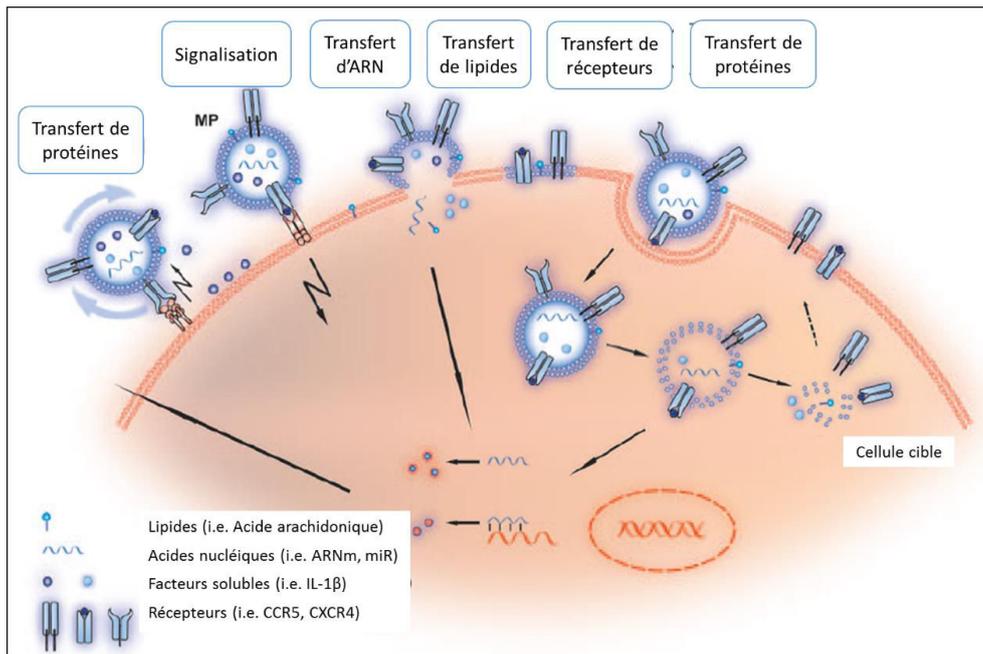


Figure 11: Les différents modes de transfert intercellulaire de l'information par les MPs (Mause and Weber, 2010)

Les MPs peuvent par exemple transférer des récepteurs membranaires vers leurs cellules-cibles leur conférant ainsi la possibilité d'effectuer de nouvelles interactions. Ceci a notamment été observé pour les récepteurs à chimiokines CCR5 (Mack et al., 2000) et CXCR4 (Rozmyslowicz et al., 2003), qui sont des récepteurs membranaires intervenant dans la pénétration cellulaire des virus, notamment celui du VIH. Par ailleurs, les MPs peuvent également transférer des protéines solubles telles que des chimiokines, des facteurs de croissances ou encore des cytokines, en fusionnant avec la membrane de la cellule-cible ou après internalisation afin de libérer leur contenu cytoplasmique. Dans ce sens, plusieurs études ont pu mettre en évidence la présence de l'interleukine pro-inflammatoire IL-1 $\beta$  dans les MPs provenant de cellules immunitaires activées, en quantité plus élevée dans les MPs par rapport à la fraction plasmatique dépourvue de MPs (MacKenzie et al., 2001; Pizzirani et al., 2007). Lindemann et al., ont pu observer que, pendant la formation du caillot de fibrine, les plaquettes pouvaient libérer des MPs

enrichies en IL-1 $\beta$  qui interviendraient dans la surexpression des molécules d'adhésion et des chimiokines et favoriseraient l'adhésion des neutrophiles au niveau des cellules endothéliales (Lindemann et al., 2001).

Outre les protéines membranaires ou solubles, les MPs peuvent également transférer des ARN provenant de leur cellule d'origine. En effet, comme nous l'avons cité précédemment, les MPs sont l'un des principaux vecteurs de transport des miR qu'ils peuvent libérer au niveau du cytoplasme de la cellule-cible, suite à une fusion membranaire ou une internalisation (Figure 11). Ces miRs ont notamment été détecté dans les MPs de sujets sains (Hunter et al., 2008) et la variation de leurs concentrations a été associée à plusieurs facteurs de risque cardiovasculaires tels que l'obésité (Ortega et al., 2013), le diabète de type 2 (Guay et Regazzi, 2013) ou encore le syndrome métabolique (Karolina et al., 2012). Plusieurs études rapportent également l'implication de certains miR dans plusieurs mécanismes biologiques tels que les processus inflammatoires (Schroen et Heymans, 2012). Par exemple, miR-146a serait surexprimé *in vitro* dans des monocytes, suite à une stimulation pro-inflammatoire par les lipopolysaccharides, et interviendrait dans la régulation négative de l'expression de certaines protéines pro-inflammatoires (Taganov et al., 2006). Par ailleurs, miR-223 serait impliqué dans la régulation de la maturation et la prolifération des neutrophiles en stimulant la différenciation des précurseurs myéloïdes en granulocytes (Johnnidis et al., 2008).

De plus, certaines études ont démontré que les MPs pouvaient transférer des lipides bioactifs. Barry et al. par exemple, ont pu mettre en évidence que des MPs plaquettaires, enrichies en AA, étaient capables d'induire l'activation plaquettaire suite à un transfert de l'AA par les MPs (Barry et al., 1997). Ainsi, elles joueraient un rôle dans la fonction endothéliale en intervenant dans la voie des COX2 (Barry et al., 1999).

## **6. Implication des MPs dans les maladies cardiovasculaires**

Les MPs représentent un pool de bioeffecteurs circulants qui jouent un rôle crucial dans la coagulation, l'inflammation, la fonction vasculaire et l'angiogenèse (Lovren and Verma, 2013). L'endothélium représente une des principales cibles des MPs circulantes en raison de sa localisation stratégique au niveau de la paroi vasculaire. La réponse endothéliale aux MPs peut être aiguë, résultant de la libération de plusieurs facteurs, ou chronique, impliquant des changements dans l'expression de gènes impliqués dans la régulation structurelle et fonctionnelle de la paroi vasculaire (Martínez et al., 2005). Les effets des MPs sont rapportés très variables dans la littérature. Ils peuvent être bénéfiques ou délétères en fonction des stimuli de génération, de la composition et du lieu d'action de ces MPs (Lovren et Verma, 2013).

### **6.1. Effets délétères**

Les MPs jouent un rôle dans de nombreux mécanismes délétères impliqués dans les maladies cardiovasculaires. Plusieurs études ont démontré que des MPs isolées de patients souffrant de diverses pathologies, telles que l'infarctus du myocarde (Boulanger et al., 2001) ou encore l'insuffisance rénale (Amabile et al., 2005), pouvaient entraîner une dysfonction endothéliale sur des anneaux d'aorte de rats *ex vivo*, en diminuant la capacité de relaxation à l'acétylcholine. Cette altération pourrait être causée par une diminution de la production de NO ou par une augmentation de l'expression de la cavéoline-1. De plus, des études ont démontré que les MPs contribuent à la production de ERO par les cellules endothéliales, *in vitro* et *in vivo* (Gambim et al., 2007; Mastronardi et al., 2011). Gambim et al. (2007) ont montré que des MPs plaquettaires, possédant une activité NADPH oxydase, pouvaient produire des peroxy-nitrites, ayant pour conséquence d'induire une apoptose endothéliale. Par ailleurs, de nombreux travaux ont démontré *in*

*in vitro* que les MPs circulantes interviennent dans les réactions pro-inflammatoires. En effet, il a été observé que les MPs (plaquettaires et leucocytaires) contribuent au processus inflammatoire en augmentant la production d'interleukine IL-6 et IL-8 par les cellules endothéliales et leucocytaires (Mesri et Altieri, 1999; Nomura et al., 2001). De plus, elles peuvent induire l'adhésion des monocytes et l'expression des molécules d'adhésion, telles que les antigènes CD11a sur les monocytes et les ICAM-1 à la surface des cellules endothéliales (Barry et al., 1998; Nomura et al., 2001). Toutefois, ces études se sont essentiellement basées sur des MPs générées *in vitro*. En effet, une étude utilisant le surnageant de plaquettes activées, contenant des MPs plaquettaires, a démontré que ces dernières n'affectaient pas l'adhésion leucocytaire *in vivo* chez des souris déficientes en apolipoprotéine E (ApoE<sup>-/-</sup>, modèle d'athérosclérose murin) et n'avaient pas d'effet sur le développement des plaques d'athérosclérose (Huo et al., 2003).

## **6.2. Effets bénéfiques**

Plusieurs études ont rapporté que les MPs pouvaient jouer un rôle bénéfique au niveau vasculaire. Dalli et al. (2008) ont rapporté que des MPs d'origine leucocytaire pouvaient prévenir la réponse inflammatoire des leucocytes exposés aux lipopolysaccharides et induire la production de cytokines antiinflammatoires telles que TGF- $\beta$ 1. De plus, Köppler et al. (2006) ont montré qu'*in vitro*, des MPs pouvaient être internalisées par les monocytes et les lymphocytes B par différents mécanismes et moduler leur activation vers un profil anti-inflammatoire.

Les MPs circulantes jouent également un rôle important dans la coagulation du fait de l'exposition de la PS et du facteur tissulaire (FT) au niveau de leur membrane. Elles peuvent donc participer à la thrombose grâce à l'expression du FT et à l'interaction du ligand de la P-sélectine présent sur les MPs et de la P-sélectine des plaquettes (Falati et al., 2003). Les MPs de monocytes générées *in vitro* participent également à

l'augmentation du pouvoir pro-thrombotique de l'endothélium par transfert du FT aux cellules endothéliales (Aharon et al., 2008). Par ailleurs, certaines MPs lymphocytaires (les morphogen sonic hedgehog) peuvent également intervenir dans le phénomène d'angiogenèse, en stimulant *in vitro* la formation de capillaires en augmentant l'adhésion et l'expression de facteurs pro-angiogéniques dans les cellules-cibles (Soleti et al., 2009).

## **IV. L'obésité, facteur de risque de dysfonction endothéliale**

### **1. Définition**

Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), l'obésité se définit comme une « accumulation anormale ou excessive de graisse corporelle pouvant nuire à la santé » (« OMS | Obésité et surpoids » 2015). Devant l'ampleur du développement épidémique mondial de l'obésité et de ses conséquences, cette pathologie a été classée en tant que première épidémie non-infectieuse de l'histoire.

L'obésité est essentiellement diagnostiquée à partir d'indicateurs anthropométriques. L'OMS a défini depuis les années 90 l'indice de Quetelet, ou indice de masse corporelle (IMC), qui est considéré comme mesure universelle pour l'évaluation de la corpulence d'un sujet et qui est bien corrélé avec la masse grasse chez l'adulte (Guillaume, 1999). Cet indice est calculé selon la formule suivante :  $IMC = \text{Poids (kg)} / \text{Taille}^2 \text{ (m)}$ . Des seuils ont été établis, en fonction de cet indice, afin de classer la charge pondérale et la corpulence des sujets adultes (Tableau II). Toutefois, pour les enfants, l'obésité est définie par des valeurs supérieures au 97<sup>e</sup> percentile de la distribution de l'IMC pour une classe d'âge donnée.

Tableau II : Classification de la corpulence en fonction des valeurs de l'IMC

<b>Corpulence</b>	<b>Valeur de l'IMC</b>
Maigreur	IMC inférieur à 18,5 kg/m <sup>2</sup>
Poids normal	IMC compris entre 18,5 et 24,9 kg/m <sup>2</sup>
Surpoids	IMC compris entre 25 et 29,9 kg/m <sup>2</sup>
<b>Obésité</b>	IMC supérieur ou égal à 30 kg/m <sup>2</sup>
Type I –modéré-	IMC compris entre 30 et 34,9 kg/m <sup>2</sup>
Type II –sévère-	IMC compris entre 35 et 39,9 kg/m <sup>2</sup>
Type III –massive, morbide-	IMC supérieur ou égal à 40 kg/m <sup>2</sup>

## 2. Epidémiologie

La prévalence de l'obésité a plus que doublé au niveau mondial entre 1980 et 2014 et, d'après les dernières estimations de l'OMS, plus de 1,9 milliard d'adultes présentent un surpoids, et 600 millions d'entre eux sont obèses obèses (Figure 12) (« OMS | Obésité et surpoids » 2015).

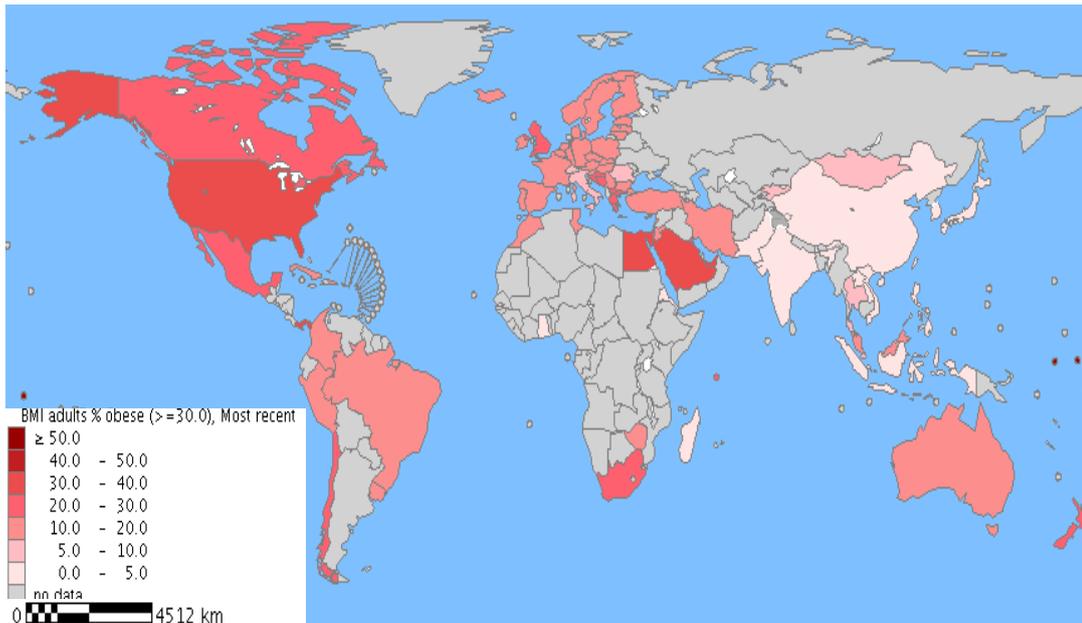


Figure 12 : Prévalence de l'obésité dans le monde (d'après l'OMS, 2015)

Par ailleurs, nous assistons depuis quelques décennies à un large phénomène de transition épidémiologique distingué par l'extension des maladies cardiovasculaires et de leurs facteurs de risque dont l'obésité (Finucane et al., 2011). Les pays méditerranéens sont particulièrement touchés par l'évolution du taux d'obésité (Papandreou et al., 2008). En France, l'étude Obépi/Roche, réalisée en 2012, a pu mettre en évidence que 32,3% des plus de 18 ans sont en surpoids et 15% sont obèses. La prévalence de l'obésité est toutefois plus élevée chez les femmes : 15,7% contre 14,3% chez les hommes (Eschwege et al. 2012). En Tunisie, le surpoids et l'obésité sont également considérés comme un problème de santé majeur. En effet, la prévalence du surpoids, pour la population tunisienne entre 35 et 70 ans, est de plus de 60% (El Ati et al., 2012). Toutefois, selon El Ati et al. (2012), il existe en Tunisie une très nette disparité en fonction du sexe car, bien que plus de 50% des hommes soient en surpoids, ce taux dépasserait les 70% chez les femmes. La prévalence de l'obésité est également trois fois plus élevée chez les Tunisiennes par rapport aux Tunisiens avec 37% contre 13% respectivement.

### 3. Les différents types d'obésité

Si le calcul de l'IMC représente un moyen rapide d'estimer l'obésité, il ne permet en revanche ni de faire la distinction entre masse grasse et masse maigre, ni de tenir compte de la répartition du tissu adipeux dans l'organisme. D'autres mesures anthropométriques permettent d'affiner les estimations obtenues par le calcul de l'IMC. Ainsi, la mesure du tour de taille (TT) et le rapport de la circonférence de la taille sur celle des hanches ( $RTH = TT/TH$ ) permettent une meilleure évaluation des dépôts adipeux viscéraux (Lean et al., 1995).

Grâce à ces mesures, nous pouvons alors distinguer l'obésité androïde (abdomino-mésentérique), caractérisée par une augmentation du tissu adipeux au niveau intra-abdominal, et l'obésité gynoïde (fessio-crurale), caractérisée par une augmentation du tissu adipeux au niveau de la région glutéo-fémorale (Vague, 1956). Cette distinction n'est pas seulement intellectuelle, il y a en effet, une grande différence de risque de complications et maladies associées à l'obésité, selon qu'elle est abdomino-mésentérique ou gynoïde. L'obésité androïde est en effet associée à une augmentation de 3 à 4 fois du risque cardiovasculaire tandis que la lithiase biliaire, par exemple, est plus fréquente en cas d'obésité gynoïde (Czernichow et al., 2006). Il est simple de distinguer ces deux types d'obésité. En effet, un tour de taille supérieur à 102cm chez les hommes et 88cm chez les femmes sont de bons indices d'une obésité abdominale tandis que d'autres études prennent en compte l'indice RTH avec un rapport supérieur à 0,85 chez les femmes et 0,9 chez les hommes permettant de définir le seuil de l'obésité androïde (Alberti et al., 2005).

Toutefois, il s'est avéré que la « dangerosité » du tissu adipeux ne dépendait pas seulement de sa localisation abdomino-mésentérique ou gynoïde. En effet, l'obésité a

été reclassifiée en fonction de type de graisse : sous-cutanée (ou périphérique) et viscérale (ou profonde). Cette dernière localisation est généralement associée à une obésité dite « métabolique » et permettrait d'identifier les individus, obèses ou non, présentant un risque cardiovasculaire (Hamdy et al., 2006).

#### **4. Physiopathologie de l'obésité**

L'obésité est une maladie chronique du tissu adipeux qui évolue en deux phases. La première, dite de constitution (dynamique), résulte d'un déséquilibre de la balance énergétique entre les apports et les dépenses énergétiques conduisant à un bilan d'énergie positif. A ce stade, les adipocytes se chargent en triglycérides mais l'excès de masse grasse reste longtemps réversible. L'augmentation de la masse grasse est associée à une augmentation de la masse maigre, du volume sanguin et du volume des organes, ce qui entraîne une augmentation de la dépense énergétique au repos. La seconde phase, dite de maintien (statique), témoigne d'un nouvel équilibre énergétique au cours duquel le poids se stabilise et le bilan d'énergie devient équilibré. Toutes ces modifications engendrent, au cours du temps, de profonds remaniements cellulaires et de la composition corporelle (Basdevant, 2006; Sanguignol, 2008). Le dysfonctionnement des capacités de stockage des adipocytes s'accompagne en effet de profonds remaniements anatomiques, biologiques et fonctionnels qui concernent l'ensemble des cellules du tissu adipeux et qui altèrent le dialogue de ce tissu avec le reste de l'organisme.

Le terrain génétique est susceptible de favoriser le développement de l'obésité, en intervenant sur les systèmes de contrôle de la balance énergétique. Certaines anomalies génétiques rares peuvent être responsables d'obésités syndromiques ou encore des formes monogéniques d'obésité. Les obésités syndromiques sont associées

à d'autres anomalies du développement (retard mental, dysmorphie, malformations, atteintes neurosensorielles), la plus fréquente étant le syndrome de Prader-Willi (1/15000 naissances), dont l'anomalie chromosomique engendre des troubles du comportement alimentaire incontrôlables (Holm et al., 1993). Dans le cas des formes monogéniques (moins de 1% des cas d'obésité), les anomalies génétiques en cause affectent principalement des facteurs essentiels de la régulation du poids, qui interviennent dans les voies de la leptine (rôle clé dans la régulation du poids et de plusieurs voies endocrines) et des mélanocorticones, cible de la leptine dans l'hypothalamus (Dubern et Clément, 2007). Outre ces formes monogéniques, il existe également des formes polygéniques d'obésité, ou encore obésité commune, qui résultent de l'interaction de plusieurs variants géniques avec un environnement à risque (Rankinen et al., 2006). Dans ce cas, chaque gène de susceptibilité pris individuellement aurait de faibles effets sur le poids, et la contribution cumulative de ces gènes ne deviendrait significative qu'en interaction avec des facteurs environnementaux prédisposant à leur expression phénotypique, tels que la suralimentation et la baisse de l'activité physique (Dubern et Clément, 2007).

## **5. Le tissu adipeux**

### ***5.1. En condition physiologique***

Le tissu adipeux est un tissu hétérogène composé de plusieurs types cellulaires : les adipocytes matures, et plusieurs autres types de cellules, telles que les préadipocytes, les fibroblastes, les cellules endothéliales, les macrophages, qui forment la fraction stroma vasculaire (FSV) (Bouloumié et al., 2006) (Figure 13).

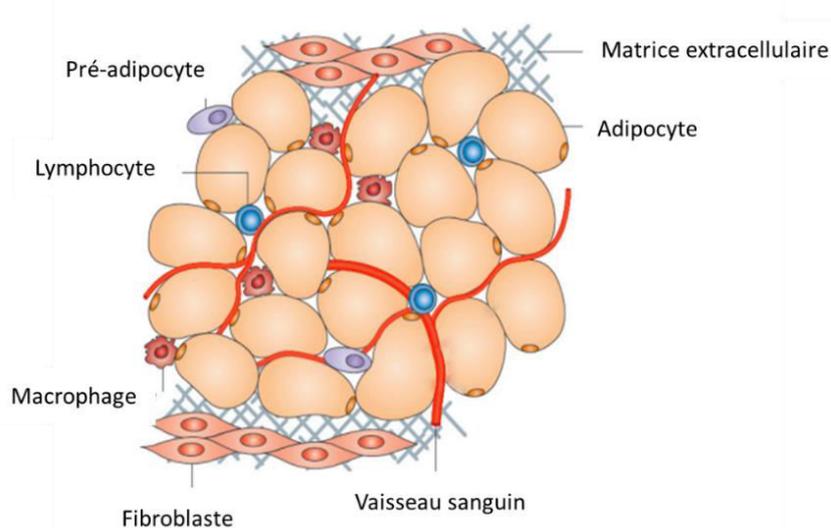


Figure 13 : Composition du tissu adipeux (modifié d'après Ouchi et al., 2011)

Une des fonctions principales du tissu adipeux est la mise en réserve de l'énergie sous forme de triglycérides en période d'apport énergétique et sa libération en période de stress sous forme d'acides gras et de glycérol par un processus de lipolyse. Ces acides gras sont ensuite oxydés dans le foie, le cœur ou le muscle squelettique pour permettre la synthèse d'ATP. Une partie des acides gras libérés par lipolyse est distribuée aux différents organes sous forme d'acides gras liés à l'albumine. Dans le foie, les acides gras pourront être utilisés pour former de nouveaux triglycérides ou des molécules de VLDLc (Very Low Density Protein cholesterol). Une autre partie d'acides gras libérée par le tissu adipeux est re-estérifiée au sein de l'adipocyte.

Le tissu adipeux est toutefois bien plus qu'un simple organe de stockage d'énergie. Il synthétise des adipokines, des molécules bioactives à action locale (autocrine/paracrine) et systémique (endocrine), qui peuvent jouer un important rôle dans la régulation énergétique, l'oxydation des lipides, la fonction immunitaire et les fonctions vasculaires (Kershaw et Flier, 2004; Ouchi et al., 2011).

## **5.2. Chez le sujet obèse**

L'obésité se caractérise par une hypertrophie (augmentation de la taille) et/ou une hyperplasie (augmentation du nombre) adipocytaire qui entraîne une altération de la morphologie et de la fonction sécrétoire du tissu adipeux (Albrink et al., 1976). Il en résulte un dérèglement au niveau de la synthèse d'adipokines avec une tendance vers une sécrétion accrue d'adipokines pro-inflammatoires et une diminution de la sécrétion d'autres adipokines ayant des effets biologiques bénéfiques telles que l'adiponectine (Trayhurn et Wood 2004). (Voir chapitre 6.2. Inflammation systémique).

De plus, les différences individuelles des capacités de sécrétion d'adipokines, en fonction de la localisation du tissu adipeux viscéral et du tissu sous-cutané et l'abondance de ces tissus chez certains individus contribuent vraisemblablement à augmenter le risque des complications métaboliques et cardiovasculaires.

# **6. Complications liées à l'obésité**

## **6.1. Complications métaboliques**

L'obésité est fréquemment associée à diverses complications métaboliques étroitement liées à la répartition régionale de la graisse corporelle plus qu'à l'excès de poids en soi. En effet, le tissu adipeux est considéré comme le principal lieu de stockage des acides gras et ces derniers sont relargués dans la circulation sanguine afin de fournir des apports énergétiques pour les divers tissus. Toutefois, une accumulation du tissu adipeux dans la région abdominale viscérale favorise l'augmentation du transport des acides gras libres vers le foie, par la circulation splanchnique, favorisant ainsi les effets délétères directs sur le métabolisme lipidique (Pouliot et al., 1992).

Une des complications les plus couramment associée à l'obésité est le diabète de type 2 qui se caractérise par une concentration plasmatique élevée de glucose secondaire à une résistance et/ou à une concentration plasmatique élevée d'insuline. Par ailleurs, le terme de « diabésité » est aujourd'hui utilisé pour définir l'augmentation de la prévalence du diabète en regard de celle de l'obésité (Rorive et al., 2005). Toutefois, il est important de signaler que le diabète de type 2, via l'insulino-résistance, est une complication fréquente de l'obésité mais non présente chez tous les obèses. Ceci peut être expliqué par le fait que certains sujets ont une plus grande capacité de stockage de graisses dans le tissu sous-cutané abdominal. En effet, la survenue de l'insulino-résistance chez les obèses reposerait initialement sur la faible capacité de stockage de ces graisses dans le compartiment sous-cutané abdominal, qui favoriserait une accumulation des graisses au niveau intra-abdominal, hépatique et musculaire. Ceci s'accompagne d'une augmentation des acides gras libres circulants dans le sang et aboutit à une insulino-résistance. Il en résulte une diminution des phénomènes contrôlés par l'insuline, qui sont l'utilisation musculaire du glucose, le freinage de la production hépatique de glucose et l'inhibition de la lipolyse (Shulman, 2000).

De plus, la dyslipidémie, qui correspond à une hypertriglycéridémie et une hypo-HDL-cholestérolémie, peut également être associée à l'obésité. Les données physiopathologiques montrent que l'insulino-résistance entraîne une augmentation des acides gras libres qui stimulent la synthèse hépatique de triglycérides sous forme de VLDLc, ainsi que la diminution des HDL-cholestérol (Lemieux et al., 2000).

L'obésité représente également un critère important permettant de définir le syndrome métabolique (SM). Ce SM décrit un concept ou un état qui n'est pas une pathologie en soi mais qui est qualifié d'état pré-pathologique qui augmente le risque de maladies cardiovasculaires et de diabète de type 2. Il est considéré comme la co-

occurrence, partielle ou totale, d'une obésité viscérale, d'une dyslipidémie (taux élevés de triglycérides et faibles en HDLc), d'une hyperglycémie, d'une insulino-résistance, d'une hypertension, toutes étant des facteurs de risque pour les maladies cardiovasculaires (Delarue et al., 2006). Récemment, un consensus a permis d'harmoniser la définition du syndrome métabolique, comme étant la présence d'au moins 3 parmi ces 5 facteurs (Alberti et al., 2009).

## **6.2. Inflammation systémique**

Il est désormais admis que l'obésité est une maladie inflammatoire car elle se caractérise par un état d'inflammation chronique de faible intensité, dite de bas grade, engendré par l'augmentation modérée, mais chronique, des taux circulants de médiateurs de l'inflammation comme les cytokines pro-inflammatoires et les molécules d'adhésion (Trayhurn et Wood, 2004). Chez les obèses, ce tissu adipeux secrète de façon excessive un grand nombre de cytokines pro-inflammatoires telles que :

- **La leptine** : joue un rôle dans la régulation neuroendocrinienne de la satiété et la dépense énergétique. L'augmentation des taux de leptine retrouvée en cas d'obésité, est notamment inversement corrélée à la biodisponibilité du NO dans l'endothélium aortique et peut produire une dysfonction endothéliale au niveau de la microcirculation par l'augmentation du stress oxydatif (Knudson et al., 2008).
- **La chémérine** : est une adipokine, majoritairement exprimée et sécrétée par les adipocytes, et qui est impliquée dans le développement de l'inflammation, mais aussi dans l'adipogenèse et la régulation du métabolisme du glucose dans les cellules musculaires squelettiques et les cellules endothéliales (Fatima et al., 2015).

- **L'IL6** : est sécrétée par de nombreux types cellulaires (fibroblastes, cellules endothéliales, monocytes, adipocytes) et voit sa production par les adipocytes augmentée en condition d'obésité (Maachi et al., 2004). Elle joue un rôle central dans l'association entre obésité, inflammation et maladies cardiovasculaires (Yudkin et al., 2000).
- **Le Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ )** : est surexprimé dans le tissu adipeux chez les obèses (Maachi et al., 2004). Il participe à la dérégulation de la fonction endocrine des adipocytes en stimulant la sécrétion d'adipokines pro-inflammatoires et en modulant négativement les molécules anti-inflammatoires (Maury et al., 2009).

En plus de la surexpression de cytokines pro-inflammatoires, le tissu adipeux chez les obèses présente également une sécrétion altérée d'**adiponectine**. Cette cytokine est une protéine aux effets protecteurs et anti-inflammatoires sur le système vasculaire. Elle est abondante au niveau plasmatique en condition physiologique mais dont les concentrations plasmatiques sont diminuées chez les obèses (Trayhurn et Wood, 2004). Elle est impliquée dans la production de NO par les cellules endothéliales. Elle supprime la production des ERO et protège les cellules en inhibant les cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF $\alpha$ . Elle joue également un rôle favorable sur la résistance à l'insuline, l'inflammation et la fonction cardiovasculaire (Kern et al., 2003; Trayhurn et Wood, 2004).

De plus, chez les sujets obèses, le tissu adipeux hypertrophié peut être infiltré par des cellules leucocytaires telles que des macrophages et des lymphocytes (Fantuzzi, 2005). Ces cellules contribuent, au niveau du tissu adipeux, à l'état inflammatoire de bas-grade associé à l'obésité. En effet, différentes populations de macrophages existent dans le tissu adipeux, dans un état pro- ou anti-inflammatoire, et expriment des

marqueurs d'activation. Les phénotypes, M1 pro- ou M2 anti- inflammatoire, de ces macrophages varient en fonction du degré d'obésité et de son évolution. Des études ont également montré que la prise de poids chez la souris s'accompagne d'une transition dans les populations cellulaires passant d'un phénotype macrophagique M2 (anti-inflammatoire) vers un profil M1 (pro-inflammatoire) (Lumeng et al., 2007).

Enfin, il a été clairement établi que l'existence d'un syndrome inflammatoire chez les obèses favorise les altérations vasculaires et notamment endothéliales (Pearson et al., 2003).

### **6.3. Altération de la fonction endothéliale**

L'obésité, et plus particulièrement l'obésité abdominale, représente un facteur de risque indépendant d'apparition des complications cardiovasculaires et ce, dès les premiers stades de l'atteinte vasculaire (Poirier et Després, 2003). De nombreuses études ont pu mettre en évidence que l'obésité causait une altération de la fonction endothéliale progressive tant au niveau des artères de gros calibres qu'à celui de la microcirculation, ce qui explique le risque majeur qu'elle constitue dans l'initiation et le développement de l'atteinte cardiovasculaire (Barton et al., 2012; Campia et al., 2012; Vanhoutte, 2012).

L'altération de la fonction endothéliale a été observée dans les modèles expérimentaux pour lesquels la libération du NO induite par l'Ach ou l'insuline est diminuée chez la souris rendue obèse suite à un régime alimentaire hypercalorique (Noronha et al., 2005). En clinique, l'altération de la fonction endothéliale a également été rapportée chez des enfants obèses (Karpoff et al., 2009; Woo et al., 2004) et chez les femmes obèses et en surpoids (Miâdi-Messaoud et al., 2009). Cette atteinte de la réponse

vasodilatatrice semble se développer progressivement au niveau de la microcirculation, avec l'augmentation de l'obésité (Perticone et al., 2001).

La dysfonction endothéliale induite par l'obésité est caractérisée par une altération de la balance du tonus vasculaire, c'est-à-dire une diminution de la production des agents dilatateurs (NO) et une augmentation de celle des facteurs endothéliaux pro-contractiles (tels que ET-1) et notamment au niveau de la microcirculation (Serné et al., 2007).

Plusieurs facteurs peuvent être à l'origine de la diminution de la réponse vasodilatatrice dans des modèles d'obésité, tels que le stress oxydant qui semble être un des principaux maillons reliant l'obésité à la dysfonction endothéliale (Avogaro et de Kreutzenberg, 2005). En effet, il serait associé à une diminution de la machinerie anti-oxydante, ce qui rend les obèses plus exposés aux conséquences du stress oxydant (Nakao et al., 2000, Jang et al. 2001). L'augmentation du stress oxydant vasculaire est associée à la dysfonction endothéliale chez un modèle expérimental de régime hypercalorique (Galili et al., 2007). En effet, la diminution de la biodisponibilité du NO chez les obèses peut être causée par l'augmentation de la formation des ROS notamment les ions  $O_2^{\cdot-}$  avec pour conséquence la diminution de la vasodilatation de la microcirculation mésentérique et des muscles squelettiques chez des souris et des rats obèses (Frisbee et Stepp, 2001).

Par ailleurs, le développement important du tissu adipeux chez les obèses est généralement associé à une réponse inflammatoire chronique caractérisée par une production élevée d'adipokines. Plusieurs études ont démontré que ces dernières sont impliquées dans les fonctions cardiovasculaires et influencent, de façon directe ou indirecte, l'homéostasie vasculaire de sujets obèses (Casteilla et al., 2004; Fève et al., 2006; de Gusmao Correia et Haynes, 2004). En effet, les cytokines pro-inflammatoires

peuvent réduire la production de NO et diminuer sa biodisponibilité en stimulant la production des ROS, au niveau des cellules endothéliales, par plusieurs sources de ROS comme la NADPH oxydase, la xanthine oxydase et la eNOS découplée peuvent être stimulées (Sturm et al., 2009).

Le déséquilibre du tonus vasculaire peut également être induit par l'augmentation de l'activité vasoconstrictrice. Des études ont, en effet, pu mettre en évidence que ET-1, un des principaux agents vasoconstricteurs, jouait un rôle important dans la dysfonction endothéliale chez les obèses et les diabétiques de type 2 (Mather et al., 2002).

### **7. Les MPs sont-elles impliquées dans le développement de la dysfonction endothéliale ?**

Comme nous l'avons énoncé précédemment, les MPs circulantes voient leur concentration plasmatique s'accroître en conditions physiopathologiques en présence de facteurs de risque/complications cardiovasculaires, et notamment en présence d'une altération de la fonction endothéliale. Dans ce sens, Arteaga et al. ont pu démontrer l'existence d'une relation entre un taux élevé de MPs d'origine endothéliale et un état d'obésité, voire la présence d'un syndrome métabolique (Arteaga et al., 2006). D'après Jimenez et al. (2003), ces MPs endothéliales reflètent essentiellement le degré d'apoptose touchant les cellules endothéliales.

Plusieurs travaux se sont par la suite intéressés aux effets directs des MPs sur la vasoréactivité vasculaire. Une des premières études sur le sujet était celle de l'équipe de Boulanger et al. (2001) qui a étudié *ex vivo* l'effet de MPs, provenant de sujets ayant un infarctus du myocarde, sur la vasoréactivité d'anneaux d'aorte isolée de rats. Un des principaux résultats de cette étude montrait que les MPs « pathologiques » altéraient la

fonction endothéliale tandis que les MPs « saines », provenant de sujets contrôles sans aucune complication cardiovasculaire, ne modifiaient pas la réponse vasorelaxante (Boulangier et al., 2001). Des résultats similaires ont également été observés avec des MPs provenant de sujets présentant une dysfonction rénale (Amabile et al., 2005). De plus, de nombreuses études ont permis d'observer que les MPs contiennent des composants de leurs cellules d'origine qui sont actifs et qui peuvent donc interagir sur les fonctions biologiques au niveau vasculaire (Horn et al., 2013; Jansen et al., 2013).

De plus, il a été observé que les MPs stimulent l'expression du facteur tissulaire sur la membrane des cellules endothéliales et favorisent les interactions entre l'endothélium et les leucocytes (Mesri et Altieri, 1999; Nomura et al., 2001). Plusieurs travaux ont suggéré que ces MPs jouaient un rôle dans le processus inflammatoire en promouvant la libération d'interleukines pro-inflammatoires et en étant, de par leur composition en phospholipides, de réels substrats nécessaires à la production d'acide lysophosphatique, agoniste plaquettaire et médiateur pro-inflammatoire (Lindemann et al., 2001).

Toutefois, selon certains auteurs, des MPs d'origine plaquettaire pourraient également avoir un rôle favorable dans le tonus vasculaire en transférant l'AA aux cellules endothéliales ce qui induirait la production et l'expression de COX2 par ces cellules et favoriserait donc une vasodilatation (Barry et al., 1999). De plus, un transfert de miRs par des vésicules membranaires a également été observé, notamment les miR-126 et le 143/145, tous deux ayant des effets bénéfiques sur la fonction vasculaire (Hergenreider et al., 2012; Zerneck et al., 2009).

## **V. L'exercice physique comme stratégie d'amélioration de la fonction endothéliale**

### **1. L'exercice physique : définition et caractéristiques**

Selon l’OMS, l’activité physique au sens large inclut « tout mouvement, produit par les muscles squelettiques, responsable d’une augmentation de la dépense énergétique » (« OMS | Activité physique » 2015). De nombreuses études montrent que l’activité physique est un très bon moyen pour prévenir la mortalité cardiovasculaire tant en prévention primaire, pour des sujets porteurs d’un ou plusieurs facteurs de risque, que secondaire, et qui concerne ceux qui ont déjà présenté un accident cardiovasculaire (Bassuk et Manson, 2005; Casillas et al., 2007; Pedersen et Saltin, 2006). Il existe également une prévention tout en amont qui concerne les individus sains, dont l’objectif est de prévenir l’installation de facteurs de risque cardiovasculaire. Toutefois, les avantages attendus de la pratique d’une activité physique dépendent fortement de la nature de cette activité. En effet, plusieurs facteurs entrent en jeu dans la détermination de l’activité physique tels que le type, l’intensité, la fréquence ou encore la durée de l’exercice physique (Vanhees et al., 2012).

L’exercice physique est généralement réparti en deux types : un travail en endurance, faisant intervenir la filière énergétique aérobie, ou un travail en résistance, faisant plutôt intervenir la filière anaérobie. L’intensité de l’exercice peut être évaluée selon plusieurs critères et peut être exprimée en termes d’intensité absolue ou relative. L’intensité absolue se réfère au taux d’énergie dépensée durant l’exercice et s’exprime généralement en kcal/min ou MET pour Metabolic Equivalent Task (1 MET correspond à la dépense énergétique de repos soit 3,5 ml/min par kg d’O<sub>2</sub>). L’intensité relative de l’exercice est exprimée par rapport à la puissance maximale, ou charge, maintenue durant l’exercice, correspondant généralement au pourcentage de la capacité maximale aérobie (VO<sub>2max</sub>). Par ailleurs, l’intensité de l’exercice peut également être exprimée en pourcentage de fréquence cardiaque maximale (FC<sub>max</sub>) ou de fréquence cardiaque de réserve (FCR) (Gremeaux et Bouillet, 2012; Vanhees et al., 2012). De plus, l’exercice

de type aérobie peut être effectué en continu ou en intervalle. Bien que la plupart des protocoles d'entraînement repose sur un entraînement aérobie continu et à intensité modérée, de nombreuses études soulignent également les avantages de l'exercice en intervalle. Un des principaux avantages de ce type d'entraînement est d'effectuer des périodes d'effort à forte intensité, permettant ainsi de bien stimuler le cœur (Tjønnna et al., 2008; Wisløff et al., 2007). Toutefois, comme ce type d'entraînement expose les sujets à des intensités d'effort proche de leur maximum, des intervalles de repos actif suffisamment longs sont donc à prévoir entre chaque intervalle d'effort (MacDonald et Currie, 2009). De plus, ce type d'exercice présente l'avantage d'être motivant au contraire de l'entraînement en continu, pour lequel les exercices sont longs et répétitifs (Tjønnna et al., 2008; Wisløff et al., 2007).

## **2. Effets bénéfiques de l'exercice physique**

### **2.1. Effets de l'exercice physique sur l'obésité**

Le niveau d'activité physique est un des déterminants majeurs de l'évolution de la composition corporelle. Des études effectuées sur des modèles de rats obèses ont permis d'observer que la pratique d'un exercice physique permet de diminuer la masse grasse viscérale, la pression artérielle, la résistance à l'insuline, et améliore le profil lipidique (Pinheiro et al., 2007; Touati et al., 2011). Des études épidémiologiques ont par ailleurs associé la réduction de l'activité physique à une augmentation de la prévalence de l'obésité chez l'adulte (Wing, 1999). De ce fait, l'exercice physique a été recommandé comme traitement contre l'obésité (Votruba et al., 2000). Chez les femmes obèses, la pratique hebdomadaire d'au moins 3h30 d'exercice d'endurance est associée à une diminution importante du risque d'évènements coronariens, par rapport à celles qui pratiquaient moins d'une heure d'activité physique (Li et al., 2006). Par ailleurs, selon Meyer et al. (Meyer et al., 2006), un programme d'exercice de 6 mois permet de

réduire le poids corporel et la pression artérielle et améliore les paramètres lipidiques (diminution des LDLc, des triglycérides et du ratio LDLc/HDLc) chez des jeunes obèses. Une diminution des facteurs de risque cardiovasculaire a également été rapportée chez des sujets en surpoids (Tjønnå et al., 2009).

## **2.2.Effets de l'exercice physique sur la fonction vasculaire**

Il est admis que l'exercice physique joue un rôle important au niveau du système vasculaire (Santos-Parker et al., 2014) tandis que la sédentarité est considérée comme un facteur de risque individuel important de maladies cardiovasculaires (Lakka et al., 1994). Laufs et al. ont, par ailleurs, démontré que l'inactivité physique était responsable d'une augmentation du stress oxydatif, d'une altération de la fonction endothéliale et du développement de l'athérosclérose (Laufs et al., 2005).

Plusieurs paramètres entrent en jeu afin de permettre d'ajuster l'activité physique en fonction des objectifs attendus. Toutefois, la fréquence, l'intensité, la durée ou encore le type d'exercice sont les principaux critères à prendre en compte dans le choix du programme d'entraînement (Duclos et al., 2010). Peu d'études ont été réalisées concernant les effets de ces paramètres sur l'amélioration de la fonction endothéliale. Il a cependant été observé que le type d'exercice le plus adapté pour stimuler la fonction endothéliale est l'entraînement en endurance, bien que certaines études aient rapporté une stimulation de la vasodilatation endothéliale dépendante grâce à un entraînement en résistance pas trop intense (De Filippis et al., 2006; DeSouza et al., 2000; Meyer et al., 2006).

### **2.2.1. Chez le sujet sain**

Des études expérimentales menées chez le rat ont pu mettre en évidence qu'un programme d'entraînement de 4 semaines entraînait une amélioration de la réponse

vasodilatatrice endothélium-dépendante, via une augmentation de la biosynthèse du NO endothélial dans les artérioles des muscles squelettiques (Sun et al., 1994). L'étude sur aorte isolée abdominale de rats a également permis d'observer une augmentation de la vasodilatation induite par l'ACh et une augmentation de la concentration intracellulaire de la eNOS dans la paroi aortique (Delp et Laughlin, 1997).

Les effets bénéfiques de l'exercice physique ont également pu être mis en évidence chez les sujets sains. Clarkson et al., qui se sont intéressés à l'effet d'un programme d'entraînement physique de 10 semaines, comprenant des exercices de type aérobie et anaérobie, chez des jeunes sujets sains normo-pondérés, ont pu démontrer une amélioration significative de leur fonction endothéliale (Clarkson et al., 1999). Ces effets n'ont toutefois pas pu être observés dans certains autres travaux.

### **2.2.2. Chez le sujet obèse**

Les bienfaits de l'exercice physique sur la fonction endothéliale ont largement été étudiés dans le cas des complications cardiovasculaires. La plupart des travaux s'accordent sur le fait que l'activité physique stimule la fonction endothéliale, prévient l'apparition d'un dysfonctionnement endothélial et permet la restauration de fonctions endothéliales dégradées (De Filippis et al., 2006; Okada et al., 2010; Pellegrin et al., 2009; Walther et al., 2004). Toutefois, les mécanismes exacts impliqués dans les bénéfices de l'exercice physique restent à ce jour encore non totalement élucidés.

Les bénéfices de l'exercice sur la dysfonction endothéliale associée à l'obésité ont bien été étudiés sur le plan expérimental et clinique. Des études ont en effet permis de démontrer que l'exercice physique restaure la vasodilatation endothélium-dépendante et diminue le stress oxydant chez des souris obèses (Moien-Afshari et al., 2008). Une

amélioration du profil inflammatoire et oxydatif a également été rapportée chez des rats obèses suite à 12 semaines d'exercice (Touati et al., 2015).

Par ailleurs, de nombreuses études indiquent qu'un exercice régulier de moyenne (8 semaines) ou de longue durée (6 mois) corrige la fonction endothéliale chez les sujets obèses (Meyer et al., 2006; Watts et al., 2004). Les effets bénéfiques de l'exercice physique sur la fonction endothéliale ont également été rapportés chez les adolescents (Woo et al., 2004) et les enfants obèses (Watts et al., 2004). De plus, les mêmes résultats sont observés, que l'exercice soit combiné ou non à un régime hypocalorique (Sciacqua et al., 2003; Woo et al., 2004).

### **2.2.3. Mécanismes moléculaires impliqués**

Plusieurs études ont mis en évidence le rôle de l'entraînement dans l'amélioration de la vasodilatation endothélium-dépendante notamment en favorisant l'expression de facteurs intervenant dans la production du NO (Dimmeler et al., 1999; Green et al., 2004; Pellegrin et al., 2009) (Dimmeler et Zeiher, 2003; Green et al., 2004). Les mécanismes moléculaires précis entrant en jeu sont encore méconnus mais plusieurs travaux semblent démontrer que l'exercice activerait la voie eNOS/NO soit en augmentant la production de NO, soit en diminuant l'inactivation de ce NO.

Dans le premier cas, l'exercice physique, via l'élévation des forces de cisaillement, stimulerait les facteurs transcriptionnels, traductionnels et post-traductionnels impliqués dans la régulation du gène codant pour la eNOS (Pellegrin et al., 2009). Hambrecht et al. ont en effet relevé une expression de l'ARNm de la eNOS augmentée de 96% chez des patients coronariens entraînés pendant 4 semaines par rapport aux patients restés sédentaires (Hambrecht et al., 2003). Par ailleurs, l'augmentation de la production du NO peut également être due à la phosphorylation de

la eNOS, via la voie signalétique de l'Akt, qui représente un mécanisme clé de son activation en réponse aux forces de cisaillement (Hambrecht et al., 2003).

Dans le second cas, la diminution de l'inactivation du NO peut être due à une diminution des ERO. En effet, dans l'obésité, comme dans les pathologies cardiométaboliques, l'exercice physique améliore l'équilibre redox et donc la biodisponibilité du NO. Ceci peut être obtenu grâce à une stimulation des enzymes antioxydantes (catalase, SOD) comme cela a été observé par des études expérimentales chez la souris diabétique (Moien-Afshari et al., 2008) et le rat obèse (Touati et al., 2015) exercés, ou encore chez l'homme après un entraînement de 6 mois (Gordon et al., 2008). Par ailleurs, une diminution des enzymes pro-oxydantes peut également contribuer à maintenir la biodisponibilité du NO. Dans ce sens, des études ont pu mettre en évidence une diminution de l'expression des sous unités NOX2 et p47 de la NADPH oxydase induisant une baisse du  $O_2^-$  pour des cellules HUVEC exposées à des forces de cisaillement (Duerschmidt et al., 2006). De même, Touati et al. ont pu observer une diminution de l'activité de la NADPH oxydase chez le rat obèse suite à un programme d'exercice physique de 12 semaines (Touati et al., 2015). L'expression de la sous unité NOX2 était également diminuée après un programme d'exercice physique de type aérobie chez l'animal hypertendu (6 semaines d'entraînement) (Graham et Rush, 2004), et chez les sujets coronariens (4 semaines d'entraînement) (Adams et al., 2005).

Il est également intéressant de noter que l'amélioration par l'exercice de la vasorelaxation-endothélium-dépendante ne concerne pas seulement les membres sollicités par l'exercice physique. En effet, des études ont démontré une amélioration de la vasorelaxation-endothélium-dépendante au niveau du bras après des programmes courts de réentraînement sollicitant majoritairement les membres inférieurs (DeSouza

et al., 2000; Goto et al., 2003). Ces adaptations vasculaires systémiques seraient en fait le résultat de la stimulation chronique de la fonction endothéliale.

### **2.3.Effets de l'exercice physique sur les microparticules circulantes**

Très peu d'études se sont intéressées aux variations des MPs circulantes en réponse à un programme d'exercice physique. Par ailleurs, les seules études portent, non pas sur la totalité des MPs circulantes, mais seulement sur les MPs d'origine endothéliale. Babbit et al. (2013) ont pu observer une diminution du taux de MPs endothéliales suite à un programme de 6 mois d'entraînement en aérobic chez un groupe de sujets sédentaires d'âge moyen ou âgés. Une diminution du statut inflammatoire et une amélioration de la fonction endothéliale ont également été constatées suite au programme d'entraînement. Une deuxième étude qui s'est intéressée à l'effet d'un exercice de forte intensité a également pu observer une diminution des MPs endothéliales circulantes chez une population de jeunes sportifs (Wahl et al., 2014). De façon intéressante, Boyle et al. (2013) ont démontré que l'inactivité physique induisait quant à elle une augmentation du taux de MPs endothéliales.

Des études récentes ont également pu montrer que l'expression des miRs plasmatiques pouvaient également être modulées suite à un programme d'entraînement physique. Toutefois, cette modulation dépend fortement des caractéristiques de l'entraînement effectué. En effet, Wardle et al. (2015) ont pu observer chez un groupe d'athlètes que plusieurs miR circulants (miR-222, miR-21, miR-146a, miR-221) présentaient un taux d'expression augmenté suite à un programme d'entraînement en endurance tandis que le groupe ayant effectué un entraînement en résistance avait une augmentation moins marquée de l'expression de ces mêmes miR. Ceci suggérerait que

ces miR pourraient être des biomarqueurs d'intérêt en réponse à un type d'entraînement particulier voire même jouer un rôle dans les adaptations spécifiques au type d'entraînement. Dans le même sens, Mooren et al. (2014) ont pu observer que certains miR, retrouvés spécifiquement dans le cœur et le muscle, pouvaient jouer un rôle potentiel dans les processus d'adaptation cardiovasculaire suite à un entraînement en endurance.

## **- Objectifs -**

Les MPs circulantes sont considérées comme de bons biomarqueurs de l'intégrité vasculaire et qui seraient également impliquées dans de nombreux mécanismes au niveau vasculaire et notamment dans la dysfonction endothéliale. Toutefois, les études permettant de décrire les rôles et les modes d'action précis de ces MPs *in vivo* restent encore insuffisantes. Nous nous sommes donc proposé dans le cadre de cette thèse de nous intéresser aux rôles que pourraient jouer les MPs circulantes au niveau vasculaire, dans un contexte pathologique (obésité) mais également dans un cadre stimulant favorablement les fonctions vasculaires (exercice physique). Pour cela, nous nous sommes intéressés dans un premier temps à l'étude de l'intégrité vasculaire au sein d'une population de sujets obèses. L'obésité, représentant un problème de santé majeur notamment dans les régions méditerranéennes, est en effet considérée comme un terrain favorable pour la survenue d'altérations vasculaires. Un premier volet a donc été consacré à l'étude des différents marqueurs de la santé vasculaire (stress oxydant, inflammation, vasoréactivité...) au sein d'une population de sujets obèses.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés aux MPs circulantes chez ces sujets obèses. Le but de nos travaux pour cette partie a été de tenter de comprendre le rôle que pourraient jouer ces MPs, d'une part, en tant qu'indicateurs de l'intégrité vasculaire, et d'autre part en tant que potentiel acteur dans l'altération de la fonction endothéliale *in vivo* dans le cadre de l'obésité. Dans ce sens, une exploration du contenu des MPs, notamment pour les principales protéines impliquées dans la fonction endothéliale, ainsi qu'une étude fonctionnelle *ex vivo* du rôle des MPs sur la réactivité vasculaire ont été effectuées.

En plus d'étudier les MPs dans un contexte pathologique, nous avons également voulu comprendre les différentes variations qui pouvaient survenir dans un cadre stimulant favorablement le milieu vasculaire. De ce fait, nous nous sommes donc

intéressés dans un troisième volet de la thèse aux effets d'un programme d'exercice physique chronique sur une population de sujets en surpoids/obèses mais également sur une population normo-pondérée (sans aucun facteur de risque cardiovasculaire) Nous nous sommes plus particulièrement intéressés dans cette partie à l'étude du contenu des MPs en miRs impliqués dans différents processus inflammatoires au niveau vasculaire.

# **- Méthodologie générale -**

## **Préambule**

L'ensemble de ce travail a été réalisé, d'une part, au sein de l'unité de recherche UR12ES06, Physiologie de l'exercice et Physiopathologie : de l'intégré au moléculaire « Biologie, Médecine et Santé » à Sousse et d'autre part, au laboratoire de Pharmacologie Cardiovasculaire EA 4278 de l'université d'Avignon et des Pays de Vaucluse. Une partie des expérimentations a également été réalisée au sein de l'UMR INRA1260/INSERM1962, Nutrition Obésité et Risque Thrombotique à la faculté de médecine de Marseille. Toutes ces études ont été menées sur les sujets recrutés au CHU de Sousse (Tunisie) dont le protocole a été approuvé par le comité éthique du CHU de Sousse. Tous les sujets ont été informés au préalable des différentes analyses et ont signé un accord approuvant leur participation à l'étude. Les expériences sur les animaux ont été réalisées en conformité avec les directives du ministère français de l'agriculture et les conventions européennes d'utilisation et de conditionnement des animaux de laboratoire.

# **I. Populations**

## **1. Etude 1 : Etude de l'intégrité de la fonction vasculaire au sein d'une population de sujets obèses**

La première étude a été réalisée sur une population composée de 394 sujets qui ont été regroupés en fonction de leur IMC en deux groupes : le groupe « obèses » ( $IMC \geq 30\text{kg/m}^2$ ,  $n=183$ ) et le groupe « contrôle » composé de sujets normo-pondérés ( $IMC < 25\text{kg/m}^2$ ,  $n=211$ ). Les deux groupes étaient appariés en sexe et en âge. Tous les sujets ont bénéficié d'une évaluation médicale complète.

## **2. Etude 2 : La dysfonction endothéliale chez les sujets obèses : Implication des MPs circulantes ?**

Parmi la population initiale 115 sujets ont été recrutés. Les sujets contrôles ont été recrutés de manière randomisée. Les critères d'exclusion étaient : 1) antécédents d'hypertension, de traitement antihypertenseur ou pression artérielle élevée au repos (pression systolique (PAS)  $\geq 140$  mmHg et/ou pression diastolique (PAD)  $\geq 90$  mmHg); 2) antécédents de diabète type 2 ou glycémie à jeun  $> 7\text{mmol}^{-1}$ ; 3) antécédents de maladies cardiovasculaires ; 4) hyperlipidémie (cholestérol total  $> 6.7$   $\text{mmol}^{-1}$  et/ ou triglycérides  $> 4.5$   $\text{mmol}^{-1}$ ); 5) tabagisme ; 6) consommation de médicaments vasodilatateurs ou supplémentation en antioxydants au cours des six derniers mois. De ce fait, la population de sujets obèses recrutés ne présentait aucun facteur de risque cardiovasculaire, autre que l'obésité.

## **3. Etude 3 : Effet de l'exercice physique sur le contenu en miRs des MPs circulantes chez les sujets sains**

Pour cette troisième étude, un groupe de sujets sains normo-pondérés (n=6), de sexe féminin et d'âge compris entre 20 et 29 ans, a été recruté pour participer à un programme d'entraînement sportif durant 8 semaines. En plus des critères d'exclusion précédemment cités dans l'étude 2, ces sujets ont été sélectionnés en fonction de l'absence de contre-indications à la pratique d'une activité physique (articulaire, cardiaque ou autre) et de leur degré de motivation pour l'adhésion au programme d'entraînement.

#### **4. Etude 4 : Effet de l'exercice physique sur une population de jeunes femmes obèses**

Un groupe de sujets en surpoids ou obèses (n=9), de sexe féminin et d'âge compris entre 20 et 29 ans, a été sélectionné afin de participer à un programme d'entraînement sportif durant 8 semaines. Les sujets ont été sélectionnés selon les mêmes critères d'exclusion que l'étude III. Un groupe de jeunes filles normo-pondérées (n=6), appariées en âge a servi de groupe témoin.

## **II. Méthodologie**

### **1. Mesures anthropométriques et biologiques**

L'IMC a été calculé en divisant le poids par la taille au carré ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ). Le tour de taille (TT) et le tour de hanches (TH) ont également été mesurés (au centimètre près), et le rapport RTH a été obtenu par le rapport TT/TH. La mesure de la pression artérielle a été effectuée sur le bras gauche avec un sphygmomanomètre dans les conditions standards, après 5min de repos, en position couchée. La valeur enregistrée a été la moyenne de 3 mesures répétées.

Un prélèvement sanguin veineux a été réalisé le matin après une période de 12h de jeûne. Le dosage plasmatique de la glycémie, du cholestérol total et des triglycérides ont été mesurés sur automate par méthode enzymatique à l'aide de la glucose oxydase (Biomaghreb, Tunisie), cholestérol oxydase (Elitech Diagnostic, Tunisie) et glycérol oxydase (Elitech Diagnostic, France) respectivement. Les HDLc plasmatiques (High-density-lipoprotein cholesterol) ont été mesurés par méthode directe utilisant le réactif de Beckman (Beckman Fullerton, USA). Les LDLc plasmatiques ont été calculés suivant la formule de Friedward (Friedewald, Levy, and Fredrickson 1972). Les apolipoprotéines (ApoA1 et ApoB) et la protéine réactive C ultra-sensible (CRP<sub>us</sub>) plasmatiques ont été déterminées par kit (BNII Dade Behring, Marburg, Allemagne).

## **2. Exploration de la fonction endothéliale**

Afin d'évaluer la fonction endothéliale, nous avons utilisé la technique de débitmétrie laser doppler couplée à l'iontophorèse. Cette technique consiste à évaluer la capacité vasodilatatrice endothélium-dépendante et non-endothélium dépendante au niveau de la microcirculation de l'avant-bras. Le sujet à jeun était maintenu en position allongée dans une pièce à température constante (25°C). L'expérimentation débutait après une période de 15 min d'acclimatation. Deux électrodes étaient installées au niveau de l'avant-bras du sujet et qui permettront, d'une part de mesurer en continu les variations du débit sanguin des microvaisseaux à l'aide d'un faisceau laser monochromatique, et d'autre part, de mesurer la réponse vasodilatatrice de ces vaisseaux en réponse à des stimuli impliquant, ou non, la voie endothélium-dépendante. Le protocole commençait par un enregistrement initial des données basales sans stimulation pendant 2min (Figure 14). La température cutanée était maintenue à 32°C

durant cette étape de l'enregistrement. Les données récoltées ont été traités par un logiciel d'acquisition (Perisoft data acquisition software).

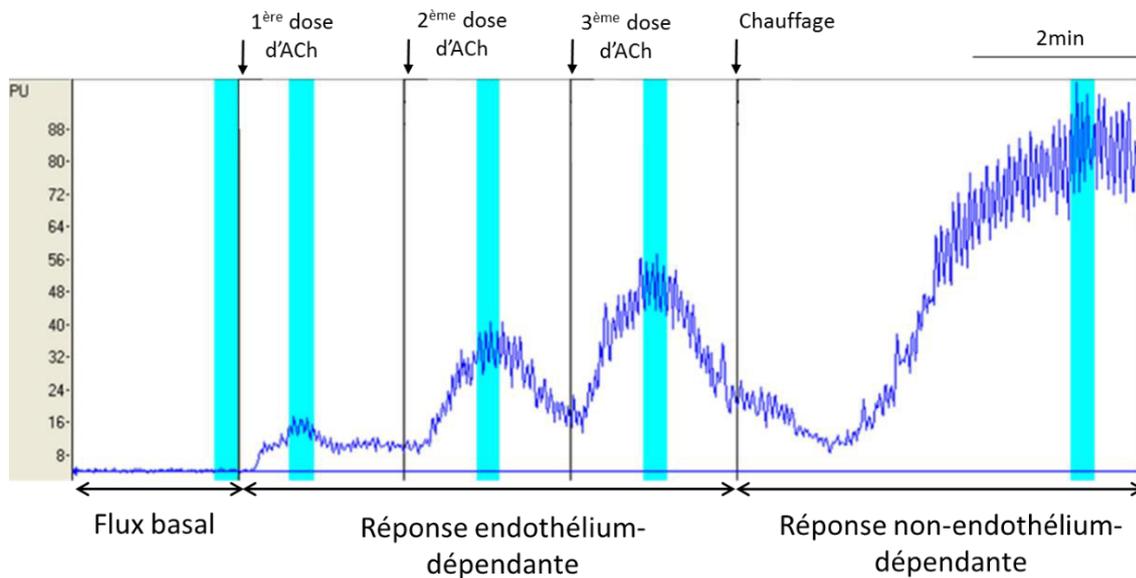
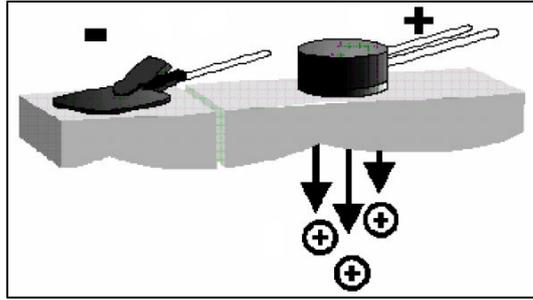


Figure 14 : Protocole d'exploration de la fonction endothéliale par débitmétrie laser doppler couplée à l'iontophorèse

### 2.1. Etude de la vasodilatation endothélium-dépendante en réponse à l'acétylcholine

La fonction endothéliale est évaluée par la mesure de la réponse vasodilatatrice des microvaisseaux en réponse à de l'acétylcholine (ACh) (Sigma Aldrich, Suède), un vasodilatateur médié par un récepteur endothélium-dépendant (Furchgott et Zawadzki, 1980). La débitmétrie laser doppler a été couplée à la technique d'iontophorèse grâce à laquelle un courant électrique est utilisé pour faciliter la pénétration cutanée de l'ACh (Mourad et al., 2007) (Figure 15). La substance était délivrée à l'aide d'une électrode, contenant 80µl d'ACh 2%, reliée à une sonde laser (Probe 383, Perimed, Jarfalla, Suède) au niveau de l'avant-bras du sujet et reliée à une batterie permettant de réguler le courant électrique (PF 382, Perimed, Jarfalla, Suède).



*Figure 15 : Couplage laser doppler-iontophorèse au niveau anodal. L'ACh chargé positivement est diffusé à travers la peau au niveau de l'anode (+). La cathode (-) est fixée sur un patch de référence placé à distance. La sonde laser doppler est placée sur l'anode*

Suite à l'enregistrement du flux basal, trois doses successives d'ACh étaient délivrées à l'aide d'un courant anodal de 0,1mA pendant 10s pour chaque dose et avec un intervalle de 2min entre chaque dose (Figure 14). La mesure maximale du flux cutanée en réponse à la troisième dose d'ACh a été considérée comme étant la réponse endothélium-dépendante.

## ***2.2. Etude de la vasodilatation endothélium-indépendante en réponse à la chaleur***

La vasodilatation endothélium-indépendante a été explorée en réponse à une stimulation locale à la chaleur (Mourad et al., 2007; van Sloten et al., 2014). Une sonde laser doppler intégrée (Probe 457, Perimed, Jarfalla, Suède) avec un dispositif de chauffage local a été utilisée afin d'augmenter la température jusqu'à 44°C durant 5min (Figure 14). La réponse vasodilatatrice obtenue, ne faisant pas intervenir l'endothélium, est considérée comme réponse endothélium-indépendante.

## ***2.3. Analyse des résultats obtenus par débitmétrie laser doppler couplée à l'iontophorèse***

Durant ce protocole, trois principales données sont mesurées : le flux basal sans stimulation, la réponse vasodilatatrice endothélium-dépendante (en réponse à l'ACh), et endothélium-indépendante (en réponse à la chaleur), et les résultats obtenus sont donnés

en notion de flux cutané. Toutefois, afin de prendre en compte les variations de pression artérielle de chaque sujet, qui peuvent influencer le flux cutané, les données sont données en terme de conductance vasculaire cutanée (CVC) qui représente la valeur du flux cutané divisé par la pression artérielle moyenne de chaque sujet (O'Leary, 1991).

### **3. Mesure des marqueurs du stress oxydant**

#### ***3.1. Dosage des nitrites***

L'estimation du NO a été effectuée par mesure du taux plasmatique de nitrites qui sont considérés comme des produits stables du métabolisme du NO. Cette méthode repose sur la formation d'un complexe coloré par réaction de diazotation entre l'ion nitrite, une amine primaire aromatique, la sulfanilamide, et une autre amine aromatique, le naphthalène-éthylénédiamine dihydrochloride (NED). Le dosage a été effectué suivant la méthode de Griess (Hortelano et al., 1995). Le plasma est initialement centrifugé en présence de 30µl de ZnSO<sub>4</sub> à 50%. Puis, le surnageant a été récupéré et traité avec du sulfanilamide (1%) en milieu acide afin de former un composé diazoïque (sel de diazonium) qui réagit avec le NED (0.1%). Le produit final obtenu est un composé rosé dont l'absorbance a été mesurée par spectrophotométrie à 540nm.

#### ***3.2. Mesure de la peroxydation lipidique par dosage des TBARS***

Le taux de peroxydation lipidique a été évalué par la mesure des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (Thiobarbituris Acide Reactive Substances, TBARS) selon la méthode Richard et al. (Richard et al., 1992). En milieu acide et à forte température (95-100°C), les composés carbonylés issus de la lipoperoxydation réagissent avec l'acide thiobarbiturique (TBA) pour donner des chromophores de couleur rose absorbant à 532nm. 200µl de plasma ont été centrifugés avec 200µl d'acide trichloroacétique (TCA) 30% pendant 10min à 3500g. 200µL de surnageant sont par la

suite récupérés et portés à ébullition 10min en présence de 800µl de 0.4% de TBA. La réaction a ensuite été stoppée avec de la glace et l'absorbance a été mesurée à 532nm. La concentration des TBARS a été déterminée en utilisant le coefficient d'extinction moléculaire du MDA ( $1.56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ) et le résultat a été exprimé en nmol/ml.

### ***3.3. Mesure de l'oxydation des protéines***

L'oxydation avancée des protéines est révélée par la formation de liaisons covalentes entre les résidus tyrosine aboutissant à la formation de dityrosine et à des produits d'agrégation de haut poids moléculaire (Advanced Oxidation Protein Products, AOPP). La méthode de Witko-Sarsat (Witko-Sarsat et al., 1996) a été utilisée, où, en présence d'iodide de potassium (KI) et en condition acide, l'absorbance de ces AOPP peut être mesurée par spectrophotométrie à 340nm. Les échantillons plasmatiques (200µl) dilués avec du PBS 1:5, ont ensuite été traités avec 10µl KI (1.16M) et 20µl d'acide acétique pur. Après vortexage, l'absorbance a été mesurée à 340nm. La chloramineT a été utilisée en tant que gamme standard pour la mesure et les résultats ont été exprimés en nmol/ml.

### ***3.4. Mesure du glutathion réduit (GSH)***

Le glutathion réduit, un antioxydant non enzymatique participant à la protection contre les radicaux libres, a été mesuré par spectrophotométrie (Jollow et al., 1974). Les prélèvements de plasma (50µl) ont initialement été déprotéinisés à l'aide de 50µl d'acide sulfosalicylique à 4%. Le surnageant récupéré après centrifugation a ensuite été traité avec 10µl d'acide 5-5'dithiobis (2-nitrobenzoïque (DTNB) et l'absorbance a été lue à 412nm. Les résultats ont été exprimés en nmol/ml.

## **4. Dosage des marqueurs inflammatoires**

L'étude des marqueurs inflammatoires a été effectuée sur des échantillons de sérum en utilisant la technique immunoenzymatique de dosage d'immunoabsorption par enzyme lié ELISA pour *Enzyme-Labeled Immuno Sorbent Assay*. Les kits suivants ont été utilisés pour la dosage des différents marqueurs inflammatoires selon les recommandations du fournisseur : IL-6 (Kit Ebiosciences –High sensitivity ELISA-Ref BMS213HS), leptine (BioVendor-Human Leptin ELISA-Ref RD191001100), adiponectine (R&D-Human total adiponectin-Ref DRP300), TNF $\alpha$  (R&D-Human TNF $\alpha$ -Ref HSTA00D), MCP-1 (Diaclone-Human MCP-1 ELISA kit-Ref 873030096) et chémerine (R&D-Human chemerin-Ref DCHM00).

## **5. Etude des microparticules circulantes**

### ***5.1. Récupération des MPs***

Les échantillons plasmatiques sont récupérés dans des tubes CTAD (Citrate, Theophylline, Adenosine, Dipyridamole) et centrifugés à 1500g pendant 15min dans les 2h suivant le prélèvement. Le culot contenant les globules rouges et blancs est éliminé et le surnageant, plasma enrichi en plaquettes (platelet-rich plasma, PRP), est ensuite récupéré. Ce dernier est recentrifugé à 13000g pendant 2min afin d'éliminer les plaquettes qui précipiteront au niveau du culot. Le surnageant, plasma pauvre en plaquettes (Platelet-free plasma, PFP), est soigneusement récupéré puis aliquoté et conservé à -80°C jusqu'à utilisation. Le culot de MPs est obtenu grâce à une ultracentrifugation pendant 90min à 20000g ce qui permet d'isoler les MPs des constituants plasmatiques.

### ***5.2. Quantification des MPs par cytométrie en flux***

La quantification des MPs plasmatiques a été effectuée à l'aide d'un cytomètre en flux Accuri C6 (Accuri Cytometers, Ann Arbor, MI). Parmi ses nombreuses

utilisations, cette technique permet une caractérisation quantitative de particules en suspension dans un liquide. Le principe de cette caractérisation consiste à analyser les signaux optiques ou physiques émis par une particule coupant le faisceau lumineux d'un laser. Les signaux mesurés sont essentiellement relatifs aux propriétés optiques intrinsèques des particules qui correspondent aux phénomènes de diffusion lumineuse liés aux dimensions de la particule et à leur structure interne. L'analyse par cytométrie en flux est effectuée sur culot de MPs resuspendu dans une solution saline (phosphate-buffered saline, PBS) filtrée et la quantification est effectuée en fonction de la taille et de la granulosité, au niveau d'une fenêtre de détection de taille comprise entre 0,1 et 1,1µm à l'aide de microbilles de calibration de tailles standards permettant de définir la fenêtre de détection des MPs (Tual-Chalot et al., 2012).

### ***5.3. Etude de l'effet des MPs sur la réactivité vasculaire d'anneaux d'aorte de rat en chambre d'organe isolé ex vivo***

Pour l'étude en chambre d'organe isolé, l'aorte est prélevée soigneusement à partir de rats Wistar, nettoyée et coupée en segments de 2-3mm de largeur. Les anneaux sont incubés dans une solution de DMEM et de Krebs-Hepes (NaCl 117mM, KCl 74.5mM, NaHCO<sub>3</sub> 84mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5mM, MgCl<sub>2</sub> 1.7mM, Hepes 21mM, Glucose 11.1mM) (1:1) contenant, ou non, des MPs en concentration équivalente aux concentrations plasmatiques préalablement déterminées chez les sujets obèses ou contrôles. L'incubation est effectuée, sous agitation à température ambiante, pendant 5h. Des expérimentations antérieures ont permis de déterminer les conditions optimales (temps et milieu d'incubation) permettant, d'une part, d'éviter l'altération des anneaux suite à une longue incubation, et d'autre part, de permettre une incubation assez longue pour permettre d'observer les effets des MPs *ex vivo*. Par la suite, les anneaux sont soigneusement montés en chambre d'organe isolé. Brièvement, chaque anneau est

monté entre deux crochets permettant d'étudier les variations de tension. Chaque anneau est placée dans une chambre contenant du liquide de Krebs à 37°C et oxygénée (Figure 16).

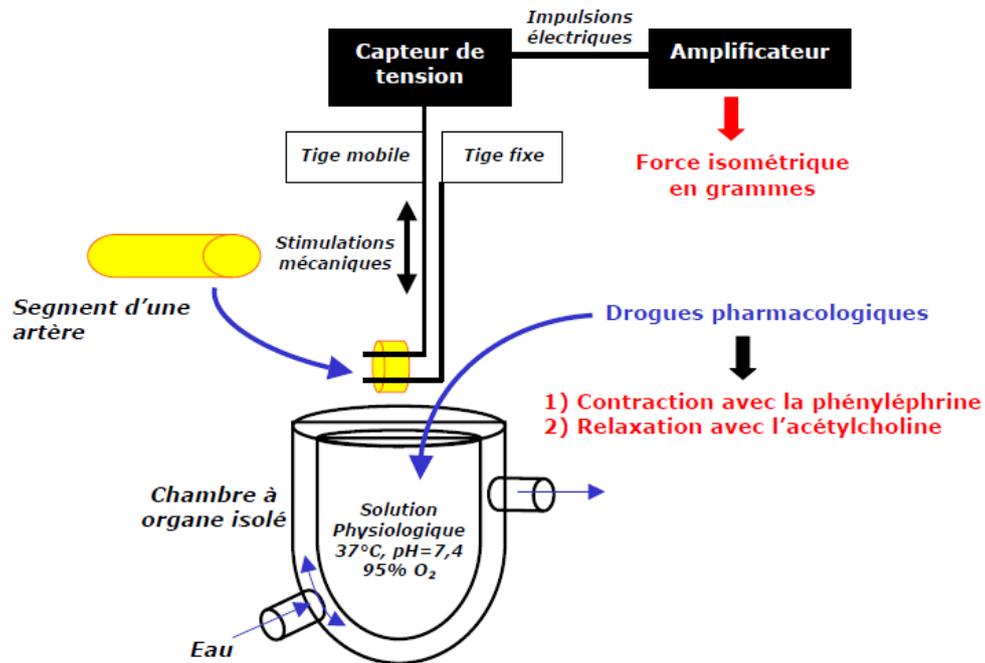


Figure 16: Principe de l'exploration ex vivo de la fonction endothéliale sur des anneaux d'aorte en chambre à organe isolé

Après équilibration à 2g mimant les conditions de tension *in vivo*, les capacités vasodilatatrices de chaque anneau sont étudiées, après contraction préalable à la phényléphrine (PE) (agoniste alpha 1 adrénergique de la cellule musculaire), à l'aide de doses de concentrations croissantes d'ACh ( $3 \cdot 10^{-9}$  à  $10^{-4}$  M) et de nitropusside de sodium (SNP,  $10^{-5}$  M) (Figure 17).

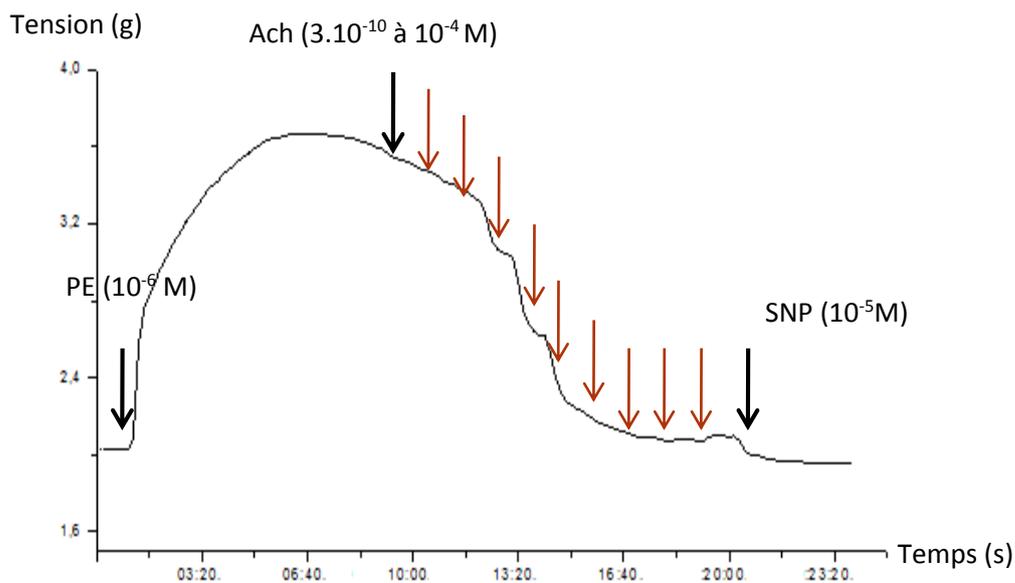


Figure 17 : Protocole de mesure de la réactivité vasculaire des anneaux d'aorte de rat suite à des stimuli chimiques (PE, Ach en concentrations croissantes puis SNP)

#### 5.4. Analyse de l'expression protéique dans les MPs par technique de Western Blot

##### 5.4.1. Préparation des échantillons de MPs

Le culot de MPs est resuspendu dans un tampon de lyse (TRIS 25mM pH=7.6, NaCl 150mM, Triton x100 1%, inhibiteur de phosphatases (NaOV; Fisher Scientific), inhibiteurs de protéases (Protease inhibitor cocktail; Sigma Aldrich).

##### 5.4.2. Dosage des protéines contenues dans les MPs

La concentration protéique pour chaque échantillon est analysée grâce à un kit de dosage de BCA (bicinchonidic acid) (Pierce BCA Protein Assay kit, ThermoScientific) qui permet une détection colorimétrique et la quantification des protéines totales contenues dans les échantillons extraits de MPs. Le principe de ce dosage repose sur l'évaluation de la réduction du Cu<sup>+2</sup> en Cu<sup>+</sup> par les protéines en milieu alcalin. Le réactif BCA, qui réagit avec le Cu<sup>+</sup> formé, permet la formation d'un

complexe coloré avec un pic d'absorbance à 562nm. La gamme étalon est obtenue à l'aide de concentrations protéiques connues de sérum albumine bovine (BSA).

### **5.4.3. Western immunoblotting**

L'expression protéique dans les MPs est déterminée par Western Blot. Des extraits protéiques de MPs (100µg) sont dilués avec du tampon LAEMMLI (SDS 4%, glycérol 20%, β-mercapthoéthanol, TRIS 0,125M, bleu de bromophénol). Les échantillons sont par la suite placés dans un gel SDS et la migration est effectuée en fonction du poids moléculaire des protéines. Dans un second temps, les protéines sont transférées sur une membrane PVDF et mises en incubation en présence des anticorps spécifiques des protéines à étudier, i.e. anticorps monoclonal anti-eNOS (1 :300 ; BD Biosciences), anti-eNOS-P<sup>Ser1177</sup> (1 :200 ; BD Biosciences), anticorps polyclonal anti-gp91-phox (Sanra Cruz Biotechnology), anti-p47-phox (1 :200 ; Santa Cruz Biotechnology), anti-NOX4 (1 :200 ; Santa Cruz Biotechnology) et anti-αβ tubuline (1 :300 ; BD Biosciences). L'immunodétection a été effectuée par un réactif luminescent ECL (Super Signal West Pico Chemiluminescence Substrate, Thermo Scientific) ou ECL Plus (Luminata Forte Western HRP substrate, Millipore Corporation) et les membranes ont été par la suite exposées à des films à X-ray pour permettre la visualisation du signal. Enfin, l'analyse de ces films a été réalisée à l'aide du logiciel ImageJ (ImageJ, NIH, USA). Les quantités de protéines évaluées ont été exprimées en fonction de la quantité de αβ tubuline dans l'échantillon.

### **5.5. Quantification des miR par RT-PCR quantitative**

Nous avons choisi d'étudier 9 miRs dans les MPs des sujets obèses et normo-pondérés. Ces miRs ont été rapportés dans la littérature comme étant impliqués dans de nombreux mécanismes inflammatoires (Baggish et al., 2011; Schroen et Heymans,

2012; Taganov et al., 2006; Xu et al., 2015). Par ailleurs, L'équipe de Landrier et al. a pu observer que les miR-146a, miR-150 et miR-155 étaient induits en conditions inflammatoires dans des adipocytes humains (sur un total de 84 miRs quantifiés) (Kerkeni et al. données non publiées). Les miR-124a, miR-302a et miR-320a étaient également impliqués dans l'inflammation chez des sujets obèses (Kerkeni et al. données non publiées).

Les miRs contenus dans les MPs ont été analysés à l'aide du kit miRNeasy Micro Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). Le principe de ce kit repose sur la récupération des miR grâce à une solution contenant du phénol et de la guanidyl thiocyanate dont le rôle est de faciliter la lyse des membranes cellulaires, d'inhiber les ARNases et d'éliminer l'ADN et les protéines du lysat par extraction organique. Une solution de lyse Qiazol Lysis Reagent (700µl) a été ajoutée à 150µl de PFP et les ARN totaux ont ainsi été récupérés. Le miR-39 (Qiagen, Courtaboeuf, France), retrouvé habituellement que dans l'espèce *C. elegans*, a été ajouté à chaque échantillon (3.5µl,  $1.6 \times 10^8$  copies/µl) et a servi de contrôle interne (Livak et Schmittgen, 2001).

L'ADN complémentaire (ADNc), a par la suite été synthétisé à partir de 75ng d'ARNs totaux, auquel ont été ajoutés 20µl d'une solution tampon miScript Hiflex 5X, un mix de dNTP 10X et de la reverse transcriptase miScript (Qiagen, Courtaboeuf, France). L'analyse par RT-PCR en temps réel est effectuée à l'aide d'un thermocycleur Mx3005P Real-Time PCR System (Stratagene, La Jolla, CA, USA) (Landrier et al., 2008). Les réactions ont été effectuées dans un volume réactionnel de 12.5 µl contenant 6.25µl de la solution 2X QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen, Courtaboeuf, France), 1.25µl de primers universels miScript Primer Assay (Hs\_miR-21\_2 miScript Primer Assay, Hs\_miR-124a\_1 miScript Primer Assay, Hs\_miR-126\*\_1 miScript Primer Assay, Hs\_miR-146a\_1 miScript Primer Assay, Hs\_miR-150\_1

miScript Primer Assay, Hs\_miR-155\_2 miScript Primer Assay, Hs\_miR-223\_1 miScript Primer Assay, Hs\_miR-302a\_2 miScript Primer Assay, Hs\_miR-320a\_1 miScript Primer Assay, Ce\_miR-39\_1 miScript Primer Assay) (Qiagen, Courtabœuf, France) et 2.5µl d'eau ARN-free. La RT-PCR a consisté en une étape initiale d'incubation de 15min à 95°C suivie d'une étape d'amplification consistant en 40 cycles comprenant 3 étapes (15s à 94°C, 30s à 55°C et 30s à 70°C). Pour chaque expression, l'amplification a été effectuée en duplicata et l'expression du miR-39 a été utilisée pour normaliser le taux d'expression des miR contenus dans les échantillons (Livak et Schmittgen, 2001).

## **6. Programme d'activité physique**

### ***6.1. Détermination de la fréquence cible d'entraînement***

Avant le déroulement du protocole d'entraînement, nous avons déterminé la  $FC_{max}$  de chaque sujet lors d'un test Luc Leger, ou test navette, qui consiste à courir le plus longtemps possible entre deux lignes espacées de 20m en respectant un rythme de course par paliers qui s'accélère de 0,5km/h toutes les minutes. Le test était arrêté dès que le sujet n'arrive plus à terminer le palier et la fréquence cardiaque, qui correspond à la  $FC_{max}$ , était alors mesurée (Léger et Lambert, 1982).

Par la suite, la fréquence cardiaque cible ( $FC_{cible}$ ) d'entraînement a été déterminée pour chaque sujet grâce à la formule de Karvonen. Cette formule utilise la notion de fréquence cardiaque de réserve ( $FCR = FC_{max} - FC_{repos}$ ) ce qui permet d'exprimer plus valablement l'intensité de l'effort que la  $FC_{max}$  seule (Karvonen, 1957) :

$$FC_{effort} = FC_{repos} + \% FC_{réserve} = FC_{repos} + \% (FC_{max} - FC_{repos})$$

Le protocole d'entraînement a été effectué à un pourcentage de  $FC_{\text{réserve}}$  de 70%, pour les premières séances, jusqu'à atteindre 80%  $FC_{\text{réserve}}$ . Selon Vanhees et al. (Vanhees et al., 2012), ces pourcentages correspondent à une zone de forte intensité d'entraînement. Nous avons opté pour un programme d'entraînement aérobic de type intermittent et à forte intensité qui, selon plusieurs études, permet de stimuler le métabolisme des muscles squelettiques et la régulation cardiovasculaire (Gibala et McGee, 2008). De plus, ce type d'entraînement a notamment permis une diminution de facteurs de risques cardiovasculaires chez des adolescents en surpoids (Tjønnå et al., 2009).

## ***6.2. Déroulement de la séance d'entraînement***

Le programme d'entraînement a été effectué à raison de 3 séances/semaine pendant 8 semaines. Une même durée d'entraînement avait déjà permis d'observer une amélioration de la fonction endothéliale chez des sujets obèses (De Filippis et al., 2006). Pendant chaque séance, la fréquence cardiaque de chaque sujet a été monitorée à l'aide d'un cardiofréquencemètre (Polar-NV-Finland) et l'intensité de l'exercice a été ajustée pour correspondre à la  $FC_{\text{effort}}$  obtenue avec la formule de Karvonen. Chaque séance de réentraînement a duré 80 minutes et a été décomposée en 15 minutes d'échauffement, 45 minutes d'exercice physique et 20 minutes de relaxation. L'exercice physique a concerné les membres inférieurs lors des efforts de pédalage sur ergocycle ou sur tapis roulant. Au début de chaque séance, le sujet devait atteindre progressivement sa fréquence cardiaque cible puis il maintenait le pédalage ou la marche pendant 10 minutes à cette intensité. Il revenait ensuite à un pédalage à vide ou à une marche de faible vitesse, pendant 5 minutes. Au total, il réalisait 3 cycles d'exercice de 10 minutes d'entraînement à la FC cible et de 5 minutes de récupération active.

## 7. Traitement statistique

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  erreur standard à la moyenne (SEM). Le traitement statistique des résultats a été réalisé à l'aide du logiciel SPSS 17.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). La normalité de la distribution a été testée avec le test de Kolmogorov-Smirnov. Un test t de Student pour échantillons indépendants a été réalisé pour comparer les sujets obèses et contrôles, après analyse de l'égalité des variances avec le test de Levene. Le test t de Student pour échantillons appariés, ou de Wilcoxon dans le cas des données non paramétriques, a été utilisé pour analyser les données avant et après entraînement. Les données de vasoréactivité *ex vivo* ont été analysées avec une ANOVA à deux voies et un test de comparaison multiple de Dunnett. Les corrélations ont été obtenues avec le test de Pearson. Une valeur de  $p < 0.05$  est considérée comme significative.

## **- Résultats -**

# **Etude n°I : Etude de l'intégrité de la fonction vasculaire au sein d'une population de sujets obèses**

## **But de l'étude**

Pour cette première étude, nous avons voulu évaluer l'intégrité de la fonction vasculaire chez les sujets obèses de la région du sahel (Tunisie). Pour cela, nous avons recruté une population de sujets obèses, au sein du service de physiologie et d'exploration fonctionnelle sous la direction du Pr Tabka au CHU de Sousse pour lesquels nous avons mesuré différents indicateurs biologiques (stress oxydant, inflammation) renseignant sur l'homéostasie vasculaire.

## **Méthodologie**

Un total de 349 sujets a été recruté au cours de cette première étude. Tous les sujets ont bénéficié d'une mesure anthropométrique, d'un bilan biologique ainsi que de différents marqueurs du stress oxydant et de l'inflammation. Les sujets ont été séparés en deux groupes en fonction de leur IMC : le groupe « obèses » ( $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$ ,  $n=183$ ) et le groupe « contrôle » composé de sujets normo-pondérés ( $IMC < 25 \text{ kg/m}^2$ ,  $n=211$ ). Les deux groupes étaient appariés en sexe et en âge. Tous les sujets ont bénéficié d'une évaluation médicale complète.

De plus, différentes mesures ont été effectuées afin de mettre en évidence le statut oxydant de notre population. Nous avons mesuré les marqueurs des dommages oxydatifs des protéines (AOPP) et des lipides (TBARS). Une mesure du GSH a aussi été effectuée pour avoir une estimation des défenses oxydatives non-enzymatiques.

# Résultats

## 1. Caractéristiques générales de la population d'étude

La population de sujets obèses (n=183) recrutée pour cette étude présente une moyenne d'âge de 34.1 ans  $\pm$  1.6 contre 37.5 ans  $\pm$  1.8 pour la population contrôle (n=211). Au sein du groupe d'obèses, 18 sujets présentaient un diabète de type 2, 21 étaient hypertendus et 30 étaient fumeurs. La population contrôle ne présentait aucun facteur de risque cardiovasculaire. La mesure de la pression artérielle nous a permis d'observer que les sujets obèses avaient une tension artérielle moyenne significativement plus élevée que celle des sujets contrôles, correspondant à 92.6  $\pm$  0.6 mmHg et 90.3  $\pm$  0.4 mmHg respectivement (p<0.01).

## 2. Mesures anthropométriques

Le groupe de sujets obèses présentait une moyenne d'IMC de 35.56  $\pm$  0.49 kg/m<sup>2</sup> tandis que celui du groupe contrôle est de 22.50  $\pm$  0.15 kg/m<sup>2</sup> (p<0.001). Le rapport RTH était également significativement plus élevé chez les sujets obèses (p<0.001) (Figure 18).



Figure 18 : Paramètres anthropométriques chez les sujets obèses et contrôles. \*\*\*p<0.001

Par ailleurs, nous avons pu remarquer que les paramètres anthropométriques variaient significativement en fonction du sexe notamment l'IMC et le rapport RTH (Figure 19).

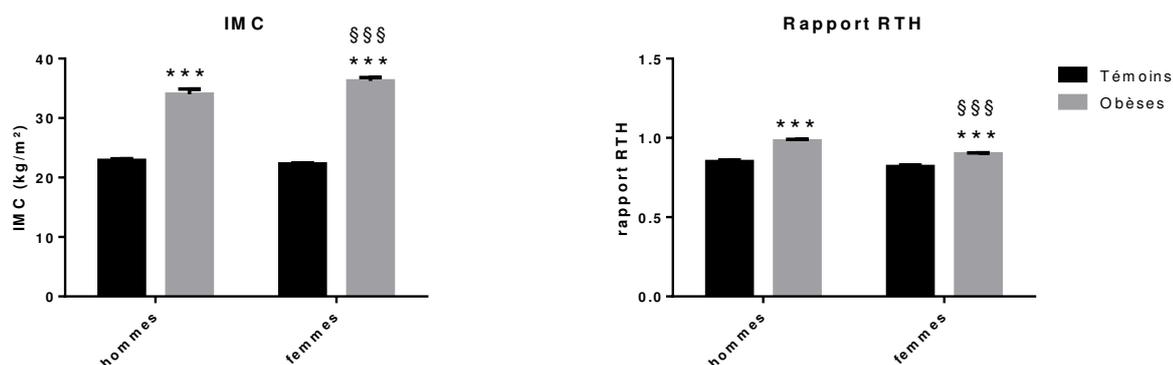


Figure 19: Paramètres anthropométriques des sujets obèses et contrôles en fonction du sexe  
\*\*\* $p < 0.001$  ; §§§ $p < 0.001$  femmes versus hommes

### 3. Paramètres lipidiques et glycémie

Sans surprise, nos résultats nous ont permis d'observer que les différents paramètres lipidiques et glycémiques sont significativement plus élevés chez le groupe « obèses » par rapport au groupe de sujets normo-pondérés (Figure 20).

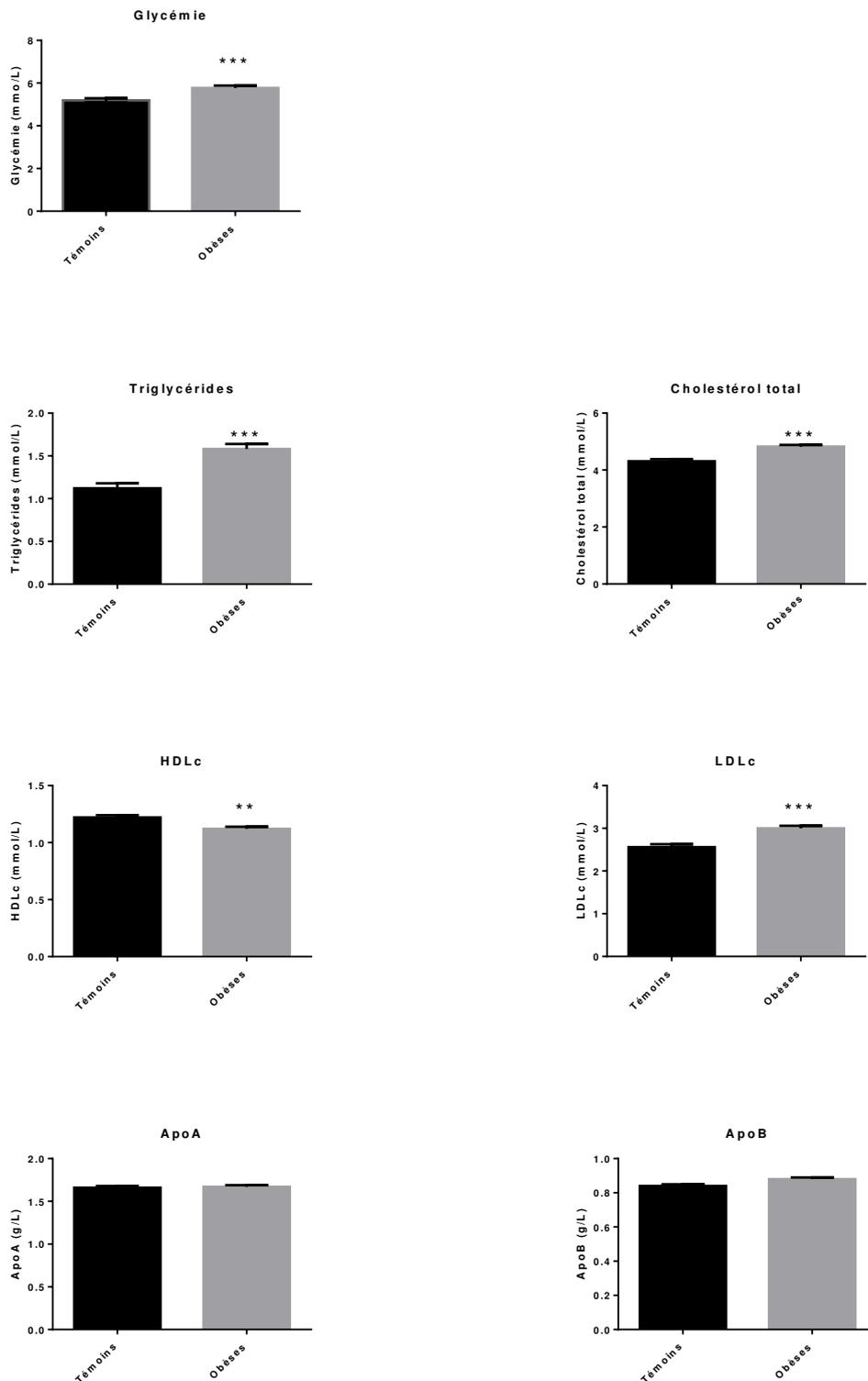


Figure 20: Paramètres lipidiques et glycémie chez les sujets obèses et contrôles.  
 \*\*\* $p < 0.001$

#### 4. Paramètres inflammatoires

Une évaluation du statut inflammatoire systémique a été effectuée par mesure de la CRPus et de la vitesse de sédimentation. Ceci nous a permis d'observer que ces marqueurs étaient significativement plus élevés ( $p < 0.001$ ) chez les sujets obèses que les sujets contrôles suggérant la présence d'une inflammation chronique au sein du groupe « obèses » (Figure 21).

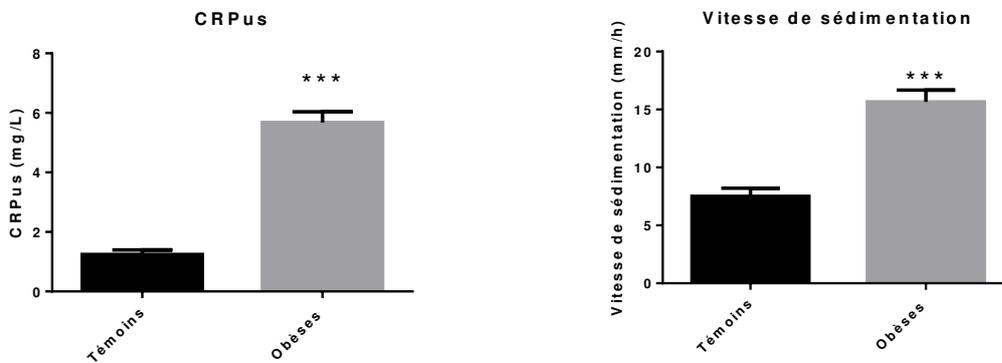


Figure 21 : Marqueurs inflammatoires chez les sujets obèses et contrôles. \*\*\* $p < 0.001$

#### 5. Evaluation du stress oxydant

L'évaluation de différents marqueurs de stress oxydant, TBARS, AOPP et GSH plasmatiques, nous a permis d'observer la présence d'un stress oxydant marqué au sein de la population de sujets obèses (Figure 22).

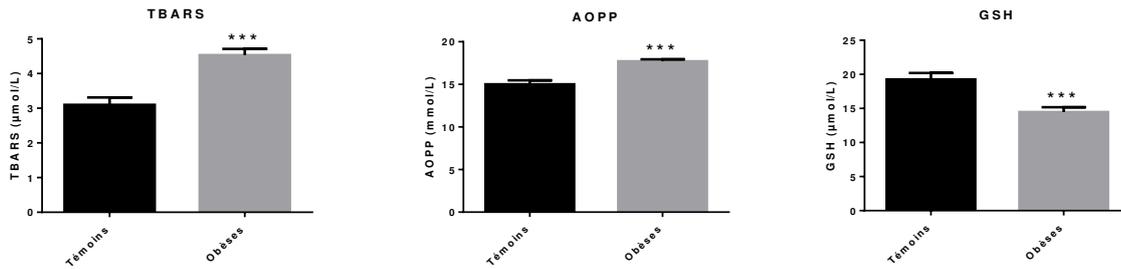


Figure 22: Paramètres du stress oxydant au niveau plasmatique chez les sujets obèses et contrôles. De gauche à droite : Marqueur de la peroxydation lipidique (TBARS) ; Marqueur de l'oxydation des protéines (AOPP) ; GSH plasmatique. \*\*\* $p < 0.001$

Cet effet se manifeste principalement par l'augmentation du taux plasmatique des TBARS et des AOPP chez les sujets obèses. Ces deux marqueurs sont le reflet du degré d'oxydation au niveau des lipides (TBARS) et des protéines (AOPP). L'augmentation de ces dommages oxydatifs sont le plus souvent des indicateurs d'une augmentation des ERO suggérant ainsi un déséquilibre de la balance du stress oxydatif. Par ailleurs, le taux de GSH, considéré comme un marqueur non enzymatique des défenses oxydatives, est diminué chez les obèses suggérant également une diminution des défenses antioxydantes.

De plus, nous avons évalué les taux plasmatiques des nitrites afin d'avoir une estimation de la biodisponibilité du NO chez nos sujets obèses (Figure 23).

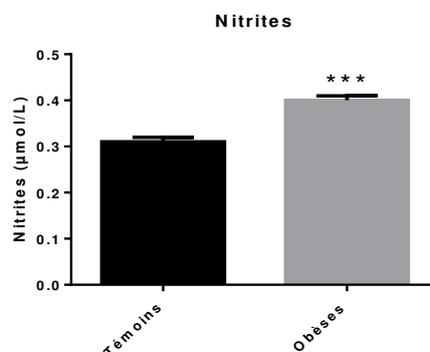


Figure 23 : Taux de nitrites plasmatique chez les sujets obèses et contrôles. \*\*\* $p < 0.001$

De façon surprenante, nous avons observé que les nitrites plasmatiques étaient significativement augmentés chez les sujets obèses par rapport aux sujets normopondérés ( $p < 0.001$ ).

## **Discussion**

Cette étude nous a permis de caractériser une population typique d'une région méditerranéenne où l'obésité devient un problème de santé majeur du fait des déséquilibres associés à la sédentarité de la population (Papandreou et al., 2008). Un des principaux résultats observés dans cette première étude est que ces sujets obèses présentent une élévation des marqueurs lipidiques, une inflammation systémique marquée, ainsi qu'une augmentation des dommages et une diminution des défenses antioxydantes indiquant la présence d'un stress oxydatif. L'obésité a en effet été décrite comme un état chronique de stress oxydant et d'inflammation, même en l'absence d'autres facteurs de risque cardiovasculaire (Higdon et Frei, 2003). Par ailleurs, le dérèglement de l'homéostasie vasculaire, suggéré par les différents marqueurs précédemment mesurés, serait indicateur de l'installation d'une dysfonction endothéliale chez ces sujets obèses. Plusieurs travaux ont également rapporté une dysfonction endothéliale dans des conditions d'obésité (Barton et al., 2012; Campia et al., 2012; Vanhoutte, 2012). Les mécanismes physiopathologiques responsables de cette altération au niveau microvasculaire sont souvent multifactoriels. Il a en effet été rapporté que l'obésité pouvait induire des altérations au niveau structural, telles que les raréfections capillaires ou un remodelage structural, ce qui pourrait engendrer une dysfonction endothéliale (Gavin et al., 2005). Toutefois, un dérèglement de l'équilibre

vasorelaxation/vasocontraction en faveur d'une réduction de facteurs vasorelaxants, dont principalement le NO, (Kuboki et al., 2000; Shimabukuro et al., 2003) ou encore une augmentation de facteurs vasocontractants (Mather et al., 2002; Straznicky et al., 2012) peut généralement expliquer la survenue d'une dysfonction endothéliale. Toutefois, la dysfonction endothéliale est généralement assimilée à une diminution de la biodisponibilité du NO, soit par une baisse de sa production, soit par une augmentation de sa dégradation (Williams et al., 2002).. Cette dégradation est notamment favorisée en présence d'un stress oxydant (Holvoet, 2012). Toutefois, l'évaluation indirecte du NO, par la mesure des nitrites plasmatiques, suggère que la biodisponibilité du NO n'est pas diminuée pour notre population de sujets obèses. On retrouve également dans la littérature des résultats similaires aux nôtres. En effet, Ghasemi et al. (Ghasemi et al., 2013) ont observé un taux augmenté de NO chez un groupe de femmes obèses. De même, Fujita et al. (Fujita et al., 2011) ont observé des taux de nitrites, mais également de nitrates, élevés chez les obèses et qui seraient dûs à une production du NO par le tissu adipeux viscéral. Ce NO serait transporté par la suite par le sang et contribuerait dans la protection contre les complications cardiovasculaires. De ce fait, des taux élevés de métabolites du NO chez les obèses pourraient être interprétés comme un mécanisme compensatoire vis-à-vis des complications associées à l'obésité.

Dans la continuité de cette première étude, une exploration fonctionnelle de l'endothélium a été effectuée pour un groupe de 115 sujets (69 obèses et 46 contrôles) de notre population initiale. Le groupe d'obèses a été recruté en fonction de l'absence d'autres facteurs de risque cardiovasculaire, autre que l'obésité. Ainsi, seuls les effets de l'obésité sur l'homéostasie vasculaire seraient évalués.

De plus, nous avons également jugé intéressant, pour la suite de nos travaux, d'étudier les microparticules (MPs) plasmatiques chez ces sujets obèses. Comme nous l'avions décrit précédemment, ces MPs seraient impliquées dans de nombreux mécanismes au niveau vasculaire. Notre objectif dans l'étude II sera donc de voir si ces MPs pourraient, de par leur concentration plasmatique et leur composition, être de bons indicateurs de l'intégrité de la fonction endothéliale, voire des effecteurs au niveau de la biologie vasculaire.

## **Etude n°II : La dysfonction endothéliale chez les sujets obèses : implication des microparticules circulantes ?**

### **Role of eNOS and NOX containing microparticles in the endothelial dysfunction in patients with obesity**

Saloua DIMASSI, Karim CHAHED, Soumaya BOUMIZA, Matthias CANAULT,  
Zouhair TABKA, Pascal LAURANT, Catherine RIVA.

**Obesity 2015 (impact factor 2015: 3.73)**

#### **But de l'étude**

Le but de cette étude était, dans un premier temps, d'étudier l'intégrité de la fonction endothéliale chez des sujets obèses par exploration fonctionnelle de l'endothélium et par mesure de différents marqueurs vasculaires et notamment les MPs circulantes. Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés au rôle de ces MPs sur la fonction endothéliale et à leur contenu, et plus particulièrement en protéines eNOS et NADPH oxydase, afin d'essayer de comprendre leur implication dans la fonction endothéliale au niveau vasculaire dans un contexte d'obésité.

#### **Principaux résultats**

Nos principaux résultats nous ont permis d'observer que la population de sujets obèses présentait une augmentation des concentrations plasmatiques des différents marqueurs lipidiques, inflammatoires et du stress oxydant par rapport aux sujets normopondérés. De plus, l'exploration de la fonction endothéliale chez ces sujets obèses a

révélé une altération de la réponse endothélium-dépendante. Ces résultats suggèrent une dysfonction endothéliale au sein de la population d'obèses. Toutefois, le taux de nitrites plasmatiques, l'un des principaux métabolites du NO, était élevé suggérant que la biodisponibilité du NO n'était pas altérée au niveau vasculaire.

Par la suite, nous nous sommes intéressés aux MPs circulantes chez les sujets obèses et normo-pondérés. Leur quantification au niveau plasmatique a tout d'abord révélé une augmentation de leurs concentrations plasmatiques chez les sujets obèses. L'étude fonctionnelle de ces MPs nous a permis d'observer que ces MPs n'altéraient pas la fonction endothéliale *ex vivo*. De plus, l'analyse de leur contenu en eNOS a montré que l'activité de cette protéine était augmentée chez les sujets obèses. L'expression de la NOX2, principale protéine impliquée dans le stress oxydant était par contre diminuée et sa fraction cytosolique p47, essentielle à son activité, n'a pas pu être détectée dans les MPs.

## **Conclusion**

D'après nos résultats, nous avons pu observer que notre population de sujets obèses présentait une altération de la fonction endothéliale. L'étude des MPs circulantes a révélé que, même si leurs concentrations plasmatiques étaient élevées chez les sujets obèses. Toutefois, d'après l'étude fonctionnelle *ex vivo* et leur contenu en protéines eNOS et NADPH oxydase, nous avons pu constater que ces MPs n'étaient pas impliquées dans la dysfonction endothéliale observée chez les sujets obèses. De plus, nos résultats sur la biodisponibilité du NO et sur les MPs circulantes suggèreraient que ces MPs sont le reflet d'un mécanisme compensatoire au niveau vasculaire qui tend à

contrebalancer les effets néfastes du stress oxydant et de la dysfonction endothéliale chez ces sujets obèses.

# Article



**From:** jgalgani@uc.cl

**To:** catherine.riva@univ-avignon.fr

**CC:**

**Subject:** Obesity - Decision on Manuscript ID 15-1179-Orig.R1

**Body:** 19-Feb-2016

Dear Dr. Riva:

We are pleased to accept your manuscript titled "ROLE OF ENOS AND NOX CONTAINING MICROPARTICLES IN THE ENDOTHELIAL DYSFUNCTION IN PATIENTS WITH OBESITY" in its current form for publication in Obesity.

Our publisher (Wiley) will be communicating with you regarding required forms, page proofs, and invoicing. Please note you will incur page charges for your manuscript. You will incur additional charges if you are printing color figures, have supplemental files or opt for Open Access publication.

Your article cannot be published until you have signed the appropriate license agreement. Within the next few days, you will receive an email from Wiley's Author Services system, which will ask you to log in and will present you with the appropriate license for completion.

Enjoy a discount on page charges if the First or Corresponding author is a member of The Obesity Society. The rate is \$65/page for Society Members, and \$95/page for Non-Members. Check out the Society website at <http://www.obesity.org> to see all the benefits of membership.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of Obesity, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,  
Dr. Jose Galgani  
Associate Editor, Obesity  
jgalgani@uc.cl

Reviewer(s)' Comments to Author:

Reviewer: 1

Comments to the Author  
(There are no comments.)

**ROLE OF ENOS- AND NOX-CONTAINING MICROPARTICLES IN  
ENDOTHELIAL DYSFUNCTION IN PATIENTS WITH OBESITY**

Saloua DIMASSI<sup>1,2</sup>, Karim CHAHED<sup>2</sup>, Soumaya BOUMIZA<sup>2</sup>, Matthias CANAULT<sup>3</sup>, Zouhair TABKA<sup>2</sup>, Pascal LAURANT<sup>1</sup>, Catherine RIVA<sup>1</sup>.

1- Avignon University, LAPEC EA4278, F-84000, Avignon, France

2- Faculty of Medicine, Sousse University, UR12ES06, Physiologie de l'Exercice et Physiopathologie: de l'Intégré au Moléculaire « Biologie, Médecine et Santé », Sousse, Tunisia

3- Aix-Marseille University, UMR INSERM 1062, INRA 1260, Nutrition, Obésité et Risque Thrombotique, F-13385 Marseille, France

**Running title: Endothelial dysfunction and microparticles in obesity**

**Corresponding author:**

Name: Catherine RIVA

Address: Avignon University, LAPEC EA4278, 74 rue Louis Pasteur, 84000 Avignon, France

Telephone number: +33 (0) 490162933 / Fax number: +33 (0) 490162901

E-mail: [catherine.riva@univ-avignon.fr](mailto:catherine.riva@univ-avignon.fr)

Keywords: Obesity, endothelial function, microparticles, eNOS, NOX

Words count: 3481

Total number of figures and tables: 3 tables and 3 figures

**What is already known about this subject?** Elevated circulating levels of microparticles have been associated with several diseases and cardiovascular risk factors, such as obesity.

**What did the study add?** Microparticles do not contribute directly to the endothelial dysfunction associated with obesity. On the contrary, eNOS- and NOX-containing microparticles could play a role in the compensatory mechanism observed in vascular endothelial cells to counteract the pathologic mechanisms underlying obesity-induced endothelial dysfunction.

**Abstract:**

**Objective:** To explore the pathophysiological profile of patients with obesity and to investigate the potential role of circulating microparticles (MPs) in endothelial dysfunction in patients with obesity.

**Methods:** The inflammatory and oxidative status and the cutaneous microvascular blood flow were characterized in 69 patients with android obesity and 46 subjects with normal weight (controls) by using laser Doppler flowmetry. Circulating MP levels were measured by flow cytometry and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and NADPH oxidase (NOX) expression in MPs were investigated by western blotting. MP effect on vascular reactivity was assessed in rat aorta rings.

**Results:** Patients with obesity showed endothelial dysfunction, hyperglycemia, inflammation and oxidative stress. In controls, low MP levels were positively correlated with normal microvascular function. Western blot analysis revealed reduced eNOS and increased NOX4D expression in MPs from subjects with obesity compared with controls. However, this was not correlated with endothelial dysfunction parameters and did not impair *ex vivo* endothelium-dependent vasodilation.

**Conclusions:** These results suggest that MPs do not contribute directly to endothelial dysfunction associated with obesity. Conversely, eNOS- and NOX- containing MPs could be involved in the compensatory mechanism of vascular endothelial cells to counteract the pathologic mechanisms underlying endothelial dysfunction.

**Abbreviation list:**

ACh: Acetylcholine

AOPP: Advanced Oxidation Protein Products

ApoA: Apolipoprotein A

ApoB: Apolipoprotein B

BF: Blood flow

BMI: Body mass index

CBF: Cutaneous blood flow

CVC: Cutaneous vascular conductance

CVD: Cardiovascular disease

DBP: Diastolic blood pressure

DTNB: 5'-dithiobis (2- nitrobenzoic acid)

eNOS: Endothelial nitric oxide synthase

FMD: Flow-mediated dilation

GSH: reduced Glutathione

HDLc: High density Lipoprotein cholesterol

HsCRP: high sensitive C-reactive protein

IL-6: Interleukin-6

LDF: Laser Doppler Flowmetry

LDLc: Low density Lipoprotein cholesterol

LSH: Local skin heating

MPs: microparticles

NO: Nitric oxide

NOX: NADPH oxidase

PFp: Platelet-free plasma

PRP: Platelet-rich plasma

ROS: Reactive oxygen species

SBP: Systolic blood pressure

TBARS: Thiobarbituric Acid Reactive Substances

WHR: Waist-to-hip Ratio

### **Disclosure:**

The authors have no potential conflicts of interest

### **Author Contributions:**

S.D. researched data/wrote the manuscript, K.C. reviewed the manuscript, S.B. researched data, M.C. reviewed the manuscript, Z.T. reviewed the manuscript, P.L. reviewed the manuscript, C.R. researched data/wrote/edited the manuscript and is the guarantor of this work and, as such, had full access to all study data and takes responsibility for the data integrity and the data analysis accuracy.

### **Acknowledgement:**

The authors want to thank Prof MC Alessi from INSERM, UMR 1062, INRA, UMR 1260, Dr H Debbabi, from the Faculty of Medicine, Sousse University, UR12ES06, and Dr A Miled from the Faculty of Medicine, Sousse University, Department of Clinical Biochemistry for the access to their core facility for biological measurements. We are grateful to Dr A Vinet from Avignon University, LAPEC EA4278, for scientific discussion and support.

### **Introduction:**

Obesity is a health problem worldwide. It also is a major risk factor for cardiovascular diseases by predisposing to endothelial alterations (1). Endothelial dysfunction is generally associated with decreased nitric oxide (NO) bioavailability. NO production is catalyzed by endothelial nitric oxide synthase (eNOS), while reactive oxygen species (ROS) negatively regulate NO bioavailability (2). Several enzymes are involved in ROS generation and, among them, the NADPH oxidase represents a major source of vascular superoxide anion ( $O_2^-$ ) that generates oxidative stress as observed in patients with obesity and type 2 diabetes (3).

Microparticles (MPs) are membranous vesicles released from many types of vascular cells, such as endothelial cells, platelets and leukocytes, in response to cell stimulation, stress or apoptosis (4). Circulating MP composition and function are directly dependent on the characteristics of the cells from which they originate (5). Moreover, MPs could contribute to intercellular communication and may work as vectors of biological messages leading to endothelial and vascular dysfunctions, or platelet activation (6). Elevated circulating MP level has been associated with several diseases and cardiovascular risk factors, such as obesity (7, 8). However, depending on the pathological context and the mechanism of MP formation, MPs could have favorable or deleterious effects on vascular homeostasis (9).

The aim of this study was to investigate MP potential role in the pathophysiology of endothelial function alterations in obesity. First, clinical parameters, oxidative stress and inflammatory status as well as endothelial function (cutaneous microvascular blood flow) were evaluated in young subjects with obesity and in controls with normal weight. Then, the number of circulating MPs and eNOS and NADPH oxidase (NOX) content (two proteins implicated in the development of

endothelial dysfunction and oxidative stress associated with obesity) in MPs from the two groups were determined. Finally, MP influence on the vasoreactivity of rat aortic rings was assessed.

## **Methods**

### **Subjects**

The study, approved by the Farhat Hached Hospital Ethics Committee in Tunisia, included 115 healthy Caucasian subjects (45 males, 70 females) who signed an informed consent before inclusion. Based on their body mass index (BMI), they were divided in subjects with obesity ( $\text{BMI} \geq 30\text{kg/m}^2$ ,  $n=69$ ) and controls with normal weight ( $\text{BMI} < 25\text{kg/m}^2$ ,  $n=46$ ). Medical history and physical examination data were collected for all subjects to exclude co-morbid factors. Exclusion criteria were: 1) history of hypertension, antihypertensive medication or elevated blood pressure in sitting position (systolic blood pressure (SBP)  $\geq 140$  mmHg and/or diastolic blood pressure (DBP)  $\geq 90$  mmHg); 2) history of diabetes mellitus or fasting glucose  $> 7\text{mmol.l}^{-1}$ ; 3) history of cardiovascular disease or current cardiovascular procedures; 4) hyperlipidemia (total cholesterol  $> 6.7$  mmol.l<sup>-1</sup> and/or triglyceride level  $> 4.5$  mmol.l<sup>-1</sup>); 5) past or present history of smoking; 6) consumption of vasoactive medications or antioxidant supplementation in the past six months. Anthropometric (height, weight, waist and bi-iliac circumference) measurements and the mean arterial pressure ( $\text{MAP} = 1/3 (\text{SBP}) + 2/3 (\text{DBP})$ ) were recorded. Fasting glucose, lipids and inflammatory markers (high-sensitivity C-reactive protein, hsCRP, and sedimentation rate) were evaluated in all subjects.

### **Oxidative stress measurement**

Blood samples (n=115) were collected in EDTA tubes after overnight fasting and were centrifuged at 4,000 g for 10 min. Plasma aliquots were immediately removed and stored at -80°C until analysis. Nitrite content was assessed using the colorimetric-based Griess method. Oxidative damage (lipid peroxidation level) was estimated by measuring the plasma levels of ThioBarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) and Advanced Oxidation Protein Products (AOPP). The plasma concentration of reduced Glutathione (GSH) was determined with a 5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB)-based enzymatic method.

### **Endothelial function assessment**

Endothelial function was explored in all subjects (n=115) by assessing the forearm microvascular cutaneous vasoreactivity using Laser Doppler Flowmetry coupled with iontophoresis (Periflux System 5000, Perimed, Jarfalla Sweden). Endothelium-dependent vasodilation was evaluated by stimulation with 2% acetylcholine chloride (ACh) (Sigma Aldrich, Switzerland) and endothelium-independent vasodilation, after local skin heating (LSH) (10). Briefly, cutaneous blood flow (CBF) was recorded at rest for 2min and during the functional exploration. Three doses of ACh were delivered using an anodal current (0.1mA for 10s) at 2-min intervals. Finally, the local skin temperature, which was initially maintained at 32°C, was increased to 44°C for 5min (LSH) (Figure 1) (11). Data were expressed as cutaneous vascular conductance (CVC), which represents the ratio between the CBF and MAP values, to take into account variations in blood pressure between subjects (12). The endothelium-dependent response was calculated as the difference between the peak CVC upon ACh stimulation (i.e., the CVC after the third

dose of ACh) and the baseline CVC ( $\Delta$ ACh-CVC). The endothelium-independent response was calculated as the difference between the peak CVC following LSH-induced vasodilation and the baseline CVC ( $\Delta$ LSH-CVC).

## **MP preparation and flow cytometry analysis**

### **MP preparation**

Citrated blood samples were collected from 46 subjects (14 controls and 32 subjects with obesity) and processed within 2h. Platelet-rich plasma (PRP) was collected after centrifugation at 1,500g for 15min at room temperature (RT). Platelet-free plasma (PFP) was obtained by further centrifugation at 13,000g at RT for 2min, and the MP pellet after ultracentrifugation of the PFP samples at 20,000g, 4°C for 90 min. MP and PFP aliquots were stored at -80°C until analysis (13).

### **MP quantification by flow cytometry**

MP samples were analyzed using an Accuri C6 flow cytometer and software (Accuri Cytometers, Ann Arbor, MI) to define the MP gate and to quantify the absolute numbers of MPs per  $\mu$ l of plasma. Regions corresponding to MPs were identified in forward and side-angle light scatter intensity dot plot representation set at logarithmic gain, based on the diameter using standard microbeads (0.1 and 1.1 $\mu$ m) (14).

### **Vascular reactivity measurement**

Rat aorta rings from 3-month-old Wistar rats were incubated for 5h in Dulbecco's modified eagle medium/Krebs-HEPES solution (117mM NaCl, 74.5mM KCl, 84mM NaHCO<sub>3</sub>, 1.5mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.7mM MgCl<sub>2</sub>, 21mM HEPES, 11.1mM glucose) in the absence (n=8) or presence of MPs from controls (n=6) or subjects

with obesity (n=7). The final MP concentration corresponded to the MP circulating plasma level. Aorta rings were then mounted in organ chambers filled with Krebs solution warmed at 37°C and continuously aerated with a 95%O<sub>2</sub>-5%CO<sub>2</sub> gas mixture. Aorta rings were connected to an isometric force transducer (EMKA Technologies, EMKA Paris, France), linked to an amplifier (EMKA Technologies, EMKA Paris, France) and changes in isometric force were recorded on a computer equipped with a data acquisition system. Resting tension was adjusted to the maximal length tension of 2g and aorta rings were allowed to equilibrate for 1h. Contractions were produced by addition of 10<sup>-4</sup> M phenylephrine and the endothelium-dependent response was studied by addition of ACh at different concentrations (5.10<sup>-9</sup> to 10<sup>-4</sup> M). Finally, 10<sup>-5</sup> M sodium nitroprusside (SNP) was used to reach the maximum response and to test the endothelium-independent response (16). MP effect on the ACh-sensitivity of aorta rings was evaluated by calculating the ACh concentration inducing the half-maximal response (EC<sub>50</sub>). Care and use of laboratory animals were according to the European Community standards.

### **Western blot analysis**

MP pellets from controls (n=6) and subjects with obesity (n=6) were suspended in lysis buffer (25mM Tris pH=7.6, 150mM NaCl, 1% Triton X100) containing phosphatase inhibitor (Fisher Scientific) and protease inhibitor cocktails (Sigma Aldrich). Proteins were transferred to PVDF membranes and probed with mouse monoclonal anti-eNOS (1:300; BD Biosciences) and anti-eNOS-P<sup>Ser1177</sup> (1:200; BD Biosciences) and goat polyclonal anti-gp91-phox (1:200; Santa Cruz Biotechnology), anti-p47-phox (1:200; Santa Cruz Biotechnology), anti-NOX4 (1:200; Santa Cruz Biotechnology) and rabbit polyclonal anti-αβ tubulin (1:3000; BD Biosciences) antibodies. Immunodetection was carried out using the ECL System

(Super Signal West Pico Chemiluminescence Substrate, Thermo Scientific) followed by exposure to X-ray films for revelation.

### **Statistical analysis**

Data analysis was performed using the SPSS 17.0 software (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM. The data normal distribution was tested using the Kolmogorov-Smirnov test. The independent-samples t-test was used after investigation of variances equality by using the Levene's test. Vasoreactivity data were analyzed using a two-way ANOVA and Dunnett's multiple comparisons test. Correlations were obtained using the Pearson correlation test. Statistical significance was inferred when the two-tailed p-value was lower than 0.05.

## **Results**

### **Population characteristics**

This study included 69 subjects with obesity (BMI  $\geq$  30kg/m<sup>2</sup>) and 46 controls with normal weight (BMI < 25kg/m<sup>2</sup>). Anthropometric and biochemical data are presented in Table 1. As age and gender distribution were not significantly different between groups, the results were presented independently of gender.

The waist circumference and waist to hip ratio (WHR) indicated that the subjects with obesity had android obesity. Moreover, the mean fasting glucose concentration exceeded 5.6 mmol/L in subjects with obesity, suggesting a hyperglycemic state (15). Plasma triglycerides and the mean fasting glucose levels as well as SBP, DBP and MAP were higher in subjects with obesity than in controls.

The elevated hsCRP and sedimentation rate values (compared with controls) suggested the presence of chronic inflammation in the subjects with obesity.

### **Oxidative stress analysis**

Plasma TBARS, AOPP and nitrite levels were significantly higher in the group with obesity than in controls (Table 1). Conversely, plasma GSH level (a marker of the anti-oxidative defense status) was significantly lower in subjects with obesity than in controls (Table 1).

### **Assessment of endothelial function by Laser Doppler Flowmetry**

Basal CVC values and after stimulation with ACh (peak ACh-CVC,  $\Delta$ ACh-CVC and AUC) were significantly lower in the group with obesity than in controls (Table 2). Conversely, peak LSH-CVC and  $\Delta$ LSH-CVC were similar between groups (Table 2). These results indicate that endothelium-dependent, but not endothelium-independent vasodilation is impaired in subjects with obesity.

### **Relationships between circulating MP levels and endothelial function parameters**

Circulating MP number was significantly higher in subjects with obesity (n=32) than in controls (n=14) (Figure 2A). Correlations between circulating MP levels, endothelial function parameters were assessed separately in each group, to highlight the possible role of “good” MPs in controls (normal weight) and of “modified” MPs in subjects with obesity (Table 3). In controls, circulating MP number was significantly and positively correlated with endothelium-dependent response parameters (AUC, peak ACh-CVC and  $\Delta$ ACh-CVC). Conversely, no correlation was found in the population with obesity (Table 3).

### **Effect of MPs on the *ex vivo* endothelium-dependent response**

ACh-induced relaxation in rat aortic rings was not modified by incubation with MPs (used at their mean plasma concentration) from controls (n=6) or from subjects with obesity (n=7) compared with buffer alone (n=8) (Figure 2B). Similarly, MPs (from controls or subjects with obesity) did not influence ACh sensitivity ( $EC_{50}$ ) and maximum relaxation upon ACh stimulation (Figure 2C). Moreover, MPs did not affect significantly the response to SNP.

### **Nitric Oxide Synthase and NADPH Oxidase levels in circulating MPs**

The levels of eNOS and eNOS phosphorylated on Ser1177 ( $P^{Ser1177}$ eNOS, activating phosphorylation) were assessed by western blot analysis of crude MP lysates (n=6/each group). Total eNOS expression was significantly lower in MPs from subjects with obesity than in controls (Figure 3A). Conversely, the  $P^{Ser1177}$ -eNOS to total eNOS ratio was significantly higher in MPs from subjects with obesity than in controls (Figure 3B).

Western blot analysis of the expression of NADPH oxidase isoforms in crude MP lysates showed that the catalytic trans-membrane NADPH oxidase type 2 (NOX2) could be detected as two characteristic bands (a 65 kDa band representing the non-glycosylated form and a broad band with an average size of 110 kDa corresponding to the heavily glycosylated mature form). Total NOX2 expression (65 kDa plus 110 kDa bands) was significantly decreased in MPs from subjects with obesity compared with controls (Figure 3C). The cytosolic p47phox NADPH oxidase subunit could not be detected in any MP sample (Figure 3D). The level of NADPH oxidase type 4 (NOX4) (specific 67 kDa band) was not significantly different between groups (Figure 3E). Finally, expression of the NOX4D variant (32 kDa band) was

significantly higher in MPs from subjects with obesity than from controls (Figure 3F).

## Discussion

The main findings of this study are: 1/ endothelial function is impaired and inflammatory markers are elevated in subjects with obesity and hyperglycemia compared with controls (BMI < 25kg/m<sup>2</sup>); 2/ the number of circulating MP is higher in subjects with obesity, but this does not correlate with *in vivo* endothelial dysfunction parameters; moreover, MPs from subjects with obesity do not influence *ex vivo* endothelial-dependent vasorelaxation; 3/ eNOS and NOX2 levels are reduced, whereas P<sup>Ser1177</sup>-eNOS and NOX4D levels are increased in MPs from subjects with obesity compared with controls.

Our results show that endothelium-dependent vasodilation is altered in young subjects with obesity compared with age-matched controls, suggesting endothelial dysfunction. The pathophysiological mechanisms underlying the link between obesity and microvascular dysfunction are various and complex (16–18). Endothelial dysfunction in resistance vessels evolves progressively, together with the increase in body fat (19). The hyperglycemia we observed in the group with obesity could also be involved in endothelial dysfunction development, as demonstrated by Kawano et al. (20). Moreover, the high hsCRP levels (an inflammatory marker) in the group with obesity suggest a systemic inflammatory state that could further impair endothelial function through inhibition of eNOS gene expression in endothelial cells (21). Many reports suggest that oxidative stress is involved in the pathophysiology of cardiovascular diseases by reducing NO bioavailability and consequently NO

levels (2). In our population with obesity, reduced antioxidant defenses (i.e., GSH) were associated with increased levels of lipid peroxidation (TBARS) and protein oxidation (AOPP) markers. Oxidative damage has been linked to enhanced ROS production in patients with obesity (22). High NO and ROS levels could lead to the production of peroxynitrite, resulting in microvascular function impairment (3). It has been proposed that nitrite anion ( $\text{NO}_2^-$ ), which is abundant in blood and tissues, represents the largest intravascular and tissue storage form of NO. Approximately 80-90% of basal plasma nitrites are derived from eNOS-produced NO, suggesting that nitrites could be used as an endothelial function biomarker (23). In agreement, in our study NO bioavailability (nitrites) was significantly increased in the group with obesity. Our results are consistent with those by Ghasemi et al. (24), who showed increased nitrite/nitrate levels in women with obesity. Fujita et al. (25) also reported higher circulating nitrite/nitrate levels in subjects with obesity due to NO production by visceral fat. Moreover, NO synthesized within a specific location could be transported in blood as nitrites to distant organs, providing protection against ischemic injury (26). Therefore, one can hypothesize that increased levels of NO metabolites in obesity may be a compensatory mechanism against obesity-related changes.

Our study shows that circulating MP levels are significantly higher in subjects with obesity than in controls. However, MP levels were positively correlated with the microvascular response (AUC and  $\Delta\text{ACh-CVC}$ ) only in the control group. This is different from previous works showing that high MP levels correlate with impaired flow-mediated dilation of the coronary (27) or brachial artery (7). Moreover, we found that MPs from subjects with obesity and from controls did not influence *ex vivo* ACh-induced relaxation, whereas other studies observed an effect using MPs

from patients with myocardial infarction (28). It is generally acknowledged that MP levels are increased in pathological contexts, but their functional characteristics are closely dependent on their biochemical composition. For example, Mostefai et al. (30) observed that MP levels were increased in patients with septic shock compared with healthy controls, but such MPs did not trigger vascular inflammation. On the contrary, they exerted a vascular protective role (29). The absence of effect of MPs from subjects with obesity suggests that such MPs do not carry a “pathological” content. As circulating MPs from subjects with vascular dysfunction originate largely from the endothelium (30), we analyzed eNOS expression and activity in circulating MPs, as a marker of the vessel endothelial cell content. Total eNOS level was reduced in circulating MPs from subjects with obesity compared with controls. Conversely, the eNOS-P<sup>Ser1177</sup>/eNOS ratio was increased in MPs from subjects with obesity, suggesting higher eNOS activation in these MPs than in MPs from controls. Horn et al., (31) also reported the presence of functional eNOS in circulating MPs with a significant decrease of its level in patients with endothelial dysfunction. However, they did not analyze eNOS activation level (i.e., P<sup>Ser1177</sup>eNOS). Oxidative stress or hyperglycemia could modulate eNOS expression. Indeed, exposure of cultured human coronary endothelial cells to high glucose leads to eNOS expression and NO production downregulation (32). Peng et al (33) also observed eNOS (mRNA and protein) downregulation in cardiomyocytes incubated with high glucose and insulin concentrations. Reduced eNOS expression was also reported in MPs from patients with advanced atherosclerosis (32). On the other hand, eNOS activity could be increased even if its expression level does not change. Silver et al. observed that although eNOS expression in endothelial cells was not increased in overweight adults and subjects with obesity compared with normal-weight controls, P<sup>Ser1177</sup>eNOS level

was higher (34). Increased eNOS activation, and therefore enhanced NO production, could be the result of oxidative stress, and more specifically of ROS production (35). Indeed, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> can activate eNOS by stimulating phosphorylation at Ser1177 (36). Based on these data, we suggest that the increased P<sup>Ser1177</sup>eNOS level in MPs and in endothelial cells and the high plasma nitrite levels in subjects with obesity indicate the presence of a vascular compensatory mechanism to increase NO production in order to maintain its bioavailability in the presence of oxidative stress.

As NADPH oxidase is considered the main source of ROS production within the vasculature, we first investigated whether NOX2 was expressed in MPs. In agreement with a previous work showing the presence of NOX2 in circulating MPs from patients with hypercholesterolemia (37), we found that NOX2 was expressed in MPs, but its level was reduced in MPs from patients with obesity. NOX2 activation requires the translocation of its cytosolic subunit p47 to the cytoplasmic membrane (34). We could not detect this subunit in circulating MPs from both groups. This suggests that p47 was not localized at the membrane surface or in proximity of the MP budding site in endothelial cells and that it could not contribute to NOX2 activation (38). Therefore, we hypothesize that these MPs cannot produce ROS through NOX2 activity. NOX2 contributes to endothelial dysfunction and vascular oxidative stress, whereas NOX4 has a vasoprotective role by increasing NO bioavailability (39). Indeed, NOX2 produces O<sub>2</sub><sup>-</sup> and NOX4 catalyzes production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> that could activate eNOS by enhancing its phosphorylation at Ser1177 (36). In our study, total NOX4 expression was comparable in MPs from controls and subjects with obesity. Conversely, expression of NOX4D, a NOX4 variant that produces H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *in vitro* at similar levels as NOX4, was higher in MPs from subjects with obesity than in controls (40).

To conclude, although circulating MP levels were higher in subjects with obesity and endothelial dysfunction, they did not affect endothelial function *ex vivo* and were not correlated with impaired endothelial function parameters *in vivo*. Moreover, the higher P<sup>Ser1177</sup>eNOS level in MPs from subjects with obesity than in controls suggests increased eNOS activity. Expression of the NOX2 isoform, which promotes endothelial dysfunction, was lower, while NOX4D, which has vasoprotective effects, was higher in MPs from subjects with obesity than in controls. Taken together, these results suggest that MPs from subjects with obesity do not contribute directly to endothelial dysfunction. As the MP phenotype reflects the phenotype of the cells from which they originate (endothelial cells) and the vascular state, we hypothesize that in subjects with obesity, MPs could participate in a compensatory mechanism to counterbalance the pathologic effects of obesity-related endothelial dysfunction.

### **Legends to figures**

**Figure 1** - Typical Laser Doppler recordings of a normal response at the forearm of a healthy subject. Vertical lines separate the different recording phases: resting CBF, the three successive administrations of 2% ACh (delivered using 0.1mA current for 10s) and local skin heating (LSH). The third dose of ACh was used to determine the maximum ACh response (i.e., the peak ACh-CBF). Temperature was maintained at 33°C during baseline recording and ACh administration and increased to 44°C for LSH. PU: perfusion unit.

**Figure 2** – MP quantification and MP influence on *ex vivo* vasoreactivity. A/ Quantification of circulating MP levels in controls (n=14) and subjects with obesity (n=32); B and C/ Effect of MPs on the endothelium-dependent response of rat aorta

rings incubated with vehicle (n=8), MPs from controls (n=6) or MPs from subjects with obesity (n=7) for 5 hours. B/ Relaxation upon exposure to ACh; and C/ ACh EC<sub>50</sub>. Values are the mean ± SEM. \*p<0.05 versus control group.

**Figure 3** – Western blot analysis using MPs from subjects with obesity (n=6) and controls (n=6) to determine: A/ total eNOS expression; B/ the phosphorylated eNOS to total eNOS ratio (eNOS-P<sup>Ser1177</sup>/total eNOS); C/ total NOX2 expression (glycosylated and non-glycosylated NOX2); D/ p47 expression; E/ NOX4 expression; F/ NOX4D variant expression. Bands were quantified using tubulin. Values are the mean ± SEM. \*p<0.05 versus control group.

## References

1. Avogaro A, de Kreutzenberg SV. Mechanisms of endothelial dysfunction in obesity. *Clin Chim Acta* 2005;360:9–26.
2. Williams IL, Wheatcroft SB, Shah AM, Kearney MT. Obesity, atherosclerosis and the vascular endothelium: mechanisms of reduced nitric oxide bioavailability in obese humans. *Int J Obes* 2002;26:754–764.
3. Guzik TJ, Mussa S, Gastaldi D, et al. Mechanisms of Increased Vascular Superoxide Production in Human Diabetes Mellitus Role of NAD(P)H Oxidase and Endothelial Nitric Oxide Synthase. *Circulation* 2002;105:1656–1662.
4. VanWijk MJ, VanBavel E, Sturk A, Nieuwland R. Microparticles in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res* 2003;59:277–287.
5. Jimenez JJ, Jy W, Mauro LM, Soderland C, Horstman LL, Ahn YS. Endothelial cells release phenotypically and quantitatively distinct microparticles in activation and apoptosis. *Thromb Res* 2003;109:175–180.
6. Martinez MC, Tual-Chalot S, Leonetti D, Andriantsitohaina R. Microparticles: targets and tools in cardiovascular disease. *Trends Pharmacol Sci* 2011;32:659–665.
7. Esposito K, Ciotola M, Schisano B, et al. Endothelial Microparticles Correlate with Endothelial Dysfunction in Obese Women. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:3676–3679.
8. Goichot B, Grunebaum L, Desprez D, et al. Circulating procoagulant microparticles in obesity. *Diabetes Metab* 2006;32:82–85.

9. Dignat-George F, Boulanger CM. The Many Faces of Endothelial Microparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011;31:27–33.
10. van Sloten TT, Czernichow S, Houben AJ, et al. Association Between Arterial Stiffness and Skin Microvascular Function: The SUVIMAX2 Study and The Maastricht Study. *Am J Hypertens* 2015 Jul;28(7):868-76. doi: 10.1093/ajh/hpu246.
11. Mourad J-J, Guetz G des, Debbabi H, Levy BI. Blood pressure rise following angiogenesis inhibition by bevacizumab. A crucial role for microcirculation. *Ann Oncol* 2008, 19(5):927-34.
12. O’Leary DS. Regional vascular resistance vs. conductance: which index for baroreflex responses? *Am J Physiol - Heart Circ Physiol* 1991;260:H632–H637.
13. Robert S, Poncelet P, Lacroix R, et al. Standardization of platelet-derived microparticle counting using calibrated beads and a Cytomics FC500 routine flow cytometer: a first step towards multicenter studies? *J Thromb Haemost* 2009;7:190–197.
14. Tual-Chalot S, Fatoumata K, Priou P, et al. Circulating Microparticles from Patients with Obstructive Sleep Apnea Enhance Vascular Contraction: Mandatory Role of the Endothelium. *Am J Pathol* 2012;181:1473–1482.
15. Alberti KGMM, Eckel RH, Grundy SM, et al. Harmonizing the Metabolic Syndrome A Joint Interim Statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* 2009;120:1640–1645.
16. Shimabukuro M, Higa N, Asahi T, et al. Hypoadiponectinemia Is Closely Linked to Endothelial Dysfunction in Man. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:3236–3240.
17. Kuboki K, Jiang ZY, Takahara N, et al. Regulation of Endothelial Constitutive Nitric Oxide Synthase Gene Expression in Endothelial Cells and In Vivo A Specific Vascular Action of Insulin. *Circulation* 2000;101:676–681.
18. Gavin TP, Stallings HW, Zwetsloot KA, et al. Lower capillary density but no difference in VEGF expression in obese vs. lean young skeletal muscle in humans. *J Appl Physiol* 2005;98:315–321.
19. Perticone F, Ceravolo R, Candigliota M, et al. Obesity and body fat distribution induce endothelial dysfunction by oxidative stress: protective effect of vitamin C. *Diabetes* 2001;50:159–165.
20. Kawano H, Motoyama T, Hirashima O, et al. Hyperglycemia rapidly suppresses flow-mediated endothelium- dependent vasodilation of brachial artery. *J Am Coll Cardiol* 1999;34:146–154.

21. Jiménez-Altayó F, Briones AM, Giraldo J, Planas AM, Salaices M, Vila E. Increased Superoxide Anion Production by Interleukin-1 $\beta$  Impairs Nitric Oxide-Mediated Relaxation in Resistance Arteries. *J Pharmacol Exp Ther* 2006;316:42–52.
22. D'Archivio M, Annuzzi G, Vari R, et al. Predominant role of obesity/insulin resistance in oxidative stress development. *Eur J Clin Invest* 2012;42:70–78.
23. Kleinbongard P, Dejam A, Lauer T, et al. Plasma nitrite reflects constitutive nitric oxide synthase activity in mammals. *Free Radic Biol Med* 2003;35:790–796.
24. Ghasemi A, Zahediasl S, Azizi F. Elevated nitric oxide metabolites are associated with obesity in women. *Arch Iran Med* 2013;16:521–525.
25. Fujita K, Wada K, Nozaki Y, et al. Serum nitric oxide metabolite as a biomarker of visceral fat accumulation: Clinical significance of measurement for nitrate/nitrite. *Med Sci Monit* 2011;17:CR123–CR131.
26. Elrod JW, Calvert JW, Gundewar S, Bryan NS, Lefer DJ. Nitric oxide promotes distant organ protection: Evidence for an endocrine role of nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci* 2008;105:11430–11435.
27. Koga H, Sugiyama S, Kugiyama K, et al. Elevated Levels of VE-Cadherin-Positive Endothelial Microparticles in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus and Coronary Artery Disease. *J Am Coll Cardiol* 2005;45:1622–1630.
28. Boulanger CM, Scoazec A, Ebrahimian T, et al. Circulating Microparticles From Patients With Myocardial Infarction Cause Endothelial Dysfunction. *Circulation* 2001;104:2649–2652.
29. Mostefai HA, Meziani F, Mastronardi ML, et al. Circulating Microparticles from Patients with Septic Shock Exert Protective Role in Vascular Function. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;178:1148–1155.
30. Horstman LL, Jy W, Jimenez JJ, Ahn YS. Endothelial microparticles as markers of endothelial dysfunction. *Front Biosci J Virtual Libr* 2004;9:1118–1135.
31. Horn P, Cortese-Krott MM, Amabile N, et al. Circulating Microparticles Carry a Functional Endothelial Nitric Oxide Synthase That Is Decreased in Patients With Endothelial Dysfunction. *J Am Heart Assoc* 2013;2:e003764.
32. Ding Y, Vaziri ND, Coulson R, Kamanna VS, Roh DD. Effects of simulated hyperglycemia, insulin, and glucagon on endothelial nitric oxide synthase expression. *Am J Physiol - Endocrinol Metab* 2000;279:E11–E17.
33. Peng X, Chen R, Wu Y, et al. PPAR $\gamma$ -PI3K/AKT-NO signal pathway is involved in cardiomyocyte hypertrophy induced by high glucose and insulin. *J Diabetes Complications* 2015 Aug;29(6):755-60. doi: 10.1016/j.jdiacomp.2015.04.012.
34. Silver AE, Beske SD, Christou DD, et al. Overweight and Obese Humans Demonstrate Increased Vascular Endothelial NAD(P)H Oxidase-p47phox Expression and Evidence of Endothelial Oxidative Stress. *Circulation* 2007;115:627–637.

35. Cai H, Li Z, Davis ME, Kanner W, Harrison DG, Dudley SC. Akt-Dependent Phosphorylation of Serine 1179 and Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase/Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 Cooperatively Mediate Activation of the Endothelial Nitric-Oxide Synthase by Hydrogen Peroxide. *Mol Pharmacol* 2003;63:325–331.
36. Thomas SR, Chen K, Keaney JF. Hydrogen Peroxide Activates Endothelial Nitric-oxide Synthase through Coordinated Phosphorylation and Dephosphorylation via a Phosphoinositide 3-Kinase-dependent Signaling Pathway. *J Biol Chem* 2002;277:6017–6024.
37. Pignatelli P, Carnevale R, Cangemi R, et al. Atorvastatin Inhibits gp91phox Circulating Levels in Patients With Hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;30:360–367.
38. Lambeth JD, Kawahara T, Diebold B. Regulation of Nox and Duox enzymatic activity and expression. *Free Radic Biol Med* 2007;43:319–331.
39. Drummond GR, Sobey CG. Endothelial NADPH oxidases: which NOX to target in vascular disease? *Trends Endocrinol Metab* 2014;25:452–463.
40. Goyal P, Weissmann N, Rose F, et al. Identification of novel Nox4 splice variants with impact on ROS levels in A549 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;329:32–39.

Table 1- Clinical and inflammatory characteristics of control group and obesity group

Characteristics	Control (n=46)	Obesity (n=69)	P-value
<b>Demographic parameters</b>			
Age (years)	33.11 ± 1.46	36.46 ± 1.36	<i>p</i> = 0.106
Gender (males/females)	18/28	27/42	<i>p</i> = 0.578
<b>Clinical parameters</b>			
BMI (kg.m <sup>-2</sup> )	22.73 ± 0.29	37.27 ± 0.99	<i>p</i> <0.0001***
Waist circumference (cm)			
Waist circumference (males)	80.23 ± 3.04	118.63 ± 3.80	<i>p</i> <0.0001***
Waist circumference (females)	80.15 ± 2.67	111.97 ± 2.73	<i>p</i> <0.0001***
WHR			
WHR (males)	0.82 ± 0.02	0.99 ± 0.01	<i>p</i> <0.0001***
WHR (females)	0.81 ± 0.02	0.90 ± 0.01	<i>p</i> <0.0001***
Systolic blood pressure (mmHg)	113.00 ± 1.25	118.40 ± 1.92	<i>p</i> = 0.021*
Diastolic blood pressure (mmHg)	74.50 ± 1.07	78.00 ± 0.90	<i>p</i> = 0.014*
Mean arterial pressure (mmHg)	87.33 ± 1.03	91.46 ± 1.06	<i>p</i> = 0.008**
Fasting glucose (mmol.l <sup>-1</sup> )	5.03 ± 0.71	5.68 ± 0.20	<i>p</i> = 0.015*
Total cholesterol (mmol.l <sup>-1</sup> )	4.42 ± 0.13	4.77 ± 0.10	<i>p</i> = 0.048*
Triglycerides (mmol.l <sup>-1</sup> )	0.89 ± 0.05	1.54 ± 0.13	<i>p</i> <0.0001***
HDL cholesterol (mmol.l <sup>-1</sup> )	1.21 ± 0.48	1.14 ± 0.04	<i>p</i> = 0.268
LDL cholesterol (mmol.l <sup>-1</sup> )	2.76 ± 0.12	2.96 ± 0.10	<i>p</i> = 0.225
ApoA (g.l <sup>-1</sup> )	1.62 ± 0.04	1.61 ± 0.03	<i>p</i> = 0.919
ApoB (g.l <sup>-1</sup> )	0.82 ± 0.02	0.87 ± 0.03	<i>p</i> = 0.317
<b>Inflammatory blood markers</b>			
hsCRP (mg.l <sup>-1</sup> )	1.39 ± 0.35	4.86 ± 0.54	<i>p</i> <0.0001***
Sedimentation rate (mm/h)	9.09 ± 1.85	15.68 ± 2.09	<i>p</i> = 0.030*
<b>Oxidative stress markers</b>			
Nitrites (µmol/l)	0.26 ± 0.02	0.39 ± 0.02	<i>p</i> = 0.003**
TBARS (µmol/l)	3.75 ± 0.39	4.95 ± 0.39	<i>p</i> = 0.048*
AOPP (mmol/l)	14.30 ± 1.01	16.67 ± 0.55	<i>p</i> = 0.028*
GSH (mmol/l)	17.61 ± 1.84	12.77 ± 1.14	<i>p</i> = 0.020*

Abbreviations: BMI, Body Mass Index; WHR, Waist-to-Hip Ratio; HDL cholesterol, High Density Lipoprotein cholesterol; LDL cholesterol, low Density Lipoprotein cholesterol; ApoA, ApolipoproteinA; ApoB, ApolipoproteinB; hsCRP, high sensitive C- Reactive Protein; TBARS: ThioBarbituric Acid Reactive Species; AOPP: Advanced Oxidized Protein Products; GSH : reduced Glutathione. Data are expressed as mean ± SEM; \* :*p*<0.05 ; \*\* :*p*<0.001 ; \*\*\* :*p*<0.0001

**Table 2- Microvascular function of control group and group with obesity**

	<b>Control (n=46)</b>	<b>Obesity (n=69)</b>	<b>P-value</b>
AUC (PU*sec)	8168.59 ± 833.26	5712.77 ± 553.56	0.012*
Basal CVC (PU/mmHg)	0.075 ± 0.006	0.053 ± 0.004	0.007 **
Peak ACh-CVC (PU/mmHg)	0.47 ± 0.05	0.32 ± 0.03	0.014 *
Peak LSH-CVC (PU/mmHg)	0.73 ± 0.06	0.63 ± 0.05	0.196
Δ ACh-CVC (PU/mmHg)	0.39 ± 0.04	0.27 ± 0.03	0.033*
Δ LSH-CVC (PU/mmHg)	0.66 ± 0.06	0.57 ± 0.05	0.295

☐

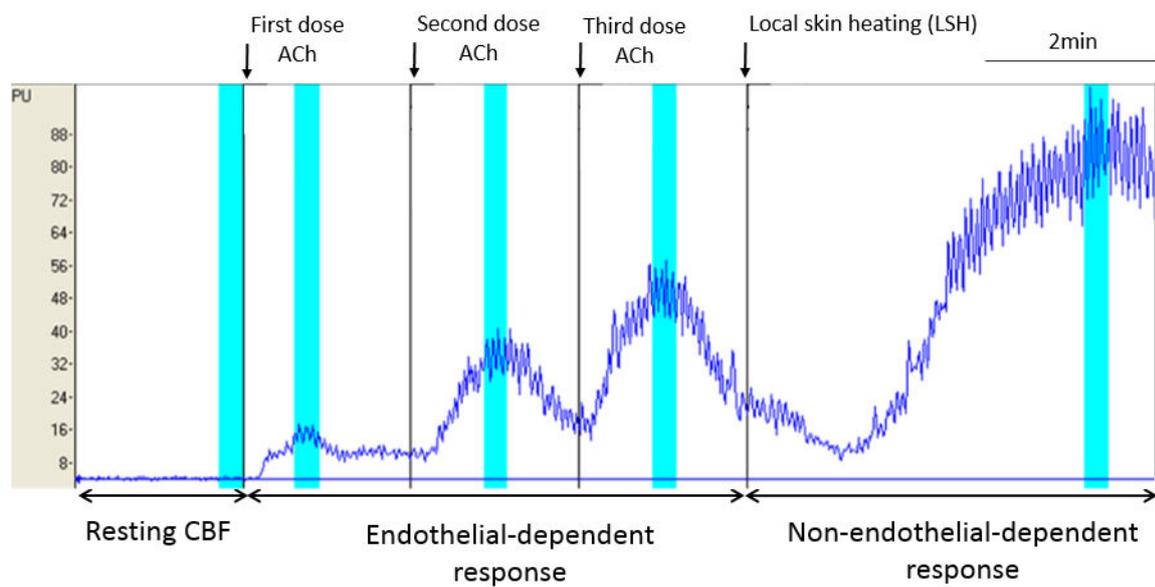
Abbreviations: PU: Perfusion Unit; ACh : Acetylcholine; LSH : Local Skin Heat; AUC: Area Under Curve; CVC: cutaneous vascular conductance; Δ ACh CVC : peak ACh CVC minus baseline; Δ LSH CVC: peak LSH CVC minus baseline. Data are expressed as mean ± SEM. \*:p<0.05 ; \*\*:p<0.01.

**Table 3- Relationships between circulating MPs levels and parameters of endothelial function**

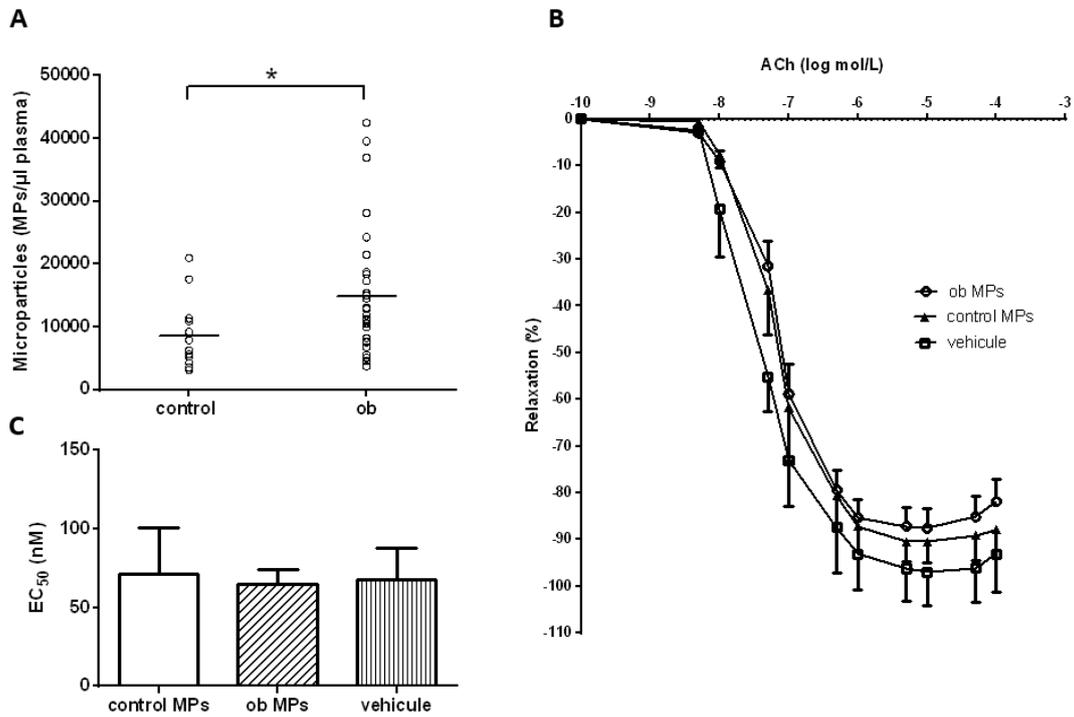
<b>Parameters</b>	<b>MPs levels (MPs/μl plasma)</b>			
	<b>Control (n=14)</b>		<b>Obesity (n=32)</b>	
	<b>r value</b>	<b>P-value</b>	<b>r value</b>	<b>P-value</b>
AUC (PU*sec)	0.639*	0.014	-0.194	0.288
Peak ACh-CVC (PU/mmHg)	0.658*	0.015	-0.076	0.731
Δ ACh-CVC (PU/mmHg)	0.659*	0.014	-0.066	0.764

☐

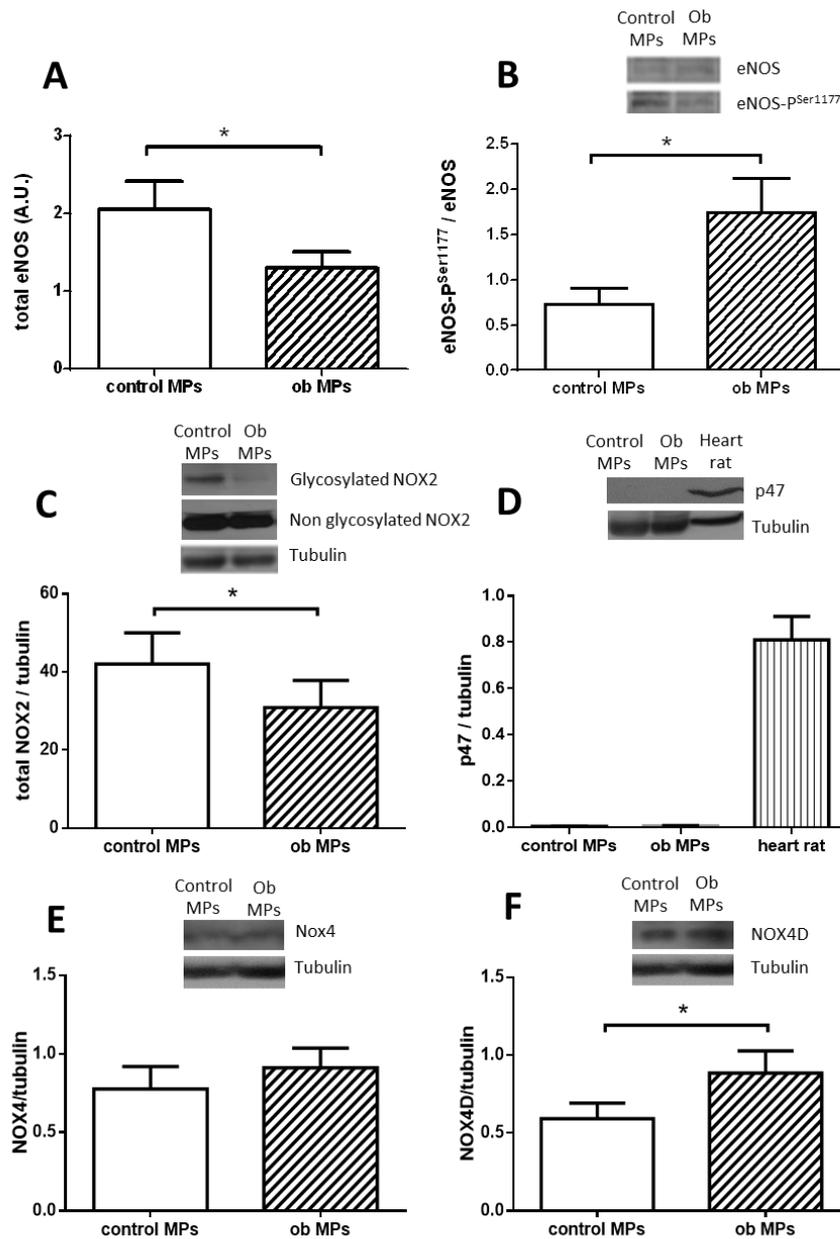
Abbreviations: MPs : Microparticles; AUC: Area Under Curve; PU : Perfusion Unit; ACh : Acetylcholine; CVC: Conductance Vascular Conductance; Δ ACh CVC : peak ACh CVC minus baseline; \* :p<0.05.



**Figure 1** - Typical Laser Doppler recordings of a normal response at the forearm of a healthy subject. Vertical lines separate the different recording phases: resting CBF, the three successive administrations of 2% ACh (delivered using 0.1mA current for 10s) and local skin heating (LSH). The third dose of ACh was used to determine the maximum ACh response (i.e., the peak ACh-CBF). Temperature was maintained at 33°C during baseline recording and ACh administration and increased to 44°C for LSH. PU: perfusion unit.



**Figure 2** – MP quantification and MP influence on *ex vivo* vasoreactivity. *A/* Quantification of circulating MP levels in controls (n=14) and subjects with obesity (n=32); *B* and *C/* Effect of MPs on the endothelium-dependent response of rat aorta rings incubated with vehicle (n=8), MPs from controls (n=6) or MPs from subjects with obesity (n=7) for 5 hours. *B/* Relaxation upon exposure to ACh; and *C/* ACh EC<sub>50</sub>. Values are the mean  $\pm$  SEM. \*p<0.05 versus control group.



**Figure 3** – Western blot analysis using MPs from subjects with obesity (n=6) and controls (n=6) to determine: A/ total eNOS expression; B/ the phosphorylated eNOS to total eNOS ratio (eNOS-P<sup>Ser1177</sup>/total eNOS); C/ total NOX2 expression (glycosylated and non-glycosylated NOX2); D/ p47 expression; E/ NOX4 expression; F/ NOX4D variant expression. Bands were quantified using tubulin. Values are the mean  $\pm$  SEM. \*p<0.05 versus control group.

## **Etude n°III : Effet de l'exercice physique sur le contenu en miRs des microparticules circulantes chez les sujets sains**

### **Aerobic exercise training modulates microparticles microRNAs in healthy subjects**

Saloua DIMASSI, Esma KARKENI, Soumaya BOUMIZA, Pascal LAURANT, Karim CHAHED, Zouhair TABKA, Jean-Francois LANDRIER, Catherine RIVA.

(Soumis dans *Vascular Pharmacology* impact factor 2015: 3.63)

#### **But de l'étude**

Le but de cette étude était d'analyser les effets d'un programme d'entraînement physique sur une population de jeunes femmes saines (sans aucun facteur de risque cardiovasculaire) d'une part, par l'exploration de leur fonction endothéliale et du statut inflammatoire, et d'autre part, par l'étude de leurs MPs circulantes et leur contenu en miRs.

#### **Méthodologie**

Un groupe de six jeunes femmes saines normo-pondérées et ne présentant aucun facteur de risque cardiovasculaire, a été enrôlé pour cette étude. La fonction endothéliale de ces sujets a été explorée par l'étude de la réponse endothélium-dépendante au niveau de la microcirculation cutanée. De plus, l'inflammation a été évaluée en analysant le taux de CRPus. L'étude des MPs a été effectuée par mesure des concentrations plasmatiques

par cytométrie en flux et l'analyse des miRs a été effectuée par RT-PCR. Le choix des miRs étudiés dans cette étude a été effectué sur la base de leur implication dans différents processus vasculaires (inflammation, fonction vasculaire). Ces sujets ont participé à un programme d'entraînement physique de 8 semaines de type aérobie intermittent à forte intensité. Les différentes mesures ont été effectuées avant et après le programme d'entraînement physique afin d'analyser les effets de l'exercice.

## **Principaux résultats**

Au bout de 8 semaines d'exercice physique, nous avons remarqué une amélioration de la fonction endothéliale pour notre population d'étude ainsi qu'en diminution de la CRPus suggérant une amélioration de statut inflammatoire. Le taux de MPs plasmatiques n'a toutefois pas été diminué par le programme d'entraînement. Par contre, nous avons pu observer une augmentation de l'expression des miR-21, miR-146a, miR-124a, miR-150 et miR-223 qui, pour certains ont été rapportés comme jouant des rôles anti-inflammatoires.

## **Conclusion**

Cette étude nous a permis dans un premier temps de constater que l'exercice physique permettait une augmentation de la réponse endothélium-dépendante ainsi qu'une diminution de l'inflammation même chez des sujets sains. Par ailleurs, même si l'exercice physique n'a pas joué sur la concentration des MPs circulantes, nous avons pu observer une augmentation de l'expression de certains miRs de leur contenu en miR vers un profil anti-inflammatoire. De par l'importance des miRs dans la régulation de

nombreux gènes impliqués dans l'homéostasie vasculaire, et du rôle des MPs circulantes leur assurant un transport intercellulaire, la modulation du contenu en miR des MPs observé suite au programme d'entraînement serait une adaptation physiologique à l'exercice physique qui pourrait bien intervenir dans les différents effets bénéfiques de cet exercice au niveau vasculaire.

## Article

### **Aerobic exercise training modulates microparticles miRNAs**

#### **in healthy subjects**

Saloua DIMASSI<sup>1,2</sup>, Esmâ KARKENI<sup>3,4,5</sup>, Soumaya BOUMIZA<sup>2</sup>, Pascal LAURANT<sup>1</sup>,

Karim CHAHED<sup>2</sup>, Zouhair TABKA<sup>2</sup>, Jean-François LANDRIER<sup>3,4,5</sup>, Catherine RIVA<sup>1</sup>.

1. Avignon University, LaPEC EA4278, F-84000, Avignon, France
2. Faculty of Medicine, Sousse University, UR12ES06, Physiologie de l'Exercice et Physiopathologie: de l'Intégré au Moléculaire « Biologie, Médecine et Santé », Sousse, Tunisia
3. INRA, UMR 1260, F-13385, Marseille, France.
4. INSERM, UMR 1062, Nutrition, Obésité et Risque Thrombotique F-13385, Marseille, France.
5. Aix-Marseille Université, Faculté de Médecine, F-13385, Marseille, France.

**Running title: Endothelial function, MP-miRNAs and exercise**

**Corresponding author:** Catherine RIVA

Address: Avignon University, LaPEC EA4278, 74 rue Louis Pasteur, 84000 Avignon, France

Telephone number: +33 (0) 490162933 / Fax number +33 (0) 490162901

E-mail: [catherine.riva@univ-avignon.fr](mailto:catherine.riva@univ-avignon.fr)

**Key words: miRNA, Microparticles, Physical exercise, Endothelial function, inflammation**

**Words count:** 2071 words

Total number of figures and tables: 2 tables and 1 figure

**Prior Presentation:**

Part of this study was presented in abstract form at the ISHR Bordeaux, France 2015

**Author Contributions:**

S.D. researched data/wrote the manuscript, E.K. researched data, S. B. researched data, K.C. reviewed the manuscript, Z.T. reviewed the manuscript, P.L. reviewed the manuscript, JF.L. designed experiments and reviewed the manuscript, C.R. designed experiments, researched data/wrote/edited the manuscript and is the guarantor of this work and, as such, had full access to all study data and takes responsibility for the data integrity and the data analysis accuracy.

**Disclosure:**

The authors have no potential conflicts of interest

**Acknowledgement:**

The authors want to thank Prof MC Alessi from INSERM, UMR 1062, INRA, UMR 1260, Dr H Debbabi, from the Faculty of Medicine, Sousse University, UR12ES06, and Dr A Miled from the Faculty of Medicine, Sousse University, Department of Clinical Biochemistry for the access to their core facility for biological measurements.

**Abbreviation list:**

ACh: Acetylcholine

BMI: Body Mass Index

CBF: Cutaneous Blood Flow

CVC: Cutaneous Vascular Conductance

eMPs: Endothelial-derived MicroParticles

HDLc: High density Lipoprotein Cholesterol

HsCRP: High Sensitive C-Reactive Protein

LDF: Laser Doppler Flowmetry

LDLc: Low Density Lipoprotein Cholesterol

LSH: Local Skin Heating

MPs: Microparticles

PFP: Platelet-Free Plasma

PRP: Platelet-Rich Plasma

RT: Room Temperature

RT-PCR: Real Time Polymerase Chain Reaction

TBARS: ThioBarbituric Acid Reactive Substances

THR: Target Heart Rate

## **Abstract:**

Exercise training is known to stimulate vascular function and remodeling in a shear stress and inflammation dependent manner. Microparticles (MPs) released from vascular cells in response to shear stress, play a role in cell-cell crosstalk through carrying bioactive molecules such as miRNAs. Thus, the aim of our study was to explore whether exercise training impacts vascular wall cells and contributes to vascular function improvement through the modulation of miRNAs-containing MPs release. Therefore, we investigated the presence in MPs of 9 miRNAs potentially associated to vascular function and inflammation: endothelial-related miRNAs, such as miR-126, miR-21 and miR-320a, monocyte/macrophage-related miRNAs, such as miR-155, miR-146a, miR-223, miR-124a, and miR-150, platelets-related miR-223 and miRNA-302a found in aorta. A group of sedentary women (n=6, BMI<25Kg/m<sup>2</sup>) recruited at F. Hached Hospital (Sousse, Tunisia) was enrolled in an 8-weeks training program. Vascular function was assessed by Laser Doppler Flowmetry, circulating MPs quantification, by flow cytometry, and miRNAs by real-time PCR, before and after exercise training. While exercise training improved significantly the endothelial-dependent vasorelaxation and decreased systemic inflammation, circulating MPs level and oxidant stress remained unchanged. The miRNA profile revealed that 1/ miR-155 and miR-302a were not detected in MPs neither before nor after training program; 2/ miR-21, miR-150, miR-320a, miR-146a, miR-124a, miR-126 and miR-223 were expressed in circulating MPs of sedentary women; and 3/ after training program, a significant increase of miR-21, miR-146a, miR-124a, miR-150 and miR-223 content was observed while miR-126 and miR-223 remained unchanged. Our results highlight the role of MPs as vehicle for miRNAs and the potential implication of miRNAs as effectors in the vascular wall in order to generate an optimal vascular function and to control inflammation.

## 1- Introduction

The study of miRNAs (small noncoding RNA molecules ~22 nt in length) is rapidly growing because they are involved in many human diseases in particular cardiovascular diseases. Recent studies demonstrated that miRNAs can be detected in circulating blood and may be useful as biomarkers for disease [1,2]. The mechanism of how circulating miRNAs are released into circulation remains unclear. However, increasing evidence suggests that miRNAs are actively secreted in microvesicles [2–4]. Extracellular membrane vesicles are important for cell-cell communication through numerous biological processes. In particular, microparticles (MPs) are typically defined by their size (0.1-1  $\mu\text{m}$  in diameter) [5], exposure of phosphatidylserine (PS) and the expression of surface antigens originating from their donor cells [5,6]. MPs vesiculation occurs as a cellular response to various physiological conditions including, apoptosis, senescence, cellular activation [7], shear stress and biochemical triggers (such as cytokines). Furthermore, several studies have reported that MPs could contribute to endothelial vascular homeostasis [8,9]. On the other side, very little is known about dynamic changes in microRNAs in response to common physiological perturbations such as physical exercise. Understanding how exercise can alter gene regulation at the level of microRNAs will likely prove important in optimizing therapeutic uses of exercise to benefit human health, in particular, for cardiovascular diseases in which both exercise and microRNAs play a key role in pathogenesis [10–12]. Among them, miRNAs potentially associated to vascular function and inflammation were investigated such as endothelial-related miRNAs, miR-126, miR-21 and miR-320a, monocyte/macrophage-related miRNAs, miR-155, miR-146a, miR-223, miR-124a, and miR-150, platelets-related miR-223 and miRNA-302a found in aorta. We proposed in this study to explore the effects of 8 week-training exercise program on vascular modulation, through

endothelial function exploration and inflammatory parameter measurements, and miRNAs-containing MPs profile in a sedentary population.

## **2- Materials and methods**

### **2-1- Subject population**

The study, approved by Farhat Hached Hospital Ethical Committee for research on humans in Tunisia, included 6 sedentary (self-reported, regular exercise aerobic trainers  $\leq 2$  days per week) Caucasian healthy women who signed an informed consent before inclusion. All participants underwent history and medical evaluations and had to meet the following criteria before enrollment in the study: 1) no participation in regular physical activity; 2) no current chronic health problems; 3) no past or present history of smoking; 4) no cardiovascular, metabolic or respiratory disease; 5) no overweight or obesity and 5) no consumption of any antioxidant supplementation within the past 6 months.

### **2-2- Anthropometric, biochemical and blood pressure measurements**

Body mass index (BMI) and mean arterial pressure (MAP=  $1/3$  (systolic blood pressure) +  $2/3$  (diastolic blood pressure)) was recorded. All subjects underwent biological parameters evaluation such as fasting glucose, total cholesterol, triglycerides, high-density lipoprotein cholesterol (HDLc) levels, apolipoproteins (ApoA and ApoB) and high sensitive C-reactive proteins (hsCRP). Low-density lipoprotein cholesterol (LDLc) levels were calculated according to Friedewald's formula. Oxidative damages

were estimated by measuring the lipid peroxidation level i.e. plasma levels of Thiobarbituric Acid Reactive substances (TBARS).

All measurements, blood collection and functional exploration were assessed at rest and 48h after the last session of exercise training, to avoid any short term effects of exercise training.

### **2-3- Endothelial function assessment**

Endothelial function was explored by assessing the forearm microvascular cutaneous vasoreactivity using Laser Doppler Flowmetry coupled with iontophoresis (Periflux System 5000, Perimed, Jarfalla Sweden). Endothelium-dependent vasodilation was evaluated by stimulation with 2% acetylcholine chloride (ACh) (Sigma Aldrich, Switzerland) and endothelium-independent vasodilation, after local skin heating (LSH) [13]. Briefly, cutaneous blood flow (CBF) was recorded at rest for 2min and during the functional exploration. Three doses of ACh were delivered using an anodal current (0,1mA for 10s) at 2-min intervals. Finally, the local skin temperature, initially maintained at 32°C, was increased to 44°C for 5min (LSH) [14]. Data were expressed as cutaneous vascular conductance (CVC), which represents the ratio between the CBF and MAP values, to take into account variations in blood pressure between subjects [15]. The endothelium-dependent response was calculated as the difference between the peak CVC upon ACh stimulation, (i.e. the CVC after the third dose of ACh) and the baseline CVC ( $\Delta$  ACh CVC). The endothelium-independent response, was calculated as the difference between the peak CVC following LSH-induced vasodilation and the baseline CVC ( $\Delta$  LSH CVC) [16].

### **2-4- MPs preparation and flow cytometry analysis**

#### **2-4-1- MPs preparation**

Citrated blood samples were collected and processed within 2h. Platelet-rich plasma (PRP) was collected after centrifugation at 1,500g for 15min at room temperature (RT). Platelet-free plasma (PFP) was obtained by further centrifugation at 13,000g for 2min at RT and the MP pellets after ultracentrifugation of the PFP at 20,000g for 90min at 4°C. MPs and PFP aliquots were stored at -80°C until analysis [17].

#### **2-4-2- MPs quantification by Flow cytometry**

MPs samples were analyzed using Accuri C6 flow cytometer and software (Accuri Cytometers, Ann Arbor, MI) to define the MPs gate and to quantify the absolute numbers of MPs per  $\mu\text{l}$  of plasma. Regions corresponding to MPs were identified in forward and side-angle light scatter intensity dot plot representation set at logarithmic gain, based on their diameter using standard microbeads (0.1 and 1.1 $\mu\text{m}$ ).

#### **2-4-3- MPs-containing miRNAs assessment**

Total RNAs including miRNAs were isolated from the MPs contained in 150 $\mu\text{L}$  of PFP using 700 $\mu\text{L}$  of Qiazol Lysis Reagent of the miRNeasy Micro Kit according to the manufacturer's instructions (Qiagen, Courtabœuf, France). Then, 3.5 $\mu\text{L}$  of miRNeasy Plasma Spike-In Control (Ce\_miR-39\_1;  $1.6 \times 10^8$  copies/ $\mu\text{L}$  working solution) (Qiagen, Courtabœuf, France) was added to the samples. cDNAs were synthesized from 75ng of total RNA in 20 $\mu\text{L}$  using 5X miScript Hiflex Buffer, 10x dNTP mix and miScript Reverse Transcriptase according to the manufacturer's instructions Qiagen (Courtabœuf, France). Real-time quantitative RT-PCR analysis was performed using the Mx3005P Real-Time PCR System (Stratagene, La Jolla, CA, USA) as previously described [18]. Reactions were performed in a 12.5 $\mu\text{L}$  volume containing 6.25 $\mu\text{L}$  of 2X QuantiTect SYBR Green

PCR Master Mix (Qiagen, Courtabœuf, France), 1.25µL of 10X miScript Universal Primer (Qiagen, Courtabœuf, France), 1.25µL of 10X miScript Primer Assay (Hs\_miR-21\_2 miScript Primer Assay, Hs\_miR-124a\_1 miScript Primer Assay, Hs\_miR-126\*\_1 miScript Primer Assay, Hs\_miR-146a\_1 miScript Primer Assay, Hs\_miR-150\_1 miScript Primer Assay, Hs\_miR-155\_2 miScript Primer Assay, Hs\_miR-223\_1 miScript Primer Assay, Hs\_miR-302a\_2 miScript Primer Assay, Hs\_miR-320a\_1 miScript Primer Assay, Ce\_miR-39\_1 miScript Primer Assay) (Qiagen, Courtabœuf, France) and 2.5µL of RNase-free water. After an initial incubation for 15min at 95°C, amplification reaction was performed in 40 cycles comprising 3 steps (94°C, 15s; 55°C, 30s and 70°C, 30s). For each condition, the expression was quantified in duplicate and the Ce\_miR-39\_1 miScript Primer Assay (Qiagen, Courtabœuf, France) was used as endogenous control in the comparative cycle threshold ( $C_T$ ) method [19].

## **2-5- Exercise-training program**

Subjects performed a high intensity interval aerobic exercise training program 3 times a week for 8 weeks. Heart rate monitoring was processed during sessions (Polar-NV-Finland) and exercise intensity was adjusted on an individual basis to ensure women exercised at their target heart rate (THR) calculated with Karvonen's formula [20] and based on 70 to 80% of heart rate reserve which correspond to a high intensity training zone [21]. Maximal heart rate was obtained with a multi-stage 20m shuttle run Luc Leger test before the program training [22]. Each training session consisted of a 15min warm-up before performing 3 rounds of 10min intervals at THR with ergometer or treadmill and 5min active recovery, giving a total exercise time of 45min. Each session ended with 20min of cool down relaxation.

## **2-6- Statistical analysis**

Data analysis was performed using SPSS 17.0 software package (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Results are expressed as means  $\pm$  standard error (SEM). Data were checked for normality using the Shapiro-Wilk test and tested by paired t-test, for parametric data, and by Wilcoxon signed rank test, for nonparametric data. Statistical significance was set at a p-value of  $p < 0.05$ .

### **3- Results**

A cohort of 6 young adult women of similar age, body mass index and fasting glucose was studied. An intervention of high interval training program was chosen, based on several studies which had proved its efficiency to stimulate changes in skeletal muscle metabolism, cardiovascular regulation and work performance [23]. In fact, after an 8 week-training program, significant reduction of weight was obtained but no modification of lipidemic, glycemic parameters and oxidative stress were observed (Table 1).

Table 1 - Clinical parameters and biochemical measurements of subjects before and after training program

Characteristics	Before	After	p
Age (years)	24.33 ± 1.47		
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	22.14 ± 0.95	21.86 ± 0.95 *	<b>0.04</b>
MAP (mmHg)	81.11 ± 1.64	81.66 ± 1.87	0.31
Fasting glucose (mmol/l)	5.04 ± 0.16	5.10 ± 0.13	0.49
Total cholesterol (mmol/l)	4.12 ± 0.29	4.16 ± 0.26	0.89
Triglycerides (mmol/l)	0.68 ± 0.11	0.75 ± 0.13	0.83
HDLc (mmol/l)	1.29 ± 0.13	1.16 ± 0.05	0.33
LDLc (mmol/l)	2.52 ± 0.18	2.41 ± 0.36	0.91
ApoA (g/l)	1.49 ± 0.07	1.45 ± 0.06	0.46
ApoB (g/l)	0.72 ± 0.05	0.71 ± 0.05	0.68
TBARS (µmol/l)	4.03 ± 2.27	3.47 ± 3.09	0.24

□

Abbreviations: BMI. Body Mass Index; WHR. Waist-to-Hip Ratio; HDLc. High Density Lipoprotein cholesterol; LDLc. low Density Lipoprotein cholesterol; ApoA. ApolipoproteinA; ApoB. ApolipoproteinB; TBARS: ThioBarbituric Acid Reactive Substances. Data are expressed as mean ± SEM; \* :p<0.05.

However, a significant decrease of inflammatory marker, i.e. hsCRP was noticed, revealing a diminished systemic inflammation (Table 2). Moreover, the exploration of endothelial function by laser Doppler displayed no modification of vascular conductance

at baseline (Basal CVC) after the 8 week-training program, but the flow-mediated endothelial-dependent relaxation ( $\Delta$  ACh CVC) was significantly increased from 0.18 to 0.32 PU/mmHg (p<0.05) after the 8 week-training program while the endothelium-independent vasodilatation remained unchanged (Table 2).

Table 2 – Inflammatory parameter, endothelial function and MPs measurements for subjects before and after training program

Characteristics	Before	After	p
<b>Inflammatory marker</b>			
hsCRP (mg/l)	0.55 ± 0.16	0.35 ± 0.10*	<b>0.04</b>
<b>Endothelial function parameters</b>			
Basal CVC (PU/mmHg)	0.05 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.34
$\Delta$ ACh CVC (PU/mmHg)	0.18 ± 0.05	0.32 ± 0.10*	<b>0.04</b>
$\Delta$ LSH CVC (PU/mmHg)	0.60 ± 0.19	0.80 ± 0.11	0.17
<b>MPs measurement</b>			
MPs (MPs/ $\mu$ l plasma)	4444.40 ± 439.55	5663.00 ± 807.12	0.22

②

Abbreviations: hsCRP. high sensitive C-Reactive Protein; PU: Perfusion Unit; ACh: Acetylcholine; LSH : Local Skin Heat; CVC: cutaneous vascular conductance;  $\Delta$  ACh CVC : peak ACh CVC minus baseline;  $\Delta$  LSH CVC: peak LSH CVC minus baseline;; MPs: microparticles. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM.\*:p<0.05.

The analysis of circulating MPs before and after 8 week-training program did not display any significant change of MPs plasmatic levels (Table 2). Furthermore, miRNAs in MPs were detected using quantitative reverse transcription PCR analysis. The analysis of a subset of 9 miRNAs revealed that, two miRNAs (miR-155 and miR-302a) were

undetected in all samples, while miR-150, miR-320a, miR-146a, miR-124a, miR-21, miR-126 and miR-223 were present in circulating MPs. Moreover, after 8 week-training program, miR-150, miR-320a, miR-146a, miR-124a and miR-21 expression in MPs was significantly enhanced while miR-126 and miR-223 expression remained unchanged (Figure 1).

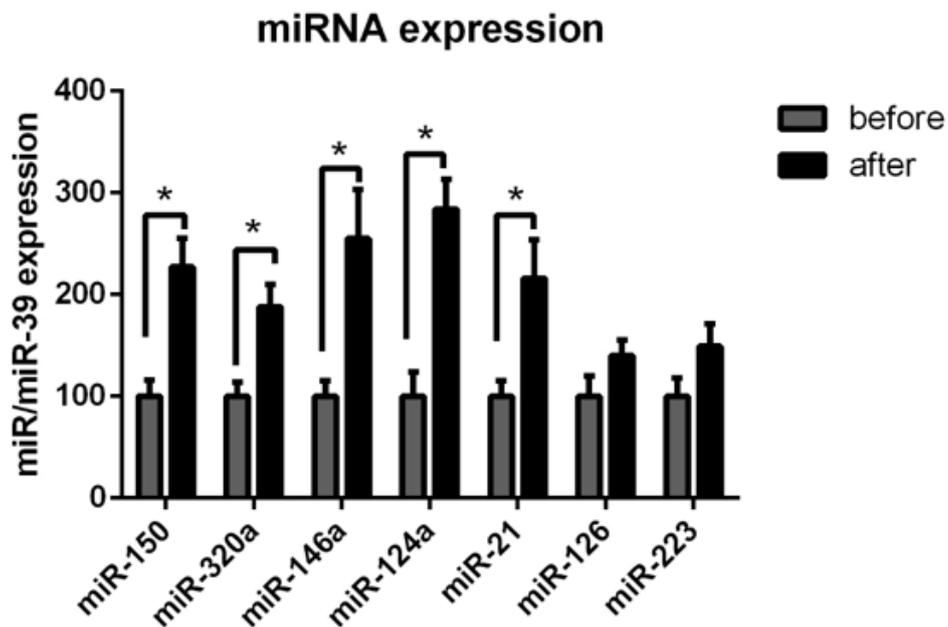


Figure 1: MPs-containing miR expression before and after training exercise; Values are mean  $\pm$  SEM; \*:p<0.05.

#### 4- Discussion

The present study focused on the effects of a 8 week-training program on vascular reactivity, MPs quantification and MP-miRNAs content in a group of healthy young sedentary women. Our principal finding demonstrated that aerobic-type exercise training 1/ improved endothelial vasorelaxation and reduced systemic inflammation; but 2/ didn't

modify circulating MPs levels. In addition, this is the first study, we believe, to demonstrate substantial changes in miRNAs expression in MPs in healthy individuals following 8 week-training program.

In this study we have shown that circulating MPs were retrieved at low concentrations in plasma samples of healthy sedentary women. These circulating MPs from healthy subjects were at basal levels and lower than the circulating level encountered in pathological situations such as hypertension [24], diabetes [25], obesity [26] or coronary arteries diseases [27]. The paracrine secretion of MPs has been proved to be key effectors in inflammation, angiogenesis and vascular disorders [9,28], and is generally thought to be the principal transport vehicles for miRNAs in circulation [29]. In fact, because of their membrane vesicles constitution, MPs can protect from RNases in the plasma or serum, are also resistant to repetitive freezing and thawing cycle [30], and might facilitate communication within different cells. Therefore, we investigated the presence and the abundance in MPs of 9 miRNAs potentially associated to vascular function and/or dysfunction and inflammation: endothelial-related miRNAs, such as miR-126 and miR-21, miR-320a, monocyte/macrophage-related miRNAs, such as miR-155, miR-146a, miR-223, and miR-124a, and miR-150, platelet related miR-223 [31] and miRNA-302a found in aorta [32].

Firstly, the miRNAs are secreted from cells into the circulation or are taken up from circulation into cells, suggesting that minimal miRNA degradation occurs due to RNases present in body fluids [1]. This may be attributed to the protection of miRNAs from RNases by intracellular small vesicles such as exosomes, microvesicles, and apoptotic bodies [33,34]. This hypothesis can be confirmed by our data, since we were able to detect significant level of several miRNAs in circulating MPs from healthy subjects. Furthermore, it has been suggested that exercise transiently or adaptively

changes the level of c-miRNAs in humans [35–37], leading to post-transcriptional regulation of proteins associated with energy metabolism and angiogenesis in adipocytes, hepatocytes, and endothelial cells. Among the miRNAs analysed, miR-155 and miR-302a have been reported to be highly implicated in cardiovascular disease, such as miR-302 a modulator of cholesterol homeostasis and atherosclerosis [32] and miR-155 implicated in atherogenesis in vivo [38] and inflammation during cardiovascular diseases, the metabolic syndrome, ageing [39] and obesity [40]. In our study, these two miRNAs couldn't be detected in circulating MPs of healthy women. It is conceivable to think that, these miRNAs would be under-expressed in non-pathological condition and therefore not present in MPs of healthy subjects. On the other hand, miR-21, miR-150, miR-320a, miR-146a, miR-124a, miR-126 and miR-223 were detected in circulating MPs of healthy women. All these miRNAs have been implicated as negative regulators of inflammatory processes at the transcriptional level [41]. Among them miR-146a and miR-223 have been reported to be a negative regulator of the immune response through inhibition of the expression of the mRNAs encoding TRAF6 and IRAK1, two proteins involved in the transcription of TLR signaling leading to NF- $\kappa$ B activation [42], and anti-inflammatory effects were also observed for miR-124a by the inhibition of adhesion and infiltration of inflammatory cells into the endothelial space [43].

Exercise training is considered as an efficient way to increase resistance to cardiovascular diseases through mediating adaptive responses. In the present study, we reported that a 8 week-training program reduced systemic inflammation, through reduction of circulating CRP levels, in healthy young women which is in total accordance with previous results [44,45]. Aside, we also observed an increased blood flow, and likely increased shear stress as reported by Green et al. [46] resulting in an improved endothelial function through an enhanced endothelial-dependent vasodilation. Wang et al. [47] have

already observed enhanced skin blood flow and cutaneous vascular conductance of healthy sedentary subjects in response to a moderate-intensity exercise (8 weeks). Moreover, regular aerobic exercise could restore the loss in endothelial-dependent vasodilation in healthy middle-aged and older men [48]. Only few studies were interested on the effect of exercise on shear stress with consequently on circulating MPs and on miRNAs. We reported no significant changes in MPs circulating levels after 8 week-training program in the healthy young women. While Babbit et al. [49] observed a reduction in endothelial-derived MPs (EMPs) circulating levels after a 6-month aerobic exercise training for sedentary middle-to-older-aged subjects, they did not quantified total MPs circulating level. Moreover, other studies reported an elevation of EMPs circulating levels associated with reduced daily physical activity and inactivation [50,51] but no correlations were found between EMPs levels and flow mediated dilation measurement [50].

Furthermore, after 8-week training, the exploration of MPs-containing miRNAs showed that pro-inflammatory miR-302a and miR-155 were still not detected. But, a significant increase of miR-21, miR-146a, miR-124a, miR-150 and miR-223 abundance was observed after 8 week-training program while miR-126 and miR-223 remained unchanged. It is well known that aerobic exercise is a potent physiological stimulant by inducing laminar shear stress [52], Interestingly, studies reported that high unidirectional shear stress could enhance expression of a distinct group of miRNAs in endothelial cells, and among them miR-21 [53]. It is conceivable to speculate that enhanced expression of miRNAs in MPs could be a result of the 8 week-training program. Moreover, Weber et al. observed that HUVEC overexpressing miR-21, after shear stress stimulation, had decreased apoptosis and increased eNOS phosphorylation and nitric oxide production through a PI3K/Akt/eNOS pathway, which would suggest an implication of these

miRNAs in the beneficial effects of exercise on endothelial function [53]. However, studies investigating miRNA modulation by exercise, reported contradictory results [54]. In fact, Baggish et al. [35] observed enhanced plasmatic miR-21, mi-146a or miR-126 expression, after 90 days exercise training for a group of trained men [55], whereas, Nielson et al. [56] identified seven miRNAs, among them miR-21, with decreased levels in plasma of young healthy men, in response to a 12 week chronic training. These discrepancy could be the result of population characteristics as it was suggested that plasmatic miRNA levels in response to exercise differ between trained and non-trained subjects [57]. Moreover, studies reported that exercise type, duration and intensity could largely influence circulating miRNAs expression and so could also partially explain these controversial results [37,58].

In total, exercise training can be considered as an efficient way prevent cardiovascular diseases through mediating adaptive reactions. Since chronic inflammation is clearly associated to cardiovascular disease, diabetes mellitus, adipogenesis and obesity [59,60], regulatory miRNAs could be involved in the control of vascular inflammation and vascular function. On the other hand, paracrine release of MPs, by transporting these miRNAs through the circulation, may highly contribute to these mechanisms. Besides, further research is warranted for the characterization of detailed mechanisms and the physiological and pathological changes in miRNAs implicated into this vascular adaptive response to physical exercise. Nevertheless, the field of miRNAs research is attractive and is expected to present more novel findings for the field of therapeutics.

## **5- References**

- [1] P.S. Mitchell, R.K. Parkin, E.M. Kroh, B.R. Fritz, S.K. Wyman, E.L. Pogosova-Agadjanyan, et al., Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105 (2008) 10513–10518. doi:10.1073/pnas.0804549105.
- [2] J. Skog, T. Würdinger, S. van Rijn, D.H. Meijer, L. Gainche, W.T. Curry, et al., Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers, *Nat. Cell Biol.* 10 (2008) 1470–1476. doi:10.1038/ncb1800.
- [3] M.P. Hunter, N. Ismail, X. Zhang, B.D. Aguda, E.J. Lee, L. Yu, et al., Detection of microRNA Expression in Human Peripheral Blood Microvesicles, *PLoS ONE*. 3 (2008) e3694. doi:10.1371/journal.pone.0003694.
- [4] A. Zernecke, K. Bidzhekov, H. Noels, E. Shagdarsuren, L. Gan, B. Denecke, et al., Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection, *Sci. Signal.* 2 (2009) ra81. doi:10.1126/scisignal.2000610.
- [5] J. Gong, R. Jaiswal, J.-M. Mathys, V. Combes, G.E.R. Grau, M. Bebawy, Microparticles and their emerging role in cancer multidrug resistance, *Cancer Treat. Rev.* 38 (2012) 226–234. doi:10.1016/j.ctrv.2011.06.005.
- [6] O. Morel, F. Toti, B. Hugel, B. Bakouboula, L. Camoin-Jau, F. Dignat-George, et al., Procoagulant Microparticles Disrupting the Vascular Homeostasis Equation?, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26 (2006) 2594–2604. doi:10.1161/01.ATV.0000246775.14471.26.
- [7] A. Janowska-Wieczorek, L.A. Marquez-Curtis, M. Wysoczynski, M.Z. Ratajczak, Enhancing effect of platelet-derived microvesicles on the invasive potential of breast cancer cells, *Transfusion (Paris)*. 46 (2006) 1199–1209. doi:10.1111/j.1537-2995.2006.00871.x.
- [8] G.N. Chironi, C.M. Boulanger, A. Simon, F. Dignat-George, J.-M. Freyssinet, A. Tedgui, Endothelial microparticles in diseases, *Cell Tissue Res.* 335 (2008) 143–151. doi:10.1007/s00441-008-0710-9.
- [9] M.C. Martinez, S. Tual-Chalot, D. Leonetti, R. Andriantsitohaina, Microparticles: targets and tools in cardiovascular disease, *Trends Pharmacol. Sci.* 32 (2011) 659–665. doi:10.1016/j.tips.2011.06.005.
- [10] M. Franco, R.S. Cooper, U. Bilal, V. Fuster, Challenges and Opportunities for Cardiovascular Disease Prevention, *Am. J. Med.* 124 (2011) 95–102. doi:10.1016/j.amjmed.2010.08.015.
- [11] N. Garbacki, E. Di Valentin, V.A. Huynh-Thu, P. Geurts, A. Irrthum, C. Crahay, et al., MicroRNAs Profiling in Murine Models of Acute and Chronic Asthma: A Relationship with mRNAs Targets, *PLoS ONE*. 6 (2011) e16509. doi:10.1371/journal.pone.0016509.
- [12] M. Hoekstra, C.A.C. van der Lans, B. Halvorsen, L. Gullestad, J. Kuiper, P. Aukrust, et al., The peripheral blood mononuclear cell microRNA signature of coronary artery disease, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 394 (2010) 792–797. doi:10.1016/j.bbrc.2010.03.075.
- [13] T.T. van Sloten, S. Czernichow, A.J. Houben, A.D. Protogerou, R.M. Henry, D.M. Muris, et al., Association Between Arterial Stiffness and Skin Microvascular Function: The SUVIMAX2 Study and The Maastricht Study, *Am. J. Hypertens.* (2014). doi:10.1093/ajh/hpu246.
- [14] J.-J. Mourad, G. des Guez, H. Debbabi, B.I. Levy, Blood pressure rise following angiogenesis inhibition by bevacizumab. A crucial role for microcirculation, *Ann. Oncol.* (2007) mdm550. doi:10.1093/annonc/mdm550.

- [15] D.S. O’Leary, Regional vascular resistance vs. conductance: which index for baroreflex responses?, *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* 260 (1991) H632–H637.
- [16] R. de Moraes, D. Van Bavel, B.S. de Moraes, E. Tibiriçá, Effects of dietary creatine supplementation on systemic microvascular density and reactivity in healthy young adults, *Nutr. J.* 13 (2014). doi:10.1186/1475-2891-13-115.
- [17] S. Robert, P. Poncelet, R. Lacroix, L. Arnaud, L. Giraudo, A. Hauchard, et al., Standardization of platelet-derived microparticle counting using calibrated beads and a Cytomics FC500 routine flow cytometer: a first step towards multicenter studies?, *J. Thromb. Haemost.* 7 (2009) 190–197. doi:10.1111/j.1538-7836.2008.03200.x.
- [18] J.-F. Landrier, C. Malezet-Desmoulins, E. Reboul, A. Marie Lorec, M. Josèphe Amiot, P. Borel, Comparison of different vehicles to study the effect of tocopherols on gene expression in intestinal cells, *Free Radic. Res.* 42 (2008) 523–530. doi:10.1080/10715760802098859.
- [19] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method, *Methods.* 25 (2001) 402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262.
- [20] M. Karvonen, The effects of training on heart rate. A longitudinal study, *Ann Ned Exp Biol Fenn.* 35 (1957) 307–315.
- [21] L. Vanhees, N. Geladas, D. Hansen, E. Kouidi, J. Niebauer, Z. Reiner, et al., Importance of characteristics and modalities of physical activity and exercise in the management of cardiovascular health in individuals with cardiovascular risk factors: recommendations from the EACPR (Part II), *Eur. J. Prev. Cardiol.* 19 (2012) 1005–1033. doi:10.1177/1741826711430926.
- [22] L.A. Léger, J. Lambert, A maximal multistage 20-m shuttle run test to predict VO<sub>2</sub> max, *Eur. J. Appl. Physiol.* 49 (1982) 1–12. doi:10.1007/BF00428958.
- [23] M.J. Gibala, S.L. McGee, Metabolic Adaptations to Short-term High-Intensity Interval Training: A Little Pain for a Lot of Gain?, *Exerc. Sport Sci. Rev.* 36 (2008) 58–63. doi:10.1097/JES.0b013e318168ec1f.
- [24] S. Nomura, N. Inami, A. Shouzu, F. Urase, Y. Maeda, Correlation and association between plasma platelet-, monocyte- and endothelial cell-derived microparticles in hypertensive patients with type 2 diabetes mellitus, *Platelets.* 20 (2009) 406–414. doi:10.1080/09537100903114545.
- [25] B. Feng, Y. Chen, Y. Luo, M. Chen, X. Li, Y. Ni, Circulating level of microparticles and their correlation with arterial elasticity and endothelium-dependent dilation in patients with type 2 diabetes mellitus, *Atherosclerosis.* 208 (2010) 264–269. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2009.06.037.
- [26] K. Esposito, M. Ciotola, B. Schisano, R. Gualdiero, L. Sardelli, L. Misso, et al., Endothelial Microparticles Correlate with Endothelial Dysfunction in Obese Women, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91 (2006) 3676–3679. doi:10.1210/jc.2006-0851.
- [27] N. Werner, S. Wassmann, P. Ahlers, S. Kosiol, G. Nickenig, Circulating CD31+/annexin V+ apoptotic microparticles correlate with coronary endothelial function in patients with coronary artery disease, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26 (2006) 112–116. doi:10.1161/01.ATV.0000191634.13057.15.
- [28] F. Sabatier, R. Lacroix, L. Camoin-Jau, F. Anfosso, J. Sampol, F. Dignat-George, Cellules endothéliales circulantes, microparticules et progéniteurs : vers la définition de la « vasculocompétence », *Rev. Médecine Interne.* 32 (2011) 54–63. doi:10.1016/j.revmed.2010.03.341.

- [29] P. Diehl, A. Fricke, L. Sander, J. Stamm, N. Bassler, N. Htun, et al., Microparticles: major transport vehicles for distinct microRNAs in circulation, *Cardiovasc. Res.* 93 (2012) 633–644. doi:10.1093/cvr/cvs007.
- [30] T.S. Chen, R.C. Lai, M.M. Lee, A.B.H. Choo, C.N. Lee, S.K. Lim, Mesenchymal stem cell secretes microparticles enriched in pre-microRNAs, *Nucleic Acids Res.* 38 (2010) 215–224. doi:10.1093/nar/gkp857.
- [31] K. Kin, S. Miyagawa, S. Fukushima, Y. Shirakawa, K. Torikai, K. Shimamura, et al., Tissue- and Plasma-Specific MicroRNA Signatures for Atherosclerotic Abdominal Aortic Aneurysm, *J. Am. Heart Assoc.* 1 (2012) e000745. doi:10.1161/JAHA.112.000745.
- [32] S. Meiler, Y. Baumer, E. Toulmin, K. Seng, W.A. Boisvert, MicroRNA 302a Is a Novel Modulator of Cholesterol Homeostasis and Atherosclerosis, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 35 (2015) 323–331. doi:10.1161/ATVBAHA.114.304878.
- [33] K.C. Vickers, A.T. Remaley, Lipid-based carriers of microRNAs and intercellular communication:, *Curr. Opin. Lipidol.* 23 (2012) 91–97. doi:10.1097/MOL.0b013e328350a425.
- [34] G. Raposo, W. Stoorvogel, Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends, *J. Cell Biol.* 200 (2013) 373–383. doi:10.1083/jcb.201211138.
- [35] A.L. Baggish, A. Hale, R.B. Weiner, G.D. Lewis, D. Systrom, F. Wang, et al., Dynamic regulation of circulating microRNA during acute exhaustive exercise and sustained aerobic exercise training, *J. Physiol.* 589 (2011) 3983–3994. doi:10.1113/jphysiol.2011.213363.
- [36] D. de Gonzalo-Calvo, A. Dávalos, A. Montero, Á. García-González, I. Tyshkovska, A.G. Medina, et al., Circulating inflammatory miRNA signature in response to different doses of aerobic exercise, *J. Appl. Physiol.* (2015) jap.00077.2015. doi:10.1152/japphysiol.00077.2015.
- [37] T. Xu, Q. Liu, J. Yao, Y. Dai, H. Wang, J. Xiao, Circulating microRNAs in response to exercise, *Scand. J. Med. Sci. Sports.* 25 (2015) e149–e154. doi:10.1111/sms.12421.
- [38] X. Ma, C. Ma, X. Zheng, MicroRNA-155 in the Pathogenesis of Atherosclerosis: A Conflicting Role?, *Heart Lung Circ.* 22 (2013) 811–818. doi:10.1016/j.hlc.2013.05.651.
- [39] B. Schroen, S. Heymans, Small but smart—microRNAs in the centre of inflammatory processes during cardiovascular diseases, the metabolic syndrome, and ageing, *Cardiovasc. Res.* 93 (2012) 605–613. doi:10.1093/cvr/cvr268.
- [40] E. Karkeni, J. Astier, F. Tourniaire, M. El Abed, B. Romier, E. Gouranton, Obesity-associated inflammation induces microRNA-155 expression in adipocytes and adipose tissue: outcome on adipocyte function. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016 Feb 1:jc20153410.
- [41] L.A. O’Neill, F.J. Sheedy, C.E. McCoy, MicroRNAs: the fine-tuners of Toll-like receptor signalling, *Nat. Rev. Immunol.* 11 (2011) 163–175. doi:10.1038/nri2957.
- [42] K.D. Taganov, M.P. Boldin, K.-J. Chang, D. Baltimore, NF- $\kappa$ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 12481–12486. doi:10.1073/pnas.0605298103.
- [43] M. Hulsmans, D.D. Keyzer, P. Holvoet, MicroRNAs regulating oxidative stress and inflammation in relation to obesity and atherosclerosis, *FASEB J.* 25 (2011) 2515–2527. doi:10.1096/fj.11-181149.
- [44] E.S. Ford, Does exercise reduce inflammation? Physical activity and C-reactive protein among U.S. adults: *Epidemiology*, 13 (2002). 5:561-8.

- [45] F. Mattusch, B. Dufaux, O. Heine, I. Mertens, R. Rost, Reduction of the Plasma Concentration of C-Reactive Protein Following Nine Months of Endurance Training, *Int. J. Sports Med.* 21 (2000) 21–24. doi:10.1055/s-2000-8852.
- [46] D.J. Green, H.H. Carter, M.G. Fitzsimons, N.T. Cable, D.H.J. Thijssen, L.H. Naylor. Obligatory role of hyperaemia and stress in microvascular adaptation to repeated heating in humans. *J. Physiol.* (2010) 588, 9: 1571-1577 doi: 10.1113/jphysiol.2010.186965.
- [47] J.S. Wang, Effects of exercise training and detraining on cutaneous microvascular function in man: the regulatory role of endothelium-dependent dilation in skin vasculature, *Eur. J. Appl. Physiol.* 93 (2004) 429–434. doi:10.1007/s00421-004-1176-4.
- [48] C.A. DeSouza, L.F. Shapiro, C.M. Clevenger, F.A. Dinunno, K.D. Monahan, H. Tanaka, et al., Regular Aerobic Exercise Prevents and Restores Age-Related Declines in Endothelium-Dependent Vasodilation in Healthy Men, *Circulation.* 102 (2000) 1351–1357. doi:10.1161/01.CIR.102.12.1351.
- [49] D.M. Babbitt, K.M. Diaz, D.L. Fearheller, K.M. Sturgeon, A.M. Perkins, P. Veerabhadrapa, et al., Endothelial Activation Microparticles and Inflammation Status Improve with Exercise Training in African Americans, *Int. J. Hypertens.* 2013 (2013) 1–8. doi:10.1155/2013/538017.
- [50] L.J. Boyle, D.P. Credeur, N.T. Jenkins, J. Padilla, H.J. Leidy, J.P. Thyfault, et al., Impact of reduced daily physical activity on conduit artery flow-mediated dilation and circulating endothelial microparticles, *J. Appl. Physiol.* 115 (2013) 1519–1525. doi:10.1152/jappphysiol.00837.2013.
- [51] N.M. Navasolava, F. Dignat-George, F. Sabatier, I.M. Larina, C. Demiot, J.-O. Fortrat, et al., Enforced physical inactivity increases endothelial microparticle levels in healthy volunteers, *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* 299 (2010) H248–H256. doi:10.1152/ajpheart.00152.2010.
- [52] R. Hambrecht, A. Wolf, S. Gielen, A. Linke, J. Hofer, S. Erbs, et al., Effect of exercise on coronary endothelial function in patients with coronary artery disease, *N. Engl. J. Med.* 342 (2000) 454–460. doi:10.1056/NEJM200002173420702.
- [53] M. Weber, M.B. Baker, J.P. Moore, C.D. Searles, MiR-21 is induced in endothelial cells by shear stress and modulates apoptosis and eNOS activity, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 393 (2010) 643–648. doi:10.1016/j.bbrc.2010.02.045.
- [54] S. Radom-Aizik, F. Zaldivar, S.-Y. Leu, G.R. Adams, S. Oliver, D.M. Cooper, Effects of Exercise on microRNA Expression in Young Males Peripheral Blood Mononuclear Cells, *Clin. Transl. Sci.* 5 (2012) 32–38. doi:10.1111/j.1752-8062.2011.00384.x.
- [55] M. Uhlemann, S. Möbius-Winkler, S. Fikenzer, J. Adam, M. Redlich, S. Möhlenkamp, et al., Circulating microRNA-126 increases after different forms of endurance exercise in healthy adults, *Eur. J. Prev. Cardiol.* 21 (2014) 484–491. doi:10.1177/2047487312467902.
- [56] S. Nielsen, T. Åkerström, A. Rinnov, C. Yfanti, C. Scheele, B.K. Pedersen, et al., The miRNA Plasma Signature in Response to Acute Aerobic Exercise and Endurance Training, *PLoS ONE.* 9 (2014) e87308. doi:10.1371/journal.pone.0087308.
- [57] A. Bye, H. Røsjø, S.T. Aspenes, G. Condorelli, T. Omland, U. Wisløff, Circulating MicroRNAs and Aerobic Fitness – The HUNT-Study, *PLoS ONE.* 8 (2013) e57496. doi:10.1371/journal.pone.0057496.

- [58] S. Banzet, M. Chennaoui, O. Girard, S. Racinais, C. Drogou, H. Chalabi, et al., Changes in circulating microRNAs levels with exercise modality, *J. Appl. Physiol.* 115 (2013) 1237–1244. doi:10.1152/jappphysiol.00075.2013.
- [59] G. Singer, N. Granger, Inflammatory Responses Underlying the Microvascular Dysfunction Associated with Obesity and Insulin Resistance, *Microcirculation*. 14 (2007) 375–387. doi:10.1080/10739680701283158.
- [60] R. Ross, Atherosclerosis — An Inflammatory Disease, *N. Engl. J. Med.* 340 (1999) 115–126. doi:10.1056/NEJM199901143400207.

## **Etude n°IV : effet de l'exercice physique sur une population de jeunes femmes obèses**

### **But de l'étude**

Après nous être intéressé aux effets de l'exercice physique sur une population saine, nous nous sommes proposés pour cette étude d'explorer les effets d'un programme d'exercice physique aérobie de 8 semaines, sur les principaux paramètres impliqués dans la fonction vasculaire (vasoréactivité, inflammation, stress oxydant) sur une population de sujets obèses, sur les MPs circulantes et notamment leur contenu en plusieurs miR impliqués dans ces différentes fonctions biologiques.

### **Méthodologie**

Pour cette étude, 9 jeunes femmes obèses et sédentaires ont été recrutées pour effectuer un programme d'entraînement de type aérobie intermittent à haute intensité. Un groupe de 6 jeunes femmes sédentaires et appariées en âge, a été utilisé comme groupe contrôle non exercé. A l'inclusion, tous les sujets ont bénéficié d'un bilan sanguin incluant le dosage de la glycémie, de différents paramètres lipidiques et de marqueurs du stress oxydant et de l'inflammation. Une exploration fonctionnelle de la vasoréactivité vasculaire a été effectuée au niveau de la microcirculation cutanée par technique de laser doppler couplée à l'iontophorèse. L'analyse des MPs a été effectuée quantitativement par technique de cytométrie en flux puis les miRs ont été isolés à partir des MPs puis étudiés par RT-PCR. Le groupe de sujets obèses a, par la suite, suivi un programme d'exercice physique à raison de 3 séances/semaine pendant 8 semaines à une intensité de 80%

FC<sub>réserve</sub>. Les différents paramètres initialement mesurés avant le protocole d'entraînement ont ensuite été analysés, pour chaque sujet obèse, à la fin de ce programme d'entraînement.

## Résultats

### 1. Caractérisation des groupes obèses et contrôle avant le protocole d'entraînement

#### 1.1. Paramètres anthropométriques et biologiques

Avant le début du programme d'entraînement, le groupe « obèse » se caractérisait par une IMC et une PAM significativement plus élevées par rapport au groupe contrôle. Les différents paramètres lipidiques et glycémique n'étaient toutefois pas significativement différents entre les deux groupes (Tableau III).

*Tableau III : Caractéristiques du groupe obèse et contrôle avant le programme d'entraînement*

Caractéristiques	Témoins (n=6)	Obèses (n=9)
Age (ans)	24.33 ± 1.47	21.88 ± 0.99
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	22.14 ± 0.95	33.33 ± 1.86 *
PAM (mmHg)	81.11 ± 1.64	90.00 ± 1.92 *
Glycémie (mmol/l)	5.04 ± 0.16	5.40 ± 0.11
Cholestérol total (mmol/l)	4.12 ± 0.29	4.56 ± 0.31
Triglycérides (mmol/l)	0.68 ± 0.11	1.13 ± 0.23
HDLc (mmol/l)	1.30 ± 0.16	1.06 ± 0.08
LDLc (mmol/l)	2.52 ± 0.18	3.16 ± 0.28
ApoA (g/l)	1.49 ± 0.07	1.42 ± 0.04
ApoB (g/l)	0.72 ± 0.05	0.76 ± 0.06

*IMC : Indice de Masse Corporelle ; PAM : Pression Artérielle Moyenne ; HDLc : High Density Lipoprotein cholesterol ; LDLc : Low Density Lipoprotein cholesterol ; ApoA : Apolipoprotéine A ; ApoB : Apolipoprotéine B ; \*p<0.05.*

## 1.2. Paramètres du stress oxydant

Le dosage de marqueurs renseignant sur la balance oxydative et les dommages oxydatifs, GSH, AOPP et TBARS, ne nous ont pas permis d'observer de variations significatives entre les deux groupes. De même, le taux de nitrites plasmatiques n'était pas significativement différent entre le groupe obèse et contrôle (Tableau IV).

*Tableau IV : Paramètres du stress oxydant pour le groupe obèse et contrôle avant le programme d'entraînement*

Caractéristiques	Témoins (n=6)	Obèses (n=9)
Nitrites (µmol/l)	0.07 ± 0.03	0.21 ± 0.06
TBARS (µmol/l)	4.03 ± 2.27	7.27 ± 1.08
AOPP (mmol/l)	8.81 ± 1.10	10.46 ± 1.62
GSH (µmol/l)	5.83 ± 1.08	5.84 ± 1.05

*TBARS : Thiol Barbituric Acid Reactive Substances ; AOPP: Advanced Oxidation Protein Products; GSH: Glutathion réduit.*

## 1.3. Exploration de la fonction endothéliale

Une exploration de la fonction endothéliale a été effectuée pour chaque sujet au moment de l'inclusion. D'après ces résultats, nous avons pu constater que la conductance vasculaire basale ne variait pas entre les deux groupes étudiés. De même, l'exploration de la relaxation endothélium –dépendante et –indépendante, ΔACh-CVC et ΔLSH-CVC respectivement, ne nous a pas permis d'observer de variation significative entre les deux groupes (Tableau V).

*Tableau V : Paramètres d'évaluation de la fonction endothéliale pour le groupe obèse et contrôle avant le programme d'entraînement*

Caractéristiques	Témoins (n=6)	Obèses (n=9)
CVC basale (PU/mmHg)	0.053 ± 0.008	0.038 ± 0.009
Δ ACh-CVC (PU/mmHg)	0.18 ± 0.05	0.15 ± 0.06
Δ LSH-CVC (PU/mmHg)	0.60 ± 0.19	0.72 ± 0.21

*CVC: Cutaneous Vascular Conductance; ACh : Acetylcholine ; LSH: Local Skin Heat*

#### **1.4. Paramètres inflammatoires**

Les dosages des taux de CRPus, chémerine, IL-6, TNF $\alpha$ , adiponectine et leptine ont été effectués pour chaque groupe. Parmi ces marqueurs inflammatoires, nous avons pu observer que la CRPus, l'IL-6 et la leptine était significativement augmentés chez les sujets obèses par rapport aux sujets normo-pondérés (Figure 24).

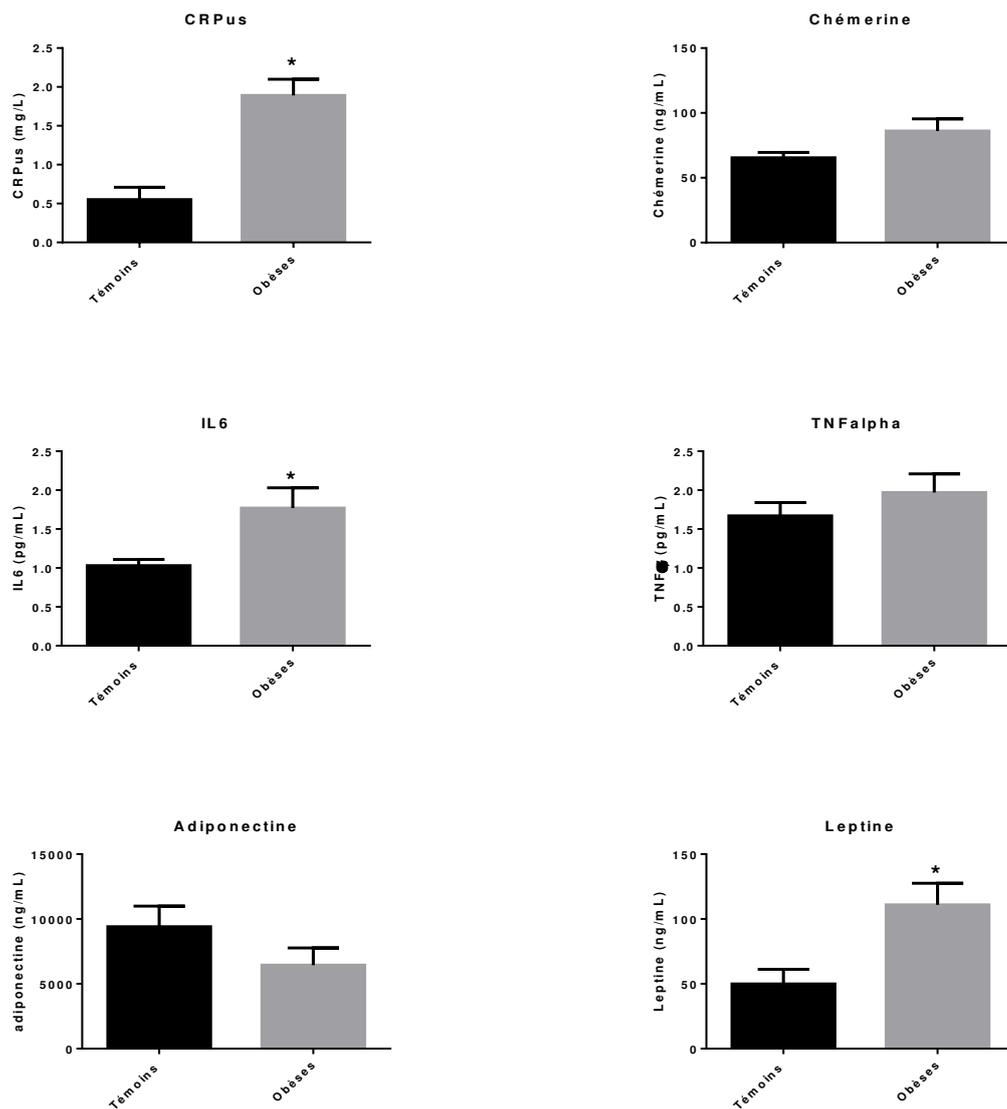
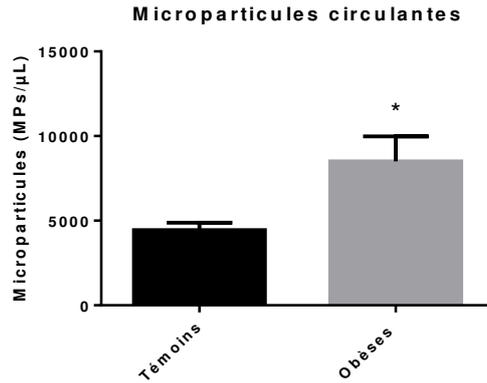


Figure 24 : Paramètres inflammatoires pour le groupe obèse et contrôle avant le programme d'entraînement. \* $p < 0.05$

### 1.5. Etude des MPs

Avant le programme d'entraînement, une mesure de la concentration plasmatique de MPs, par cytométrie en flux, nous a permis d'observer une concentration plus élevée de MPs circulants chez les sujets obèses par rapport au groupe contrôle (Figure 25).



*Figure 25 : Taux de MPs circulantes pour le groupe obèse et contrôle avant le programme d'entraînement. \* $p < 0.05$*

Nous avons choisi de nous intéresser pour cette étude à plusieurs miRs qui seraient impliqués dans l'homéostasie vasculaire (miR-150, miR-320, miR-146a, miR-124a, miR-21, miR-126, mi-R223, miR-302a et miR-155). A l'exception des miR-302a et miR-155, tous les autres miRs ont pu être détectés dans les MPs. Nous avons également pu observer que les miR-150, miR-320a et miR-124a étaient plus exprimés dans les MPs de sujets obèses par rapport aux sujets normo-pondérés (Figure 26).

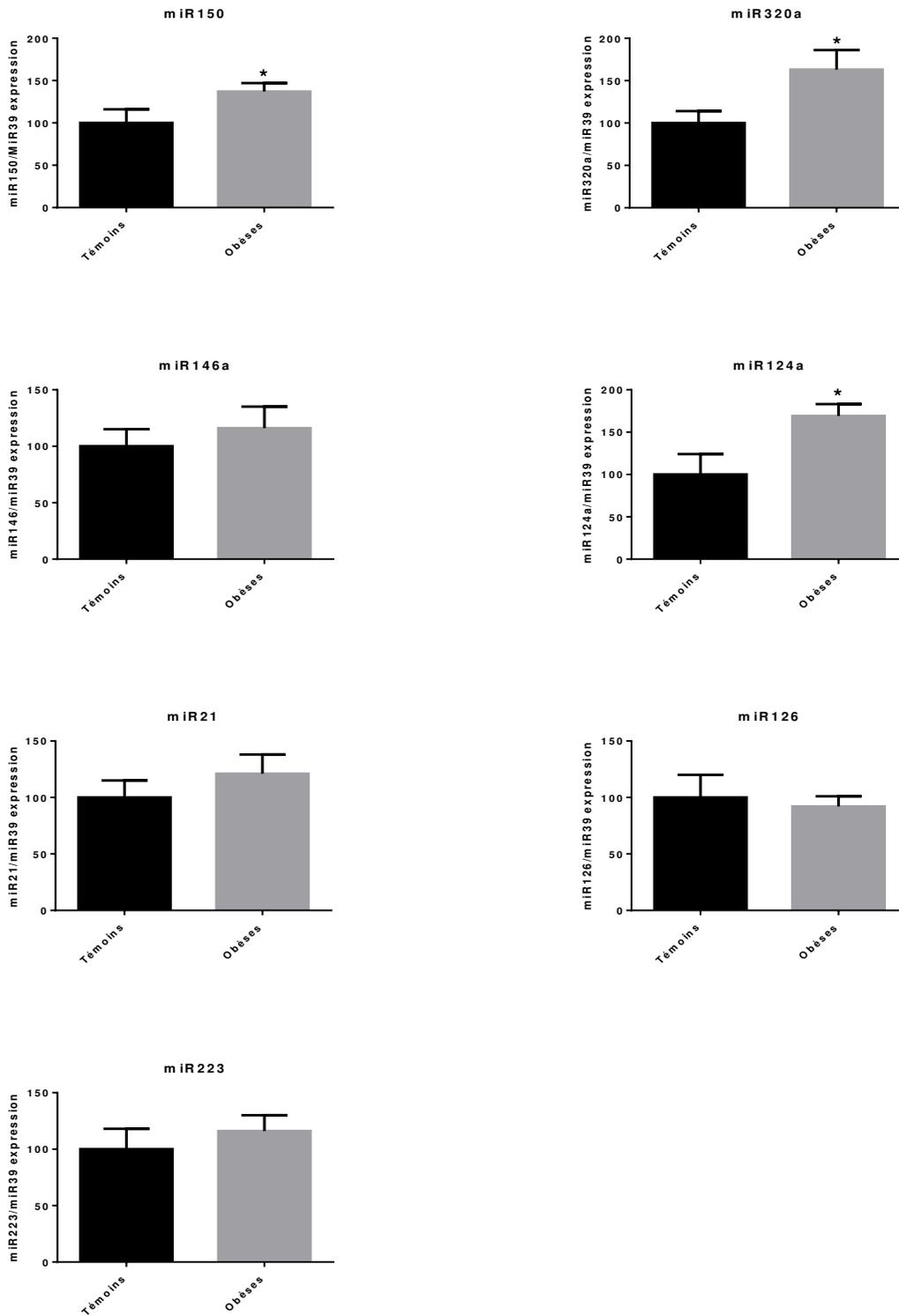


Figure 26 : Expression des miRs contenus dans les MPs pour le groupe obèse et contrôle avant le programme d'entraînement. \* $p < 0.05$

## 2. Effet du programme d'exercice physique chez le groupe de sujets obèses

### 2.1. Paramètres anthropométriques et biologiques

Après 8 semaines d'exercice physique, nous avons pu observer que l'IMC avait significativement diminuée. Parmi les mesures des marqueurs lipidiques, seuls les ApoA ont été augmentés suite au programme d'entraînement (Tableau VI).

*Tableau VI : Paramètres anthropométriques et biologiques pour le groupe obèse avant et après le programme d'entraînement*

Caractéristiques	Avant	Après
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	33.33 ± 1.86	32.69 ± 1.71 *
PAM (mmHg)	90.00 ± 1.92	90.74 ± 1.33
Glycémie (mmol/l)	4.50 ± 0.11	4.82 ± 0.15
Cholestérol total (mmol/l)	4.56 ± 0.31	4.22 ± 0.22
Triglycérides (mmol/l)	1.13 ± 0.23	1.13 ± 0.08
HDLc (mmol/l)	1.06 ± 0.08	1.06 ± 0.05
LDLc (mmol/l)	3.16 ± 0.28	2.77 ± 0.21
ApoA (g/l)	1.42 ± 0.04	1.47 ± 0.04 *
ApoB (g/l)	0.76 ± 0.06	0.76 ± 0.06

*IMC : Indice de Masse Corporelle ; PAM : Pression Artérielle Moyenne ; HDLc : High Density Lipoprotein cholesterol ; LDLc : Low Density Lipoprotein cholesterol ; ApoA : Apolipoprotéine A ; ApoB : Apolipoprotéine B ; \*p<0.05.*

### 2.2. Paramètres du stress oxydant

Après 8 semaines d'entraînement, les taux plasmatiques de TBARS ont diminuée tandis que les taux de AOPP, de GSH et de nitrites plasmatiques n'ont pas significativement varié (Tableau VII).

*Tableau VII : Paramètres du stress oxydant pour le groupe obèse avant et après le programme d'entraînement*

Caractéristiques	Avant	Après
Nitrites (μmol/l)	0.21 ± 0.06	0.21 ± 0.04
TBARS (μmol/l)	7.27 ± 1.08	5.52 ± 1.22 *
AOPP (mmol/l)	10.46 ± 1.62	8.97 ± 1.26
GSH (μmol/l)	5.84 ± 1.05	5.55 ± 1.12

*TBARS : Thiol Barbituric Acid Reactive Substances ; AOPP: Advanced Oxidation Protein Products; GSH: Glutathion réduit. ; \*p<0.05*

### **2.3.Exploration de la fonction endothéliale**

L'exploration fonctionnelle de l'endothélium par débitmétrie laser doppler ne nous a pas permis d'observer une amélioration significative de la fonction endothéliale après les 8 semaines d'entraînement (Tableau VIII).

*Tableau VIII : Paramètres d'évaluation de la fonction endothéliale pour le groupe obèse avant et après le programme d'entraînement*

Caractéristiques	Avant	Après
CVC basale (PU/mmHg)	0.038 ± 0.01	0.054 ± 0.01
Δ ACh-CVC (PU/mmHg)	0.15 ± 0.06	0.19 ± 0.06
Δ LSH-CVC (PU/mmHg)	0.72 ± 0.21	0.79 ± 0.13

*CVC: Cutaneous Vascular Conductance; ACh: Acétylcholine; LSH: Local Skin Heat*

## 2.4. Paramètres inflammatoires

Après 8 semaines d'exercice, les différents marqueurs inflammatoires mesurés n'ont pas significativement varié au sein de la population de sujets obèses (Figure 27).

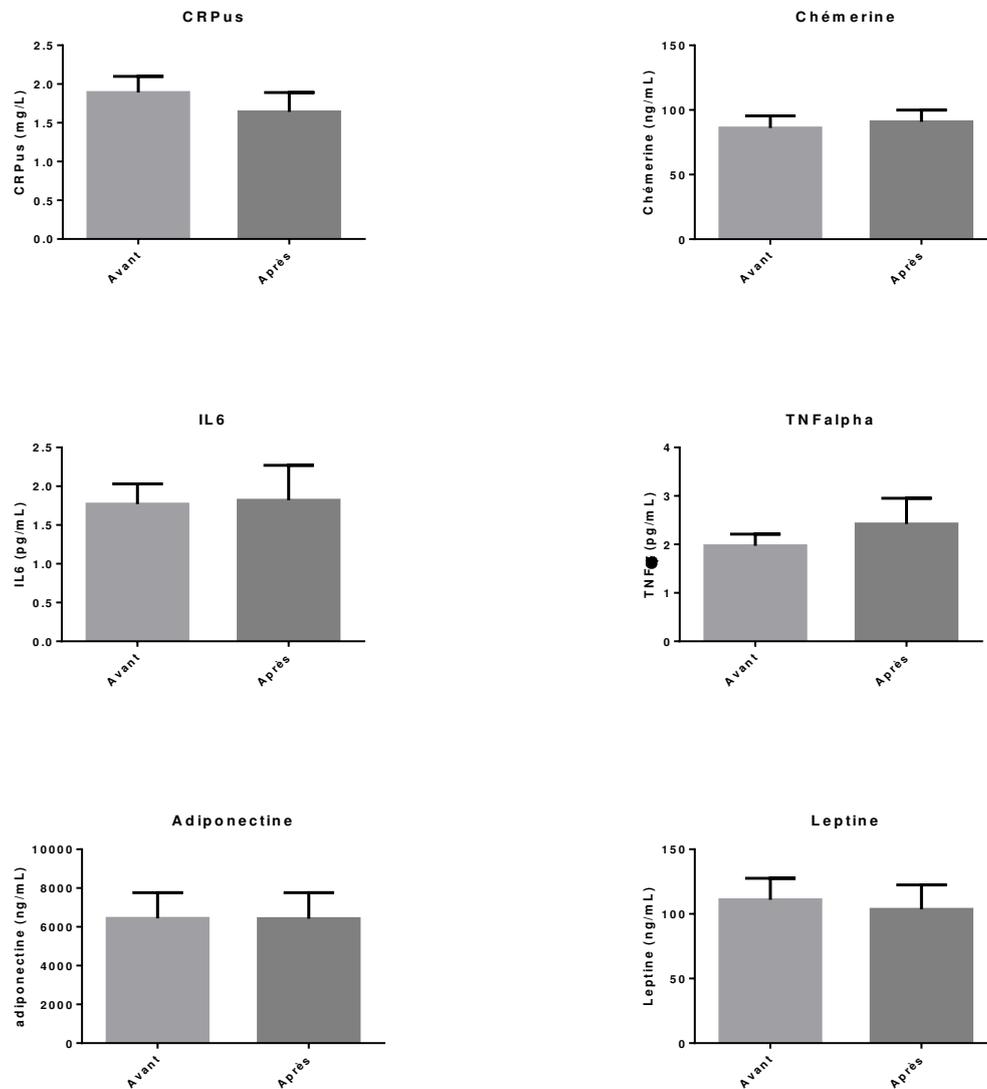


Figure 27 : Paramètres inflammatoires pour le groupe obèse avant et après le programme d'entraînement

## 2.5. Etude des MPs

### 2.5.1. Quantification des MPs circulantes

La concentration plasmatique n'a pas significativement variée chez les obèses après le programme d'exercice physique (Figure 28).

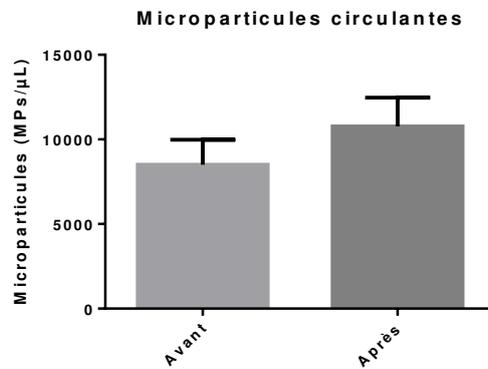


Figure 28 : Taux de microparticules circulantes pour le groupe obèse avant et après le programme d'entraînement. \* $p < 0.05$

### 2.5.2. Etude des miR contenus dans les MPs

Après 8 semaines d'entraînement, nous avons pu observer que les miR-150, miR-146a, miR-21 et miR-223 présentaient un taux d'expression dans les MPs plus élevé par rapport à celui observé avant le début du protocole d'exercice (Figure 29).

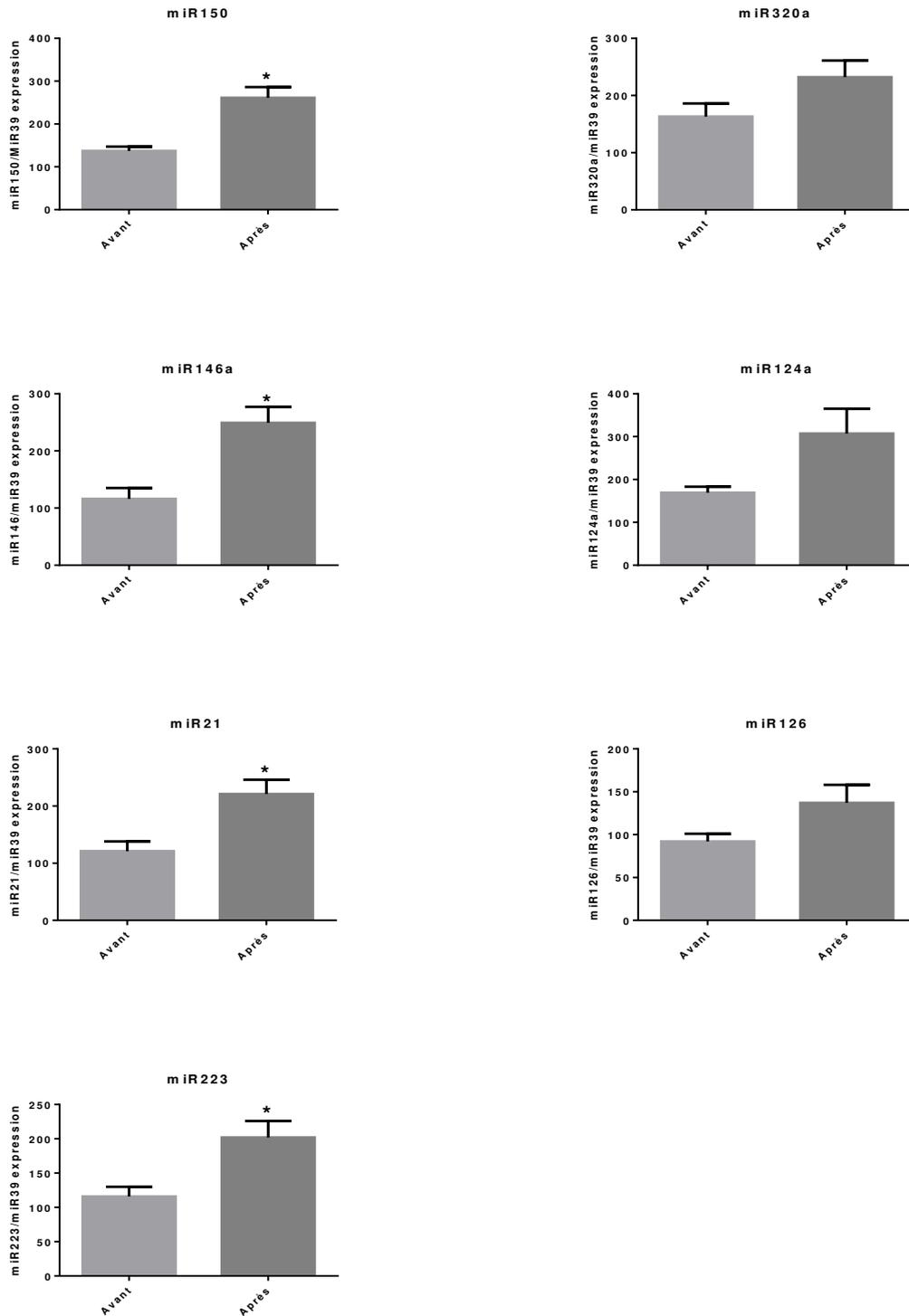


Figure 29 : Expression des miRs contenus dans les MPs pour le groupe obèse avant et après le programme d'entraînement. \* $p < 0.05$ .

## Discussion

Cette étude nous a permis dans un premier temps d'observer que notre population de sujets obèses était caractérisée par un taux significativement élevé de nombreux marqueurs inflammatoires (CRPus, leptine et IL-6) et présentait également une concentration de MPs circulantes significativement plus importante par rapport au groupe de sujets normo-pondérés. De plus, les miR-150, miR-320a et miR-124a contenus dans les MPs de ces sujets obèses étaient significativement plus exprimés par rapport à ceux du groupe normo-pondéré. Certains travaux ont pu rapporter que le miR-320a était surexprimé chez des sujets présentant des troubles cardiovasculaires (Chen et al., 2015). Ce miR a également été associé à une augmentation des marqueurs inflammatoires *in vivo* et à l'altération des fonctions endothéliales chez des souris ApoE<sup>-/-</sup> (Chen et al., 2015). Par ailleurs, miR-320a et miR-150 joueraient également un rôle dans la dysfonction vasculaire associé aux troubles métaboliques (Karolina et al., 2012). Une élévation des marqueurs inflammatoires est généralement rapportée chez les sujets obèses et indique la présence d'une inflammation chronique de bas bruit favorisant le développement d'une dysfonction endothéliale (Catalán et al., 2007; Ouchi et al., 2011). Cependant, nous n'avons pas observé de diminution de la réponse vasorelaxante- endothélium dépendante pour le groupe obèse. De nombreuses études ont rapporté une altération de la fonction endothéliale associée à l'obésité (Miâdi-Messaoud et al., 2009; Woo et al., 2004) (que nous avons également observé pour nos sujets obèses dans l'étude I et II). Pour cette étude, l'absence d'altération pourrait s'expliquer par le fait que la population recrutée pour le programme d'exercice physique est une population jeune et qui pourrait donc ne pas avoir encore de dysfonction endothéliale marquée. Montero et al. (2014), qui n'avaient également pas observé d'altération de la relaxation endothélium-dépendante

chez des enfants présentant une obésité morbide, avaient suggéré l'existence de périodes durant lesquelles la fonction endothéliale pourrait être préservée même en présence d'une obésité marquée.

Après 8 semaines d'entraînement aérobic, nous avons pu observer une diminution significative du poids et une augmentation significative des ApoA. Toutefois, les autres marqueurs lipidiques et de glycémie n'ont pas été modifiés. De nombreuses études ont déjà pu décrire qu'un programme d'exercice physique, même sans restriction calorique, permettait une réduction du poids total et de la graisse abdominale (Ross et al., 2004). Une augmentation des concentrations plasmatiques des HDLc, accompagnée d'une diminution de celles des triglycérides, des LDLc et du cholestérol total est généralement observée suite à un exercice physique de type aérobic mais ces améliorations lipidiques dépendent fortement de la durée et de l'intensité du programme d'entraînement ce qui pourrait expliquer nos résultats (Kelley et al., 2004). Toutefois, l'absence d'amélioration des principaux marqueurs lipidiques pourrait également être attribuée aux variations biologiques journalières des taux de lipides plasmatiques (Pereira et al., 2004) et/ou à la variabilité présente lors des différentes périodes du cycle menstruel (Barnett et al., 2004).

Nous avons également observé une diminution de la peroxydation lipidique suite à l'exercice physique. Bien que l'exercice aigu ait été rapporté comme générateur de ERO, l'exercice de type aérobic permet, quant à lui, de nombreuses adaptations physiologiques permettant de renforcer le système antioxydant (Gomes et al., 2012). Beard et al. (1996) ont également pu rapporter qu'une réduction, même légère, du poids suite à un entraînement de type aérobic, pouvait être associée à une diminution du taux de peroxydation lipidique, ce qui rejoint les résultats que nous avons pu observer dans notre étude.

Toutefois, l'exercice physique ne nous a pas permis d'observer de diminution des taux circulants des marqueurs inflammatoires mesurés pour notre population de sujets obèses. Plusieurs études avaient pu rapporter les effets de l'exercice sur la réduction des marqueurs inflammatoires circulants (Ford, 2002; Mattusch et al., 2000). Cependant, chez les sujets obèses sains, les travaux restent assez mitigés. Il a en effet été observé que, pour des programmes d'entraînement aérobie de 12 semaines, un exercice physique à intensité faible ou modéré ne modifiait pas les taux plasmatiques de IL-6, TNF $\alpha$  et CRP chez des jeunes filles obèses (Nassis et al., 2005) ou encore des femmes obèses (Polak et al., 2006) tandis que des programmes plus longs (7 mois) à forte intensité et fréquence, permettait une réduction des taux de CRP et de TNF $\alpha$  ainsi qu'une augmentation des taux d'adiponectine (Kondo et al., 2006). Il ressort de ces travaux que l'intensité, la fréquence et la durée de l'entraînement jouent un rôle important dans l'apparition ou non des effets bénéfiques de l'exercice sur l'inflammation associée à l'obésité. De ce fait, la durée du programme d'entraînement, ne s'étalant que sur 8 semaines, pourrait expliquer nos résultats.

L'exercice physique a également été rapporté dans la littérature comme ayant des effets importants sur le système vasculaire tant chez les sujets sains (Clarkson et al., 1999) que chez les sujets obèses (Meyer et al., 2006; Watts et al., 2004). Malgré une tendance vers la baisse, nous n'avons pas pu observer une amélioration significative de la relaxation endothélium-dépendante chez nos sujets obèses. Il a déjà été rapporté que l'intensité, la fréquence, le type et la durée de l'exercice sont des facteurs déterminants dans l'apparition ou non des effets bénéfiques de l'exercice physique (Duclos et al., 2010). Toutefois, nous avons pu observer pour le groupe de sujets normo-pondérés, suivant le même protocole d'entraînement, une amélioration significative de la réponse endothélium-dépendante (voir Etude III). De ce fait, pour une même programme

d'exercice physique, la population obèse présenterait des améliorations moindre au niveau de la fonction endothéliale par rapport à la population normo-pondérée, et que l'on pourrait donc attribuer aux caractéristiques intrinsèques de cette population ce qui engendrerait une réponse moins prononcée (Gielen et al., 2010). Un programme d'entraînement plus long aurait peut-être permis d'observer des résultats bénéfiques (comme ceux obtenus pour l'étude III).

D'après quelques travaux, l'exercice physique peut modifier les concentrations plasmatiques de certaines MPs circulantes. Il a en effet été observé qu'un programme de 6 mois d'exercice physique induisait une diminution de la concentration plasmatique de MPs d'origine endothéliale (Babbitt et al., 2013) tandis que l'inactivité physique favorisait une augmentation de ces MPs (Boyle et al., 2013; Navasolava et al., 2010). La quantification des MPs circulantes au sein de notre population de sujets obèses ne nous a pas permis d'observer de différences de concentrations plasmatiques suite aux 8 semaines d'entraînement. Toutefois, en étudiant la composition de ces MPs en miRs, nous avons pu constater que les miR-150, miR-146a, miR-21 et miR-223 présentaient un taux d'expression plus élevé par rapport à celui observé avant le début du programme d'entraînement. Parmi ces miRs, les miR-146a et miR-223a ont été associés à la réponse anti-inflammatoire en jouant un rôle dans la régulation négative de l'expression des ARNm de IRAK1 et TRAF6, deux protéines impliquées dans la voie de signalisation pro-inflammatoire NF- $\kappa$ B (Taganov et al., 2006). De plus, selon Weber et al. (2010), miR-21 serait stimulé au niveau des cellules endothéliales, suite à un *shear stress*, et contribuerait à stimuler l'activation de la eNOS et la production de NO par la voie PI3K/Akt/eNOS, ce qui suggérerait son implication dans les effets bénéfiques de l'exercice physique sur la fonction endothéliale. Toutefois, les nombreuses études qui se sont intéressés aux effets de l'exercice sur les miRs circulants totaux, et non seulement contenus dans les MPs, ont

pu observer des résultats mitigés. Parizzas et al. (2015), par exemple, n'ont pas pu retrouver de modifications du taux de miR-150 circulants après une intervention de 16 semaines chez des sujets diabétiques. Baggish et al. (2011) ont pu observer une élévation de l'expression des miR-21 et miR-146a circulants, après 90 jours d'exercice aérobie. Par contre, Nielsen et al. (2014) ont pu identifier de nombreux miR, dont miR-21, qui présentaient une diminution d'expression au niveau plasmatique, tandis que l'expression d'autres miR, tels que miR-146a, ne variaient pas suite à un programme d'exercice de 12 semaines. Toutefois, ces deux études ont été effectuées sur des populations de sujets sains athlétiques ce qui pourraient expliquer les différences observées avec nos résultats. En effet, plusieurs paramètres entrent en jeu dans la modulation de l'expression des miRs en réponse à l'exercice physique, tels que la population étudiée mais également le type, la durée et l'intensité de l'exercice effectué (Xu et al., 2015). Dans ce sens, Baggish et al. (2011) ont pu observer que, pour une même population, certains miRs variaient en réponse à un exercice chronique et non pas à un exercice aigu. De façon intéressante, Neth et al. ont également pu mettre en évidence une variation dans le rôle des miRs en fonction de la nature du stimulus engendrant l'induction de leur expression (Neth et al., 2013). En effet, ils ont pu observer que de fortes forces de cisaillements élevées (*high shear stress*), comme celles observées au cours de la pratique d'un exercice physique, engendraient une surexpression de certains miRs, tels que miR-21, ayant un rôle athéroprotecteur. Toutefois, de faibles forces de cisaillements (*low shear stress*) dont on connaît les effets pro-athérogènes (Cunningham et Gotlieb, 2004), engendraient une stimulation de ces mêmes miRs, mais que ces derniers joueraient plutôt, sous ces conditions, un rôle pro-athérogène (Neth et al., 2013). Le rôle des miRs est donc à associer avec le type de stimulus les ayant engendrés.

En conclusion, nous avons pu observer que les MPs de sujets obèses sains se caractérisaient par une concentration plasmatique élevée et une expression en miRs différente par rapport aux sujets normo-pondérés. Par ailleurs, même si un programme de 8 semaines d'exercice physique aérobie n'a pas permis de faire varier la concentration plasmatique des MPs de ces sujets obèses, nous avons pu observer une augmentation de l'expression de nombreux miRs, qui pourraient jouer un rôle dans les différents mécanismes d'adaptation vasculaire à l'exercice physique chez ces sujets obèses.

**- Discussion & conclusion -**

De nombreux mécanismes et voies de communication existent entre les différentes cellules du lit vasculaire permettant de maintenir l'homéostasie et l'intégrité vasculaire. L'endothélium en particulier, joue un rôle primordial de par sa localisation stratégique dans la paroi vasculaire, en contact direct avec les cellules mais aussi les éléments circulants du sang tels que les MPs. Dans ce contexte, plusieurs travaux ont considéré les MPs comme de bons « indicateurs » de l'état des vaisseaux et d'importants « effecteurs » contribuant à la communication intercellulaire au niveau de l'endothélium vasculaire. Lors de cette thèse, nous nous sommes donc intéressés à ces MPs et aux rôles qu'elles pouvaient jouer 1/ dans un contexte physiologique sain 2/ dans un contexte pathologique, l'obésité, considérée comme un important facteur de risque cardiovasculaire favorable à la survenue d'altérations au niveau de l'endothélium vasculaire 3/ suite à un exercice physique chronique, censé avoir des effets favorables au niveau vasculaire, en situation physiologique mais également pathologique (obésité).

L'un des premiers résultats de notre étude a été de montrer que le taux de MPs circulantes était supérieur dans notre population de sujets obèses par rapport à des sujets normo-pondérés. Ceci avait déjà été rapporté dans la littérature chez des sujets obèses (Goichot et al., 2006) mais également chez des personnes présentant un diabète de type 2 (Sabatier et al., 2002), un syndrome métabolique (Müller, 2012) ou encore de l'hypertension (Preston et al., 2003). D'une façon générale, l'augmentation des concentrations plasmatiques des MPs circulantes, ou plus spécifiquement des MPs d'origine endothéliale, serait le reflet d'un dérèglement au niveau de l'endothélium vasculaire. Boulanger et al. (2001) avaient démontré que les MPs « pathologiques », provenant de sujets avec un infarctus du myocarde, altéraient la fonction endothéliale tandis que les MPs « saines », provenant de sujets contrôles sans aucune complication cardiovasculaire, ne modifiaient pas la réponse vasorelaxante. Des résultats similaires ont

également été observés avec des MPs provenant de sujets présentant une dysfonction rénale (Amabile et al., 2005). Toutefois, d'après nos travaux, nous avons pu démontrer que les MPs circulantes des sujets obèses n'altéraient pas la réponse relaxante endothélium-dépendante d'anneaux d'aorte de rats *ex vivo*. De plus, l'étude de l'expression des NADPH oxydases et le taux de phosphorylation de la eNOS dans ces MPs, suggèrent qu'elles ne contribuent ni au stress oxydant ni à la dysfonction endothéliale observés pour cette population de sujets obèses. Il serait donc raisonnable de penser que les MPs ne sont pas forcément néfastes en conditions pathologiques. L'exemple des travaux de Mostefai et al. (2008) illustre bien cette idée. En effet, ils ont pu observer que des MPs provenant de patients présentant un choc septique, pouvaient avoir un rôle protecteur dans la fonction vasculaire grâce à un mécanisme stimulant la vasocontraction. Dans notre cas, les sujets obèses, qui présentaient certes une diminution de la réponse vasculaire endothélium-dépendante, avaient toutefois des taux de nitrites plasmatiques élevés. Selon Kleinbongard et al., ces nitrites plasmatiques proviennent en grande partie (près de 80-90%) du NO produit par la eNOS (Kleinbongard et al., 2003). De plus, il a été déjà observé que l'activité de la eNOS dans les cellules endothéliales était augmentée chez des sujets présentant un surpoids ou une obésité ce qui traduirait un mécanisme compensatoire en réponse au stress oxydatif observé chez ces sujets (Silver et al., 2007). Ceci rejoint les résultats que nous avons observés dans nos MPs suggérant ainsi d'une part, que les MPs ne contribuent pas à la dysfonction endothéliale de ces sujets obèses, et d'autre part, qu'elles seraient le reflet d'un mécanisme adaptatif au niveau vasculaire tendant à contrebalancer les effets de la dysfonction endothéliale.

Certains points doivent cependant être pris en compte dans l'interprétation de nos résultats. En effet, vu le rôle primordial de la eNOS et de la NADPH oxydase dans la fonction endothéliale, nous avons choisi d'étudier l'expression de ces protéines dans les

MPs. Toutefois, il aurait également été intéressant d'étudier plus de composants au niveau de ces MPs ce qui aurait pu apporter des informations supplémentaires concernant le rôle des MPs au niveau vasculaire. En effet, outre la voie du NO, d'autres voies, telles que la voie des prostaglandines, peuvent intervenir dans la régulation du tonus vasculaire. Dans ce sens, certains travaux ont pu observer que des MPs d'origine plaquettaire pouvaient transférer le contenu en acide arachidonique aux cellules endothéliales induisant ainsi la production et l'expression de la cyclooxygénase par ces dernières. Ceci permettrait à partir de précurseurs, dont l'acide arachidonique transmis, de libérer la PGI<sub>2</sub> et induire ainsi une vasodilatation (Barry et al., 1999). Cette hypothèse n'a toutefois pas été approfondie par d'autres études. Par ailleurs, il est également important de prendre en compte que, lors de la quantification des MPs par cytométrie en flux, nous n'avons pas utilisé le marquage à l'annexine V pour identifier les MPs dans nos échantillons plasmatiques. Il est vrai que de nombreux travaux utilisent ce critère pour identifier les MPs mais ceci limiterait la quantification des MPs seulement à celles qui externalisent la PS. Or, il a déjà été démontré que de nombreuses MPs étaient annexine V négative, soit parce que la PS interagissait avec une autre protéine bloquant son site de liaison et empêchant ainsi la liaison de l'annexine V (Dasgupta et al., 2006), soit parce qu'elles n'externalisaient pas la PS (Connor et al., 2010). De ce fait, les méthodologies d'identification des MPs diffèrent, ce qui pourrait partiellement expliquer certaines divergences de résultats dans la littérature. De plus, nos analyses ont porté sur la population totale de MPs circulantes. De nombreuses études suggèrent toutefois que les MPs d'origine endothéliale reflèteraient plus spécifiquement ce qui se passe au niveau de l'endothélium (Berezin et al., 2015; Chironi et al., 2008). Certains auteurs les ont même identifié comme un facteur indépendant de risque cardiometabolique, dans l'étude épidémiologique de Framingham portant sur plus de 800 sujets (Amabile et al., 2014).

Toutefois, et afin d'avoir un aperçu du milieu vasculaire dans sa globalité, il nous est paru plus intéressant d'étudier l'ensemble des MPs circulantes. En effet, les MPs, qu'elles soient d'origine endothéliale, plaquettaire, leucocytaire ou autre, jouent un rôle dans le milieu vasculaire, dans un contexte physiologique mais également physiopathologique (Hargett et Bauer, 2013).

En plus de la composition en protéines eNOS et NADPH oxydase, nous avons étudié certains miRs contenus dans les MPs. Récemment, de très nombreux travaux se sont intéressés à ces petits segments nucléotidiques capables d'inhiber ou de réguler diverses voies de signalisation en agissant, en amont, sur l'expression protéique (Zhang, 2010). Nos résultats nous ont permis d'observer une variation entre l'expression de certains miRs dans les MPs de sujets obèses et ceux de sujets normo-pondérés. Ceci n'est pas surprenant étant donné que de nombreux travaux ont suggéré une « signature » spécifique des miRs circulants caractérisant les sujets présentant des troubles cardiovasculaires (Fichtlscherer et al., 2010), un syndrome métabolique (Karolina et al., 2012) ou encore une obésité (Ortega et al., 2013).

Toutefois, il est important de signaler que la plupart des travaux cliniques se sont intéressés aux miRs plasmatiques, et jamais à ceux contenus au niveau des MPs. Ces miRs peuvent circuler librement dans le milieu extracellulaire ou encore inclus dans des microvésicules telles que les MPs. Il a cependant été observé que les MPs étaient leur principal vecteur de transport (Diehl et al., 2012). De plus, grâce à leur membrane cytoplasmique et leur mobilité, ces dernières permettraient ainsi aux miRs d'agir à distance sans être dégradé (Chen et al., 2010). De ce fait, en plus de leur action intracellulaire, ces miRs peuvent agir au niveau de cellules, autres que leur cellule d'origine. Notre étude, reposant uniquement sur l'étude des miRs contenus dans les MPs,

nous permet donc de nous intéresser uniquement aux miRs qui seraient plus à même d'être fonctionnels au niveau de leurs cellules-cibles.

Plusieurs miRs ont été associés à de très nombreux mécanismes impliqués dans les troubles cardiovasculaires, non seulement en tant que biomarqueurs, mais également en tant qu'effecteurs (Tijssen et al., 2012; Zhang, 2010). Dans ce sens, Yamakuchi et al. (2012) ont pu observer qu'un excès de production de ROS et de cytokines inflammatoires, associés à l'obésité et prédisposant à la dysfonction endothéliale, stimulait la dérégulation de nombreux miRs pro- ou anti- inflammatoires au niveau vasculaire. Nous avons pu observer, lors de nos études, que les sujets obèses qui présentaient une inflammation chronique, par rapport aux sujets normo-pondérés, se caractérisaient également par une modification de l'expression de miRs ayant une activité inflammatoire ce qui rejoindrait les résultats des travaux de Yamakuchi et al. (Yamakuchi, 2012).

Certaines études se basent sur des techniques dites de « screening » qui permettent d'étudier un important nombre de miRs et détecter ainsi les miRs les plus sujets à variation suite à une modification physiologique (Nielsen et al., 2014). Toutefois, notre étude des miRs a été initiée à partir de données de la littérature ayant montré que certains miRs joueraient un rôle important dans différents mécanismes associés à l'inflammation et à la fonction endothéliale au niveau vasculaire (Schroen and Heymans, 2012), ce qui ne nous permet pas d'avoir une vue exhaustive de l'ensemble des variations de miRs en condition d'obésité ou suite à un exercice physique chronique.

Suite au programme d'exercice physique, nous avons pu observer une augmentation sélective de l'expression de certains miRs chez les sujets obèses et chez les sujets normo-pondérés. Toutefois, nous avons constaté une différence de modulation pour certains de ces miRs, comparé à d'autres études qui s'étaient également intéressées à l'effet de l'exercice physique sur l'expression des miRs circulants (Baggish et al., 2011;

Nielsen et al., 2014). Certains points doivent cependant être pris en compte dans l'interprétation de ces résultats. En effet, il est important de signaler quelques différences méthodologiques. Nous avons quantifié les miRs au sein des MPs alors que les autres auteurs mesuraient les miRs circulants, De plus, lors de la quantification des taux de miRs, nous avons utilisé le miR-39 pour la normalisation de nos mesures. Baggish et al. (2011) avaient également rajouté à leur échantillons un contrôle exogène (miR-442b) tandis que Nielsen et al. (2014) avaient normalisé leurs mesures par rapport à des miRs présentant une expression plasmatique stable. Ces deux approches sont toutes deux utilisées dans la littérature mais il semblerait que ces différences méthodologiques contribuent aux divergences de résultats observées entre certaines études (Nielsen et al., 2014).

Par ailleurs, il est bien établi que les effets bénéfiques d'un exercice physique chronique au niveau vasculaire sont étroitement dépendants de l'intensité, le type, la fréquence et la durée de cet exercice (Duclos et al., 2010). Nous avons fait le choix, pour nos travaux, d'effectuer un programme d'entraînement aérobic de type intermittent et à forte intensité. Ce type d'entraînement a déjà permis une amélioration de la fonction endothéliale chez des sujets présentant un syndrome métabolique (Tjønnå et al., 2009). Toutefois, ces sujets avaient effectué un programme d'entraînement de 16 semaines. La durée de notre protocole d'exercice physique, ne s'étalant que sur 8 semaines, pourrait donc, en partie, expliquer l'absence d'amélioration de la fonction endothéliale chez nos sujets obèses. Enfin, il est probable que sur un effectif plus important de sujets, nos résultats statistiques soient différents de ceux que nous avons observés pour nos travaux. Un effectif plus important de sujets avait été initialement recruté pour ce protocole d'entraînement. Toutefois, pour plus de rigueur dans les résultats, nous avons fait le choix de ne garder que les sujets qui avaient effectué la presque totalité des séances, excluant

ainsi un important nombre de sujets et réduisant l'effectif final de notre population d'étude.

Les MPs sont d'importants biomarqueurs et effecteurs intervenant dans de nombreux mécanismes au niveau vasculaire. Nos résultats auront contribué à expliquer les variations observées au niveau des MPs circulantes et leur implication au niveau endothélial, dans un contexte d'obésité, et suite à un exercice physique chronique. Ces données sont d'autant plus intéressantes qu'elles contribuent à fournir des informations supplémentaires sur les MPs dans un contexte physio(patho)logique *in vivo*. En effet, une meilleure compréhension de la genèse des MPs, leur composition, ou encore leur mode d'action *in vivo* s'avère primordiale afin de pouvoir envisager une utilisation en routine de ces MPs en clinique, en tant que biomarqueurs, mais également dans le domaine thérapeutique. De nombreuses pistes sont en cours d'étude dans ce domaine. A titre d'exemple, les MPs pourraient être utilisés en tant que vecteurs de transport de médicaments *in vivo*. Les MPs présenteraient l'avantage, par rapport à des structures synthétiques (polymère, structure de carbone...), d'être biocompatibles et de délivrer, non pas un agent pharmacologique, mais une information biologique permettant une réponse physiologique de la cellule cible (Fleury et al., 2014). Des stimuli précis pourraient ainsi engendrer des MPs avec un contenu spécifique qui serait délivré spécifiquement à un type cellulaire précis, grâce à la présence de molécules spécifiques à la surface membranaire. Un autre volet intéressant pour l'utilisation des MPs seraient dans la médecine régénérative. En effet, il a été récemment observé que les MPs étaient impliquées dans la restauration de certaines altérations au niveau tissulaire, et pourraient même expliquer les effets paracrines observés dans les approches thérapeutiques basées sur les cellules souches (De Jong et al., 2014). En effet, Hu et al. (2012) ont pu observer que des MPs

provenant de cellules souches sembleraient reprogrammer certaines fonctions altérées de leurs cellules-cibles, notamment grâce à leur contenu en miRs.

Au final, la connaissance de la composition des MPs circulantes et leurs réels effets biologiques *in vivo* restent certes encore insuffisants, mais les nombreux travaux en cours, qui tendent à une meilleure compréhension de ces mécanismes, permettront dans un avenir proche l'utilisation en routine des MPs en clinique voire en thérapeutique. Pour notre part, notre travail aura permis d'apporter certaines indications sur les MPs circulantes dans un contexte d'obésité prédisposant aux maladies cardiovasculaires, et suite à un exercice physique chronique tendant à contrebalancer les effets de l'obésité.

## **- Références -**

Adams, V., Linke, A., Kränkel, N., Erbs, S., Gielen, S., Möbius-Winkler, S., Gummert, J.F., Mohr, F.W., Schuler, G., and Hambrecht, R. (2005). Impact of Regular Physical Activity on the NAD(P)H Oxidase and Angiotensin Receptor System in Patients With Coronary Artery Disease. *Circulation* *111*, 555–562.

Aharon, A., Tamari, T., and Brenner, B. (2008). Monocyte-derived microparticles and exosomes induce procoagulant and apoptotic effects on endothelial cells. *Thromb. Haemost.*

Alberti, K.G.M.M., Zimmet, P., Shaw, J., and IDF Epidemiology Task Force Consensus Group (2005). The metabolic syndrome--a new worldwide definition. *Lancet Lond. Engl.* *366*, 1059–1062.

Alberti, K.G.M.M., Eckel, R.H., Grundy, S.M., Zimmet, P.Z., Cleeman, J.I., Donato, K.A., Fruchart, J.-C., James, W.P.T., Loria, C.M., and Smith, S.C. (2009). Harmonizing the Metabolic Syndrome A Joint Interim Statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* *120*, 1640–1645.

Albrink, M.J., Hirsch, J., and Batchelor, B. (1976). Obesity Adipose tissue cellularity in human obesity. *Clin. Endocrinol. Metab.* *5*, 299–311.

Amabile, N., Guérin, A.P., Leroyer, A., Mallat, Z., Nguyen, C., Boddaert, J., London, G.M., Tedgui, A., and Boulanger, C.M. (2005). Circulating Endothelial Microparticles Are Associated with Vascular Dysfunction in Patients with End-Stage Renal Failure. *J. Am. Soc. Nephrol.* *16*, 3381–3388.

Amabile, N., Cheng, S., Renard, J.M., Larson, M.G., Ghorbani, A., McCabe, E., Griffin, G., Guerin, C., Ho, J.E., Shaw, S.Y., et al. (2014). Association of circulating endothelial microparticles with cardiometabolic risk factors in the Framingham Heart Study. *Eur. Heart J.* *35*, 2972–2979.

Arteaga, R.B., Chirinos, J.A., Soriano, A.O., Jy, W., Horstman, L., Jimenez, J.J., Mendez, A., Ferreira, A., de Marchena, E., and Ahn, Y.S. (2006). Endothelial Microparticles and Platelet and Leukocyte Activation in Patients With the Metabolic Syndrome. *Am. J. Cardiol.* *98*, 70–74.

Avogaro, A., and de Kreutzenberg, S.V. (2005). Mechanisms of endothelial dysfunction in obesity. *Clin. Chim. Acta* 360, 9–26.

Babbitt, D.M., Diaz, K.M., Fearheller, D.L., Sturgeon, K.M., Perkins, A.M., Veerabhadrapa, P., Williamson, S.T., Kretzschmar, J., Ling, C., Lee, H., et al. (2013). Endothelial Activation Microparticles and Inflammation Status Improve with Exercise Training in African Americans. *Int. J. Hypertens.* 2013, 1–8.

Baggish, A.L., Hale, A., Weiner, R.B., Lewis, G.D., Systrom, D., Wang, F., Wang, T.J., and Chan, S.Y. (2011). Dynamic regulation of circulating microRNA during acute exhaustive exercise and sustained aerobic exercise training. *J. Physiol.* 589, 3983–3994.

Barnett, J.B., Woods, M.N., Lamon-Fava, S., Schaefer, E.J., McNamara, J.R., Spiegelman, D., Hertzmark, E., Goldin, B., Longcope, C., and Gorbach, S.L. (2004). Plasma Lipid and Lipoprotein Levels during the Follicular and Luteal Phases of the Menstrual Cycle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 776–782.

Baron, M., Boulanger, C.M., Staels, B., and Tailleux, A. (2012). Cell-derived microparticles in atherosclerosis: biomarkers and targets for pharmacological modulation? *J. Cell. Mol. Med.* 16, 1365–1376.

Barry, O.P., Pratico, D., Lawson, J.A., and FitzGerald, G.A. (1997). Transcellular activation of platelets and endothelial cells by bioactive lipids in platelet microparticles. *J. Clin. Invest.* 99, 2118–2127.

Barry, O.P., Praticò, D., Savani, R.C., and FitzGerald, G.A. (1998). Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles. *J. Clin. Invest.* 102, 136–144.

Barry, O.P., Kazanietz, M.G., Praticò, D., and FitzGerald, G.A. (1999). Arachidonic Acid in Platelet Microparticles Up-regulates Cyclooxygenase-2-dependent Prostaglandin Formation via a Protein Kinase C/Mitogen-activated Protein Kinase-dependent Pathway. *J. Biol. Chem.* 274, 7545–7556.

Barteneva, N.S., Fasler-Kan, E., Bernimoulin, M., Stern, J.N., Ponomarev, E.D., Duckett, L., and Vorobjev, I.A. (2013). Circulating microparticles: square the circle. *BMC Cell Biol.* 14, 23.

- Barton, M., Baretella, O., and Meyer, M.R. (2012). Obesity and risk of vascular disease: importance of endothelium-dependent vasoconstriction. *Br. J. Pharmacol.* *165*, 591–602.
- Basdevant, A. (2006). L'obésité : origines et conséquences d'une épidémie. *C. R. Biol.* *329*, 562–569.
- Bassuk, S.S., and Manson, J.E. (2005). Epidemiological evidence for the role of physical activity in reducing risk of type 2 diabetes and cardiovascular disease. *J. Appl. Physiol.* *99*, 1193–1204.
- Beard, C.M., Barnard, R.J., Robbins, D.C., Ordovas, J.M., and Schaefer, E.J. (1996). Effects of Diet and Exercise on Qualitative and Quantitative Measures of LDL and Its Susceptibility to Oxidation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *16*, 201–207.
- Bedard, K., and Krause, K.-H. (2007). The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. *Physiol. Rev.* *87*, 245–313.
- Berezin, A., Zulli, A., Kerrigan, S., Petrovic, D., and Kruzliak, P. (2015). Predictive role of circulating endothelial-derived microparticles in cardiovascular diseases. *Clin. Biochem.* *48*, 562–568.
- Bohr, V., Anson, R.M., Mazur, S., and Dianov, G. (1998). Oxidative DNA damage processing and changes with aging. *Toxicol. Lett.* *102–103*, 47–52.
- Bonetti, P.O., Lerman, L.O., and Lerman, A. (2003). Endothelial Dysfunction A Marker of Atherosclerotic Risk. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *23*, 168–175.
- Boulanger, C.M., and Vanhoutte, P.M. (1997). Endothelial vasomotor tone : role of the G-proteins. *Sang Thromb. Vaiss.* *9*, 22–30.
- Boulanger, C.M., Scoazec, A., Ebrahimian, T., Henry, P., Mathieu, E., Tedgui, A., and Mallat, Z. (2001). Circulating Microparticles From Patients With Myocardial Infarction Cause Endothelial Dysfunction. *Circulation* *104*, 2649–2652.
- Boulanger, C.-M., Leroyer, A.-S., Amabile, N., and Tedgui, A. (2008). Microparticules endothéliales circulantes : un nouveau marqueur du dysfonctionnement vasculaire. *Ann. Cardiol. Angéiologie* *57*, 149–154.

- Bouloumié, A., Lafontan, M., and Langin, D. (2006). Les cellules de la fraction stroma-vasculaire du tissu adipeux humain: caractérisation et rôles. *Obésité 1*, 79–86.
- Boyle, L.J., Credeur, D.P., Jenkins, N.T., Padilla, J., Leidy, H.J., Thyfault, J.P., and Fadel, P.J. (2013). Impact of reduced daily physical activity on conduit artery flow-mediated dilation and circulating endothelial microparticles. *J. Appl. Physiol.* *115*, 1519–1525.
- Brandes, R.P., Weissmann, N., and Schröder, K. (2010). NADPH oxidases in cardiovascular disease. *Free Radic. Biol. Med.* *49*, 687–706.
- Burger, D., and Touyz, R.M. (2012). Cellular biomarkers of endothelial health: microparticles, endothelial progenitor cells, and circulating endothelial cells. *J. Am. Soc. Hypertens.* *6*, 85–99.
- Busse, R., and Fleming, I. (1995). Regulation and Functional Consequences of Endothelial Nitric Oxide Formation. *Ann. Med.* *27*, 331–340.
- Campia, U., Tesauro, M., and Cardillo, C. (2012). Human obesity and endothelium-dependent responsiveness. *Br. J. Pharmacol.* *165*, 561–573.
- Casillas, J.M., Gremeaux, V., Damak, S., Feki, A., and Pérennou, D. (2007). Exercise training for patients with cardiovascular disease. *Ann. Réadapt. Médecine Phys.* *50*, 403–418.
- Casteilla, L., Charrière, G., Laharrague, P., Cousin, B., Planat-Benard, V., Péricaud, L., and Chavoin, J.P. (2004). Tissus adipeux, chirurgie plastique et reconstructrice : le retour aux sources. *Ann. Chir. Plast. Esthét.* *49*, 409–418.
- Catalán, V., Gómez-Ambrosi, J., Ramirez, B., Rotellar, F., Pastor, C., Silva, C., Rodríguez, A., Gil, M.J., Cienfuegos, J.A., and Frühbeck, G. (2007). Proinflammatory cytokines in obesity: impact of type 2 diabetes mellitus and gastric bypass. *Obes. Surg.* *17*, 1464–1474.
- Chen, C., Wang, Y., Yang, S., Li, H., Zhao, G., Wang, F., Yang, L., and Wang, D.W. (2015). MiR-320a contributes to atherogenesis by augmenting multiple risk factors and down-regulating SRF. *J. Cell. Mol. Med.* *19*, 970–985.
- Chen, T.S., Lai, R.C., Lee, M.M., Choo, A.B.H., Lee, C.N., and Lim, S.K. (2010). Mesenchymal stem cell secretes microparticles enriched in pre-microRNAs. *Nucleic Acids Res.* *38*, 215–224.

Chironi, G.N., Boulanger, C.M., Simon, A., Dignat-George, F., Freyssinet, J.-M., and Tedgui, A. (2008). Endothelial microparticles in diseases. *Cell Tissue Res.* 335, 143–151.

Clarkson, P., Montgomery, H.E., Mullen, M.J., Donald, A.E., Powe, A.J., Bull, T., Jubbs, M., World, M., and Deanfield, J.E. (1999). Exercise training enhances endothelial function in young men. *J. Am. Coll. Cardiol.* 33, 1379–1385.

Coleman, M.L., Sahai, E.A., Yeo, M., Bosch, M., Dewar, A., and Olson, M.F. (2001). Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat. Cell Biol.* 3, 339–345.

Combes, V., Simon, A.C., Grau, G.E., Arnoux, D., Camoin, L., Sabatier, F., Mutin, M., Sanmarco, M., Sampol, J., and Dignat-George, F. (1999). In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. *J. Clin. Invest.* 104, 93–102.

Connor, D.E., Exner, T., Ma, D.D.F., and Joseph, J.E. (2010). The majority of circulating platelet-derived microparticles fail to bind annexin V, lack phospholipid-dependent procoagulant activity and demonstrate greater expression of glycoprotein Ib: *Thromb. Haemost.* 103, 1044–1052.

Cooke, J.P., MD, and Dzau, V.J., MD (1997). NITRIC OXIDE SYNTHASE: Role in the Genesis of Vascular Disease. *Annu. Rev. Med.* 48, 489–509.

Cooper, D., Stokes, K.Y., Taylor, A., and Granger, D.N. (2002). Oxidative stress promotes blood cell-endothelial cell interactions in the microcirculation. *Cardiovasc. Toxicol.* 2, 165–180.

Cunningham, K.S., and Gotlieb, A.I. (2004). The role of shear stress in the pathogenesis of atherosclerosis. *Lab. Invest.* 85, 9–23.

Czernichow, S., Ciangura, C., and Oppert, J.-M. (2006). [Obesity in the adult]. *Rev. Prat.* 56, 2275–2281.

Dalli, J., Norling, L.V., Renshaw, D., Cooper, D., Leung, K.-Y., and Perretti, M. (2008). Annexin 1 mediates the rapid anti-inflammatory effects of neutrophil-derived microparticles. *Blood* 112, 2512–2519.

- Dasgupta, S.K., Guchhait, P., and Thiagarajan, P. (2006). Lactadherin binding and phosphatidylserine expression on cell surface-comparison with annexin A5. *Transl. Res.* *148*, 19–25.
- Deanfield, J.E., Halcox, J.P., and Rabelink, T.J. (2007). Endothelial Function and Dysfunction Testing and Clinical Relevance. *Circulation* *115*, 1285–1295.
- De Filippis, E., Cusi, K., Ocampo, G., Berria, R., Buck, S., Consoli, A., and Mandarino, L.J. (2006). Exercise-induced improvement in vasodilatory function accompanies increased insulin sensitivity in obesity and type 2 diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *91*, 4903–4910.
- De Jong, O.G., Van Balkom, B.W.M., Schiffelers, R.M., Bouten, C.V.C., and Verhaar, M.C. (2014). Extracellular Vesicles: Potential Roles in Regenerative Medicine. *Front. Immunol.* *5*.
- Delarue, J., Allain, G., and Guillermin, S. (2006). Le syndrome métabolique. *Nutr. Clin. Métabolisme* *20*, 114–117.
- Delp, M.D., and Laughlin, M.H. (1997). Time course of enhanced endothelium-mediated dilation in aorta of trained rats: *Med. Amp Sci. Sports Amp Exerc.* *29*, 1454–1461.
- DeSouza, C.A., Shapiro, L.F., Clevenger, C.M., Dinunno, F.A., Monahan, K.D., Tanaka, H., and Seals, D.R. (2000). Regular Aerobic Exercise Prevents and Restores Age-Related Declines in Endothelium-Dependent Vasodilation in Healthy Men. *Circulation* *102*, 1351–1357.
- Diamant, M., Tushuizen, M.E., Sturk, A., and Nieuwland, R. (2004). Cellular microparticles: new players in the field of vascular disease? *Eur. J. Clin. Invest.* *34*, 392–401.
- Diehl, P., Fricke, A., Sander, L., Stamm, J., Bassler, N., Htun, N., Ziemann, M., Helbing, T., El-Osta, A., Jowett, J.B.M., et al. (2012). Microparticles: major transport vehicles for distinct microRNAs in circulation. *Cardiovasc. Res.* *93*, 633–644.
- Dignat-George, F., and Boulanger, C.M. (2011). The Many Faces of Endothelial Microparticles. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *31*, 27–33.
- Dimmeler, S., and Zeiher, A.M. (2003). Exercise and Cardiovascular Health Get Active to “AKTivate” Your Endothelial Nitric Oxide Synthase. *Circulation* *107*, 3118–3120.

- Dimmeler, S., Fleming, I., Fisslthaler, B., Hermann, C., Busse, R., and Zeiher, A.M. (1999). Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 399, 601–605.
- Dubern, B., and Clément, K. (2007). Aspects génétiques de l'obésité. *Presse Médicale* 36, 1598–1605.
- Duclos, M., Duché, P., Guezennec, C.-Y., Richard, R., Rivière, D., and Vidalin, H. (2010). Position de consensus : activité physique et obésité chez l'enfant et chez l'adulte. *Sci. Sports* 25, 207–225.
- Duerschmidt, N., Stielow, C., Muller, G., Pagano, P.J., and Morawietz, H. (2006). NO-mediated regulation of NAD(P)H oxidase by laminar shear stress in human endothelial cells. *J. Physiol.* 576, 557–567.
- Dussaule, J.C., and Chatziantoniou, C. (1996). [Role of nitric oxide in the regulation of arterial pressure and renal function]. *Presse Médicale Paris Fr.* 1983 25, 1789–1793.
- El Ati, J., Traissac, P., Delpeuch, F., Aounallah-Skhiri, H., Béji, C., Eymard-Duvernay, S., Bougatef, S., Kolsteren, P., Maire, B., and Ben Romdhane, H. (2012). Gender Obesity Inequities Are Huge but Differ Greatly According to Environment and Socio-Economics in a North African Setting: A National Cross-Sectional Study in Tunisia. *PLoS ONE* 7, e48153.
- Falati, S., Liu, Q., Gross, P., Merrill-Skoloff, G., Chou, J., Vandendries, E., Celi, A., Croce, K., Furie, B.C., and Furie, B. (2003). Accumulation of Tissue Factor into Developing Thrombi In Vivo Is Dependent upon Microparticle P-Selectin Glycoprotein Ligand 1 and Platelet P-Selectin. *J. Exp. Med.* 197, 1585–1598.
- Fantuzzi, G. (2005). Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 115, 911–919.
- Fatima, S.S., Butt, Z., Bader, N., Pathan, A.Z., Hussain, S., and Iqbal, N.T. (2015). Role of multifunctional Chemerin in obesity and preclinical diabetes. *Obes. Res. Clin. Pract.* 9, 507–512.
- Favier, A. (2003). Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Actual. Chim.* 108–115.

- Fève, B., Bastard, J.-P., and Vidal, H. (2006). Les relations entre obésité, inflammation et insulino-résistance : acquisitions récentes. *C. R. Biol.* 329, 587–597.
- Fichtlscherer, S., Rosa, S.D., Fox, H., Schwietz, T., Fischer, A., Liebetrau, C., Weber, M., Hamm, C.W., Röxe, T., Müller-Ardogan, M., et al. (2010). Circulating MicroRNAs in Patients With Coronary Artery Disease. *Circ. Res.* 107, 677–684.
- Finucane, M.M., Stevens, G.A., Cowan, M.J., Danaei, G., Lin, J.K., Paciorek, C.J., Singh, G.M., Gutierrez, H.R., Lu, Y., Bahalim, A.N., et al. (2011). National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9.1 million participants. *The Lancet* 377, 557–567.
- Fleming, I., and Busse, R. (2003). Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 284, R1–R12.
- Fleury, A., Martinez, M.C., and Le Lay, S. (2014). Extracellular Vesicles as Therapeutic Tools in Cardiovascular Diseases. *Front. Immunol.* 5.
- Ford, E.S. (2002). Does Exercise Reduce Inflammation? Physical Activity and C-R... : *Epidemiology. LWW* 13.
- Förstermann, U., and Sessa, W.C. (2012). Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur. Heart J.* 33, 829–837.
- Friebe, A., and Koesling, D. (2003). Regulation of Nitric Oxide-Sensitive Guanylyl Cyclase. *Circ. Res.* 93, 96–105.
- Frisbee, J.C., and Stepp, D.W. (2001). Impaired NO-dependent dilation of skeletal muscle arterioles in hypertensive diabetic obese Zucker rats. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* 281, H1304–H1311.
- Fujita, K., Wada, K., Nozaki, Y., Yoneda, M., Endo, H., Takahashi, H., Kirikoshi, H., Inamori, M., Saito, S., and Nakajima, A. (2011). Serum nitric oxide metabolite as a biomarker of visceral fat accumulation: Clinical significance of measurement for nitrate/nitrite. *Med. Sci. Monit.* 17, CR123–CR131.

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

Galili, O., Versari, D., Sattler, K.J., Olson, M.L., Mannheim, D., McConnell, J.P., Chade, A.R., Lerman, L.O., and Lerman, A. (2007). Early experimental obesity is associated with coronary endothelial dysfunction and oxidative stress. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* 292, H904–H911.

Gambim, M.H., de Oliveira do Carmo, A., Marti, L., Veríssimo-Filho, S., Lopes, L.R., and Janiszewski, M. (2007). Platelet-derived exosomes induce endothelial cell apoptosis through peroxynitrite generation: experimental evidence for a novel mechanism of septic vascular dysfunction. *Crit. Care* 11, R107.

Gavin, T.P., Stallings, H.W., Zwetsloot, K.A., Westerkamp, L.M., Ryan, N.A., Moore, R.A., Pofahl, W.E., and Hickner, R.C. (2005). Lower capillary density but no difference in VEGF expression in obese vs. lean young skeletal muscle in humans. *J. Appl. Physiol.* 98, 315–321.

Ghasemi, A., Zahediasl, S., and Azizi, F. (2013). Elevated nitric oxide metabolites are associated with obesity in women. *Arch. Iran. Med.* 16, 521–525.

Gibala, M.J., and McGee, S.L. (2008). Metabolic Adaptations to Short-term High-Intensity Interval Training: A Little Pain for a Lot of Gain? *Exerc. Sport Sci. Rev.* 36, 58–63.

Gielen, S., Schuler, G., and Adams, V. (2010). Cardiovascular Effects of Exercise Training Molecular Mechanisms. *Circulation* 122, 1221–1238.

Gladwin, M.T., Schechter, A.N., Kim-Shapiro, D.B., Patel, R.P., Hogg, N., Shiva, S., Cannon, R.O., Kelm, M., Wink, D.A., Espey, M.G., et al. (2005). The emerging biology of the nitrite anion. *Nat. Chem. Biol.* 1, 308–314.

Goichot, B., Grunebaum, L., Desprez, D., Vinzio, S., Meyer, L., Schlienger, J.L., Lessard, M., and Simon, C. (2006). Circulating procoagulant microparticles in obesity. *Diabetes Metab.* 32, 82–85.

Gomes, E.C., Silva, A., Nunes, and Oliveira, M.R. de (2012). Oxidants, Antioxidants, and the Beneficial Roles of Exercise-Induced Production of Reactive Species. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2012, e756132.

Gordon, L.A., Morrison, E.Y., McGrowder, D.A., Young, R., Fraser, Y.T.P., Zamora, E.M., Alexander-Lindo, R.L., and Irving, R.R. (2008). Effect of exercise therapy on lipid profile and oxidative stress indicators in patients with type 2 diabetes. *BMC Complement. Altern. Med.* 8, 21.

Goto, C., Higashi, Y., Kimura, M., Noma, K., Hara, K., Nakagawa, K., Kawamura, M., Chayama, K., Yoshizumi, M., and Nara, I. (2003). Effect of Different Intensities of Exercise on Endothelium-Dependent Vasodilation in Humans Role of Endothelium-Dependent Nitric Oxide and Oxidative Stress. *Circulation* 108, 530–535.

Graham, D.A., and Rush, J.W.E. (2004). Exercise training improves aortic endothelium-dependent vasorelaxation and determinants of nitric oxide bioavailability in spontaneously hypertensive rats. *J. Appl. Physiol.* 96, 2088–2096.

Green, D.J., Maiorana, A., O’Driscoll, G., and Taylor, R. (2004). Effect of exercise training on endothelium-derived nitric oxide function in humans. *J. Physiol.* 561, 1–25.

Gremeaux, V., and Bouillet, B. (2012). Obésité, diabète de type 2, et activité physique. *Lett. Médecine Phys. Réadapt.* 28, 3–11.

Guay, C., and Regazzi, R. (2013). Circulating microRNAs as novel biomarkers for diabetes mellitus. *Nat. Rev. Endocrinol.* 9, 513–521.

Guidet, B. (1992). Radicaux libres, moyens de défense extracellulaires. *Médecine Chir. Dig.* 21, 149–151.

Guillaume, M. (1999). Defining obesity in childhood: current practice. *Am. J. Clin. Nutr.* 70, 126S – 130S.

de Gusmao Correia, M.L., and Haynes, W.G. (2004). Leptin, obesity and cardiovascular disease: *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 13, 215–223.

György, B., Szabó, T.G., Pásztói, M., Pál, Z., Misják, P., Aradi, B., László, V., Pállinger, É., Pap, E., Kittel, Á., et al. (2011). Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell. Mol. Life Sci.* 68, 2667–2688.

Hambrecht, R., Adams, V., Erbs, S., Linke, A., Kränkel, N., Shu, Y., Baither, Y., Gielen, S., Thiele, H., Gummert, J.F., et al. (2003). Regular Physical Activity Improves Endothelial

Function in Patients With Coronary Artery Disease by Increasing Phosphorylation of Endothelial Nitric Oxide Synthase. *Circulation* 107, 3152–3158.

Hamdy, O., Porramatikul, S., and Al-Ozairi, E. (2006). Metabolic Obesity: The Paradox Between Visceral and Subcutaneous Fat. *Curr. Diabetes Rev.* 2, 367–373.

Hargett, L.A., and Bauer, N.N. (2013). On the origin of microparticles: From “platelet dust” to mediators of intercellular communication. *Pulm. Circ.* 3, 329–340.

Hergenreider, E., Heydt, S., Tréguer, K., Boettger, T., Horrevoets, A.J.G., Zeiher, A.M., Scheffer, M.P., Frangakis, A.S., Yin, X., Mayr, M., et al. (2012). Atheroprotective communication between endothelial cells and smooth muscle cells through miRNAs. *Nat. Cell Biol.* 14, 249–256.

Higdon, J.V., and Frei, B. (2003). Obesity and Oxidative Stress A Direct Link to CVD? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23, 365–367.

Hirata, Y., Emori, T., Eguchi, S., Kanno, K., Imai, T., Ohta, K., and Marumo, F. (1993). Endothelin receptor subtype B mediates synthesis of nitric oxide by cultured bovine endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 91, 1367–1373.

Holm, V.A., Cassidy, S.B., Butler, M.G., Hanchett, J.M., Greenswag, L.R., Whitman, B.Y., and Greenberg, F. (1993). Prader-Willi Syndrome: Consensus Diagnostic Criteria. *Pediatrics* 91, 398–402.

Holvoet, P. (2012). Stress in Obesity and Associated Metabolic and Cardiovascular Disorders. *Scientifica* 2012, e205027.

Horn, P., Cortese-Krott, M.M., Amabile, N., Hundsdörfer, C., Kröncke, K.-D., Kelm, M., and Heiss, C. (2013). Circulating Microparticles Carry a Functional Endothelial Nitric Oxide Synthase That Is Decreased in Patients With Endothelial Dysfunction. *J. Am. Heart Assoc.* 2, e003764.

Hortelano, S., Dewez, B., Genaro, A.M., Díaz-Guerra, M.J.M., and Boscá, L. (1995). Nitric oxide is released in regenerating liver after partial hepatectomy. *Hepatology* 21, 776–786.

Hu, G., Drescher, K.M., and Chen, X.-M. (2012). Exosomal miRNAs: Biological Properties and Therapeutic Potential. *Front. Genet.* 3.

Hunter, M.P., Ismail, N., Zhang, X., Aguda, B.D., Lee, E.J., Yu, L., Xiao, T., Schafer, J., Lee, M.-L.T., Schmittgen, T.D., et al. (2008). Detection of microRNA Expression in Human Peripheral Blood Microvesicles. *PLoS ONE* 3, e3694.

Huo, Y., Schober, A., Forlow, S.B., Smith, D.F., Hyman, M.C., Jung, S., Littman, D.R., Weber, C., and Ley, K. (2003). Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E. *Nat. Med.* 9, 61–67.

Jansen, F., Yang, X., Franklin, B.S., Hoelscher, M., Schmitz, T., Bedorf, J., Nickenig, G., and Werner, N. (2013). High glucose condition increases NADPH oxidase activity in endothelial microparticles that promote vascular inflammation. *Cardiovasc. Res.* 98, 94–106.

Jimenez, J.J., Jy, W., Mauro, L.M., Soderland, C., Horstman, L.L., and Ahn, Y.S. (2003). Endothelial cells release phenotypically and quantitatively distinct microparticles in activation and apoptosis. *Thromb. Res.* 109, 175–180.

Johnnidis, J.B., Harris, M.H., Wheeler, R.T., Stehling-Sun, S., Lam, M.H., Kirak, O., Brummelkamp, T.R., Fleming, M.D., and Camargo, F.D. (2008). Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223. *Nature* 451, 1125–1129.

Jollow, D.J., Mitchell, J.R., Zampaglione, N., and Gillette, J.R. (1974). Bromobenzene-Induced Liver Necrosis. Protective Role of Glutathione and Evidence for 3,4-Bromobenzene Oxide as the Hepatotoxic Metabolite. *Pharmacology* 11, 151–169.

Karolina, D.S., Tavintharan, S., Armugam, A., Sepramaniam, S., Pek, S.L.T., Wong, M.T.K., Lim, S.C., Sum, C.F., and Jeyaseelan, K. (2012). Circulating miRNA Profiles in Patients with Metabolic Syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97, E2271–E2276.

Karpoff, L., Vinet, A., Schuster, I., Oudot, C., Goret, L., Dauzat, M., Obert, P., and Perez-Martin, A. (2009). Abnormal vascular reactivity at rest and exercise in obese boys. *Eur. J. Clin. Invest.* 39, 94–102.

Karvonen, M. (1957). The effects of training on heart rate. A longitudinal study. *Ann Ned Exp Biol Fenn* 35, 307–315.

- Kelley, G.A., Kelley, K.S., and Tran, Z.V. (2004). Aerobic Exercise and Lipids and Lipoproteins in Women: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *J. Womens Health* 13, 1148–1164.
- Kern, P.A., Gregorio, G.B.D., Lu, T., Rassouli, N., and Ranganathan, G. (2003). Adiponectin Expression From Human Adipose Tissue Relation to Obesity, Insulin Resistance, and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Expression. *Diabetes* 52, 1779–1785.
- Kershaw, E.E., and Flier, J.S. (2004). Adipose Tissue as an Endocrine Organ. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 2548–2556.
- Kleinbongard, P., Dejam, A., Lauer, T., Rassaf, T., Schindler, A., Picker, O., Scheeren, T., Gödecke, A., Schrader, J., Schulz, R., et al. (2003). Plasma nitrite reflects constitutive nitric oxide synthase activity in mammals. *Free Radic. Biol. Med.* 35, 790–796.
- Knudson, J.D., Payne, G.A., Borbouse, L., and Tune, J.D. (2008). Leptin and mechanisms of endothelial dysfunction and cardiovascular disease. *Curr. Hypertens. Rep.* 10, 434–439.
- Kondo, T., Kobayashi, I., and Murakami, M. (2006). Effect of Exercise on Circulating Adipokine Levels in Obese Young Women. *Endocr. J.* 53, 189–195.
- Köppler, B., Cohen, C., Schlöndorff, D., and Mack, M. (2006). Differential mechanisms of microparticle transfer to B cells and monocytes: anti-inflammatory properties of microparticles. *Eur. J. Immunol.* 36, 648–660.
- Kuboki, K., Jiang, Z.Y., Takahara, N., Ha, S.W., Igarashi, M., Yamauchi, T., Feener, E.P., Herbert, T.P., Rhodes, C.J., and King, G.L. (2000). Regulation of Endothelial Constitutive Nitric Oxide Synthase Gene Expression in Endothelial Cells and In Vivo A Specific Vascular Action of Insulin. *Circulation* 101, 676–681.
- Lakka, T.A., Venäläinen, J.M., Rauramaa, R., Salonen, R., Tuomilehto, J., and Salonen, J.T. (1994). Relation of leisure-time physical activity and cardiorespiratory fitness to the risk of acute myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* 330, 1549–1554.
- Landrier, J.-F., Malezet-Desmoulins, C., Reboul, E., Marie Lorec, A., Josèphe Amiot, M., and Borel, P. (2008). Comparison of different vehicles to study the effect of tocopherols on gene expression in intestinal cells. *Free Radic. Res.* 42, 523–530.

- Lauer, T., Preik, M., Rassaf, T., Strauer, B.E., Deussen, A., Feelisch, M., and Kelm, M. (2001). Plasma nitrite rather than nitrate reflects regional endothelial nitric oxide synthase activity but lacks intrinsic vasodilator action. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 12814–12819.
- Laufs, U., Wassmann, S., Czech, T., Münzel, T., Eisenhauer, M., Böhm, M., and Nickenig, G. (2005). Physical Inactivity Increases Oxidative Stress, Endothelial Dysfunction, and Atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25, 809–814.
- Lean, M.E., Han, T.S., and Morrison, C.E. (1995). Waist circumference as a measure for indicating need for weight management. *BMJ* 311, 158–161.
- Léger, P. (2005). Exploration de la microcirculation : débitmétrie doppler laser. *EMC - Cardiol.-Angéiologie* 2, 81–85.
- Léger, L.A., and Lambert, J. (1982). A maximal multistage 20-m shuttle run test to predict  $\dot{V}O_2$  max. *Eur. J. Appl. Physiol.* 49, 1–12.
- Lekakis, J., Abraham, P., Balbarini, A., Blann, A., Boulanger, C.M., Cockcroft, J., Cosentino, F., Deanfield, J., Gallino, A., Ikonomidis, I., et al. (2011). Methods for evaluating endothelial function: a position statement from the European Society of Cardiology Working Group on Peripheral Circulation. *Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil.* 18, 775–789.
- Lemieux, I., Couillard, C., Pascot, A., Bergeron, N., Prud'homme, D., Bergeron, J., Tremblay, A., Bouchard, C., Mauriège, P., and Després, J.-P. (2000). The small, dense LDL phenotype as a correlate of postprandial lipemia in men. *Atherosclerosis* 153, 423–432.
- Lemoine, S., Thabut, D., Housset, C., Moreau, R., Valla, D., Boulanger, C.M., and Rautou, P.-E. (2014). The emerging roles of microvesicles in liver diseases. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 11, 350–361.
- Li, T.Y., Rana, J.S., Manson, J.E., Willett, W.C., Stampfer, M.J., Colditz, G.A., Rexrode, K.M., and Hu, F.B. (2006). Obesity as Compared With Physical Activity in Predicting Risk of Coronary Heart Disease in Women. *Circulation* 113, 499–506.
- Lindemann, S., Tolley, N.D., Dixon, D.A., McIntyre, T.M., Prescott, S.M., Zimmerman, G.A., and Weyrich, A.S. (2001). Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1 $\beta$  synthesis. *J. Cell Biol.* 154, 485–490.

Ling, H.-Y., Ou, H.-S., Feng, S.-D., Zhang, X.-Y., Tuo, Q.-H., Chen, L.-X., Zhu, B.-Y., Gao, Z.-P., Tang, C.-K., Yin, W.-D., et al. (2009). CHANGES IN microRNA (miR) PROFILE AND EFFECTS OF miR-320 IN INSULIN-RESISTANT 3T3-L1 ADIPOCYTES. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 36, e32–e39.

Liu, M.-L., Reilly, M.P., Casasanto, P., McKenzie, S.E., and Williams, K.J. (2007). Cholesterol Enrichment of Human Monocyte/Macrophages Induces Surface Exposure of Phosphatidylserine and the Release of Biologically-Active Tissue Factor-Positive Microvesicles. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27, 430–435.

Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods* 25, 402–408.

Lovren, F., and Verma, S. (2013). Evolving Role of Microparticles in the Pathophysiology of Endothelial Dysfunction. *Clin. Chem.* 59, 1166–1174.

Lumeng, C.N., Bodzin, J.L., and Saltiel, A.R. (2007). Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J. Clin. Invest.* 117, 175–184.

Maachi, M., Piéroni, L., Bruckert, E., Jardel, C., Fellahi, S., Hainque, B., Capeau, J., and Bastard, J.-P. (2004). Systemic low-grade inflammation is related to both circulating and adipose tissue TNF $\alpha$ , leptin and IL-6 levels in obese women. *Int. J. Obes.* 28, 993–997.

MacDonald, M.J., and Currie, K.D. (2009). Interval exercise is a path to good health, but how much, how often and for whom? *Clin. Sci.* 116, 315–316.

Mack, M., Kleinschmidt, A., Brühl, H., Klier, C., Nelson, P.J., Cihak, J., Plachý, J., Stangassinger, M., Erfle, V., and Schlöndorff, D. (2000). Transfer of the chemokine receptor CCR5 between cells by membrane-derived microparticles: A mechanism for cellular human immunodeficiency virus 1 infection. *Nat. Med.* 6, 769–775.

MacKenzie, A., Wilson, H.L., Kiss-Toth, E., Dower, S.K., North, R.A., and Surprenant, A. (2001). Rapid Secretion of Interleukin-1 $\beta$  by Microvesicle Shedding. *Immunity* 15, 825–835.

Madamanchi, N.R., Vendrov, A., and Runge, M.S. (2005). Oxidative Stress and Vascular Disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25, 29–38.

- Mao, G.D., and Poznansky, M.J. (1992). Electron spin resonance study on the permeability of superoxide radicals in lipid bilayers and biological membranes. *FEBS Lett.* *305*, 233–236.
- Martin, S., Tesse, A., Hugel, B., Martínez, M.C., Morel, O., Freyssinet, J.-M., and Andriantsitohaina, R. (2004). Shed membrane particles from T lymphocytes impair endothelial function and regulate endothelial protein expression. *Circulation* *109*, 1653–1659.
- Martínez, M.C., Tesse, A., Zobairi, F., and Andriantsitohaina, R. (2005). Shed membrane microparticles from circulating and vascular cells in regulating vascular function. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* *288*, H1004–H1009.
- Martinez, M.C., Tual-Chalot, S., Leonetti, D., and Andriantsitohaina, R. (2011). Microparticles: targets and tools in cardiovascular disease. *Trends Pharmacol. Sci.* *32*, 659–665.
- Mastronardi, M.L., Mostefai, H.A., Soleti, R., Agouni, A., Martínez, M.C., and Andriantsitohaina, R. (2011). Microparticles from apoptotic monocytes enhance nitrosative stress in human endothelial cells. *Fundam. Clin. Pharmacol.* *25*, 653–660.
- Mather, K.J., Mirzamohammadi, B., Lteif, A., Steinberg, H.O., and Baron, A.D. (2002). Endothelin Contributes to Basal Vascular Tone and Endothelial Dysfunction in Human Obesity and Type 2. Diabetes *51*, 3517–3523.
- Mattusch, Dufaux, Heine, Mertens, and Rost (2000). Reduction of the Plasma Concentration of C-Reactive Protein Following Nine Months of Endurance Training. *Int. J. Sports Med.* *21*, 21–24.
- Maury, E., Noël, L., Detry, R., and Brichard, S.M. (2009). In Vitro Hyperresponsiveness to Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Contributes to Adipokine Dysregulation in Omental Adipocytes of Obese Subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *94*, 1393–1400.
- Mause, S.F., and Weber, C. (2010). Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange. *Circ. Res.* *107*, 1047–1057.
- McGuire, J.J., Ding, H., and Triggle, C.R. (2001). Endothelium-derived relaxing factors: a focus on endothelium-derived hyperpolarizing factor(s). *Can. J. Physiol. Pharmacol.* *79*, 443–470.

- Mesri, M., and Altieri, D.C. (1999). Leukocyte Microparticles Stimulate Endothelial Cell Cytokine Release and Tissue Factor Induction in a JNK1 Signaling Pathway. *J. Biol. Chem.* 274, 23111–23118.
- Meyer, A.A., Kundt, G., Lenschow, U., Schuff-Werner, P., and Kienast, W. (2006). Improvement of early vascular changes and cardiovascular risk factors in obese children after a six-month exercise program. *J. Am. Coll. Cardiol.* 48, 1865–1870.
- Miâdi-Messaoud, H., Chouchane, A., Abderrazek, E., Debbabi, H., Zaouali-Ajina, M., Tabka, Z., and Ben-Jebria, A. (2009). Obesity-induced impairment of endothelium-dependent vasodilation in Tunisian women. *Int. J. Obes.* 34, 273–279.
- Miyauchi, T., and Masaki, T. (1999). Pathophysiology of Endothelin in the Cardiovascular System. *Annu. Rev. Physiol.* 61, 391–415.
- Moién-Afshari, F., Ghosh, S., Elmi, S., Khazaei, M., Rahman, M.M., Sallam, N., and Laher, I. (2008). Exercise restores coronary vascular function independent of myogenic tone or hyperglycemic status in db/db mice. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* 295, H1470–H1480.
- Montero, D., Walther, G., Perez-Martin, A., Mercier, C.S., Gayraud, S., Vicente-Salar, N., Sempere-Ortells, J.M., Martinez-Peinado, P., Roche, E., and Vinet, A. (2014). Effects of a Lifestyle Program on Vascular Reactivity in Macro- and Microcirculation in Severely Obese Adolescents. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 99, 1019–1026.
- Mooren, F.C., Viereck, J., Krüger, K., and Thum, T. (2014). Circulating micrnas as potential biomarkers of aerobic exercise capacity. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* 306, H557–H563.
- Mostefai, H.A., Meziani, F., Mastronardi, M.L., Agouni, A., Heymes, C., Sargentini, C., Asfar, P., Martinez, M.C., and Andriantsitohaina, R. (2008). Circulating Microparticles from Patients with Septic Shock Exert Protective Role in Vascular Function. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 178, 1148–1155.
- Mourad, J.-J., Guetz, G. des, Debbabi, H., and Levy, B.I. (2007). Blood pressure rise following angiogenesis inhibition by bevacizumab. A crucial role for microcirculation. *Ann. Oncol.* 18, 550.

- Müller, G. (2012). Microvesicles/exosomes as potential novel biomarkers of metabolic diseases. *Diabetes Metab. Syndr. Obes. Targets Ther.* 5, 247–282.
- Münzel, T., Daiber, A., Ullrich, V., and Mülsch, A. (2005). Vascular Consequences of Endothelial Nitric Oxide Synthase Uncoupling for the Activity and Expression of the Soluble Guanylyl Cyclase and the cGMP-Dependent Protein Kinase. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25, 1551–1557.
- Nassis, G.P., Papantakou, K., Skenderi, K., Triandafillopoulou, M., Kavouras, S.A., Yannakoulia, M., Chrousos, G.P., and Sidossis, L.S. (2005). Aerobic exercise training improves insulin sensitivity without changes in body weight, body fat, adiponectin, and inflammatory markers in overweight and obese girls. *Metabolism* 54, 1472–1479.
- Navasolava, N.M., Dignat-George, F., Sabatier, F., Larina, I.M., Demiot, C., Fortrat, J.-O., Gauquelin-Koch, G., Kozlovskaya, I.B., and Custaud, M.-A. (2010). Enforced physical inactivity increases endothelial microparticle levels in healthy volunteers. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* 299, H248–H256.
- Neth, P., Nazari-Jahantigh, M., Schober, A., and Weber, C. (2013). MicroRNAs in flow-dependent vascular remodeling. *Cardiovasc. Res.* cvt096.
- Nielsen, S., Åkerström, T., Rinnov, A., Yfanti, C., Scheele, C., Pedersen, B.K., and Laye, M.J. (2014). The miRNA Plasma Signature in Response to Acute Aerobic Exercise and Endurance Training. *PLoS ONE* 9, e87308.
- Nitenberg, A., and Antony, I. (2004). Comment évaluer la fonction endothéliale chez l'homme ? *Lett. Cardiol.* 17–24.
- Nomura, S., Tandon, N.N., Nakamura, T., Cone, J., Fukuhara, S., and Kambayashi, J. (2001). High-shear-stress-induced activation of platelets and microparticles enhances expression of cell adhesion molecules in THP-1 and endothelial cells. *Atherosclerosis* 158, 277–287.
- Noronha, B.T., Li, J.-M., Wheatcroft, S.B., Shah, A.M., and Kearney, M.T. (2005). Inducible Nitric Oxide Synthase Has Divergent Effects on Vascular and Metabolic Function in Obesity. *Diabetes* 54, 1082–1089.

Okada, S., Hiuge, A., Makino, H., Nagumo, A., Takaki, H., Konishi, H., Goto, Y., Yoshimasa, Y., and Miyamoto, Y. (2010). Effect of Exercise Intervention on Endothelial Function and Incidence of Cardiovascular Disease in Patients with Type 2 Diabetes. *J. Atheroscler. Thromb.* *17*, 828–833.

O’Leary, D.S. (1991). Regional vascular resistance vs. conductance: which index for baroreflex responses? *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* *260*, H632–H637.

« OMS | Activité physique ». (2015). *WHO*. Consulté le septembre 15. <http://www.who.int/dietphysicalactivity/pa/fr/>.

« OMS | Maladies cardiovasculaires ». (2015). *WHO*. Consulté le mai 11. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/fr/>.

« OMS | Obésité et surpoids ». (2015). *WHO*. Consulté le mars 24. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/fr/>.

Ortega, F.J., Mercader, J.M., Catalán, V., Moreno-Navarrete, J.M., Pueyo, N., Sabater, M., Gómez-Ambrosi, J., Anglada, R., Fernández-Formoso, J.A., Ricart, W., et al. (2013). Targeting the Circulating MicroRNA Signature of Obesity. *Clin. Chem.* *59*, 781–792.

Ouchi, N., Parker, J.L., Lugus, J.J., and Walsh, K. (2011). Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat. Rev. Immunol.* *11*, 85–97.

Papandreou, C., Mourad, T.A., Jildeh, C., Abdeen, Z., Philalithis, A., and Tzanakis, N. (2008). Obesity in Mediterranean region (1997–2007): a systematic review. *Obes. Rev.* *9*, 389–399.

Párrizas, M., Brugnara, L., Esteban, Y., González-Franquesa, A., Canivell, S., Murillo, S., Gordillo-Bastidas, E., Cussó, R., Cadefau, J.A., García-Roves, P.M., et al. (2015). Circulating miR-192 and miR-193b are markers of prediabetes and are modulated by an exercise intervention. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *100*, E407–E415.

Pearson, T.A., Mensah, G.A., Alexander, R.W., Anderson, J.L., Cannon, R.O., Criqui, M., Fadl, Y.Y., Fortmann, S.P., Hong, Y., Myers, G.L., et al. (2003). Markers of Inflammation and Cardiovascular Disease Application to Clinical and Public Health Practice: A Statement for Healthcare Professionals From the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation* *107*, 499–511.

- Pedersen, B.K., and Saltin, B. (2006). Evidence for prescribing exercise as therapy in chronic disease. *Scand. J. Med. Sci. Sports* 16, 3–63.
- Pellegrin, M., Mazzolai, L., Berthelot, A., and Laurant, P. (2009). Dysfonction endothéliale et risque cardiovasculaire. L'exercice protège la fonction endothéliale et prévient la maladie cardiovasculaire. *Sci. Sports* 24, 63–73.
- Pereira, M.A., Weggemans, R.M., Jacobs, D.R., Hannan, P.J., Zock, P.L., Ordovas, J.M., and Katan, M.B. (2004). Within-person variation in serum lipids: implications for clinical trials. *Int. J. Epidemiol.* 33, 534–541.
- Perreault, M., and Marette, A. (2001). Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against obesity-linked insulin resistance in muscle. *Nat. Med.* 7, 1138–1143.
- Perticone, F., Ceravolo, R., Candigliota, M., Ventura, G., Iacopino, S., Sinopoli, F., and Mattioli, P.L. (2001). Obesity and body fat distribution induce endothelial dysfunction by oxidative stress: protective effect of vitamin C. *Diabetes* 50, 159–165.
- Pinheiro, A.R., Cunha, A.R., Aguila, M.B., and Mandarim-de-Lacerda, C.A. (2007). Beneficial effects of physical exercise on hypertension and cardiovascular adverse remodeling of diet-induced obese rats. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 17, 365–375.
- Pizzirani, C., Ferrari, D., Chiozzi, P., Adinolfi, E., Sandonà, D., Savaglio, E., and Virgilio, F.D. (2007). Stimulation of P2 receptors causes release of IL-1 $\beta$ -loaded microvesicles from human dendritic cells. *Blood* 109, 3856–3864.
- Poirier, P., and Després, J.-P. (2003). Obésité et maladies cardiovasculaires. *MS Médecine Sci.* 19, 943–949.
- Polak, J., Klimcakova, E., Moro, C., Viguerie, N., Berlan, M., Hejnova, J., Richterova, B., Kraus, I., Langin, D., and Stich, V. (2006). Effect of aerobic training on plasma levels and subcutaneous abdominal adipose tissue gene expression of adiponectin, leptin, interleukin 6, and tumor necrosis factor  $\alpha$  in obese women. *Metabolism* 55, 1375–1381.
- Pouliot, M.C., Després, J.P., Nadeau, A., Moorjani, S., Prud'Homme, D., Lupien, P.J., Tremblay, A., and Bouchard, C. (1992). Visceral obesity in men. Associations with glucose tolerance, plasma insulin, and lipoprotein levels. *Diabetes* 41, 826–834.

Preston, R.A., Jy, W., Jimenez, J.J., Mauro, L.M., Horstman, L.L., Valle, M., Aime, G., and Ahn, Y.S. (2003). Effects of Severe Hypertension on Endothelial and Platelet Microparticles. *Hypertension* 41, 211–217.

Rankinen, T., Zuberi, A., Chagnon, Y.C., Weisnagel, S.J., Argyropoulos, G., Walts, B., Pérusse, L., and Bouchard, C. (2006). The Human Obesity Gene Map: The 2005 Update. *Obesity* 14, 529–644.

Richard, M.J., Portal, B., Meo, J., Coudray, C., Hadjian, A., and Favier, A. (1992). Malondialdehyde kit evaluated for determining plasma and lipoprotein fractions that react with thiobarbituric acid. *Clin. Chem.* 38, 704–709.

Rorive, M., Letiexhe, M., Scheen, A., and Ziegler, O. (2005). Obesite et diabete de type 2. *Rev. Médicale Liège* 60.

Ross, R., Janssen, I., Dawson, J., Kungl, A.-M., Kuk, J.L., Wong, S.L., Nguyen-Duy, T.-B., Lee, S., Kilpatrick, K., and Hudson, R. (2004). Exercise-Induced Reduction in Obesity and Insulin Resistance in Women: a Randomized Controlled Trial. *Obes. Res.* 12, 789–798.

Rozmyslowicz, T., Majka, M., Kijowski, J., Murphy, S.L., Conover, D.O., Poncz, M., Ratajczak, J., Gaulton, G.N., and Ratajczak, M.Z. (2003). Platelet- and megakaryocyte-derived microparticles transfer CXCR4 receptor to CXCR4-null cells and make them susceptible to infection by X4-HIV. *AIDS* 17, 33–42.

Sabatier, F., Darmon, P., Hugel, B., Combes, V., Sanmarco, M., Velut, J., Arnoux, D., Charpiot, P., Freyssinet, J., Oliver, C., et al. (2002). Type 1 and type 2 diabetic patients display different patterns of cellular microparticles. *Diabetes* 51, 2840–2845.

Sabatier, F., Lacroix, R., Camoin-Jau, L., Anfosso, F., Sampol, J., and Dignat-George, F. (2011a). Cellules endothéliales circulantes, microparticules et progéniteurs : vers la définition de la « vasculocompétence ». *Rev. Médecine Interne* 32, 54–63.

Sabatier, F., Lacroix, R., Camoin-Jau, L., Anfosso, F., Sampol, J., and Dignat-George, F. (2011b). Cellules endothéliales circulantes, microparticules et progéniteurs : vers la définition de la « vasculocompétence ». *Rev. Médecine Interne* 32, 54–63.

Sanguignol, F. (2008). L'obésité : une maladie chronique multifactorielle. *Kinésithérapie Rev.* 8, 14–16.

Santos-Parker, J.R., LaRocca, T.J., and Seals, D.R. (2014). Aerobic exercise and other healthy lifestyle factors that influence vascular aging. *Adv. Physiol. Educ.* 38, 296–307.

Schlossmann, J., Feil, R., and Hofmann, F. (2003). Signaling through NO and cGMP-dependent protein kinases. *Ann. Med.* 35, 21–27.

Schmidt, T.S., and Alp, N.J. (2007). Mechanisms for the role of tetrahydrobiopterin in endothelial function and vascular disease. *Clin. Sci.* 113, 47–63.

Schroen, B., and Heymans, S. (2012). Small but smart—microRNAs in the centre of inflammatory processes during cardiovascular diseases, the metabolic syndrome, and ageing. *Cardiovasc. Res.* 93, 605–613.

Sciacqua, A., Candigliota, M., Ceravolo, R., Scozzafava, A., Sinopoli, F., Corsonello, A., Sesti, G., and Perticone, F. (2003). Weight Loss in Combination With Physical Activity Improves Endothelial Dysfunction in Human Obesity. *Diabetes Care* 26, 1673–1678.

Serné, E.H., Jongh, R.T. de, Eringa, E.C., IJzerman, R.G., and Stehouwer, C.D.A. (2007). Microvascular Dysfunction A Potential Pathophysiological Role in the Metabolic Syndrome. *Hypertension* 50, 204–211.

Shimabukuro, M., Higa, N., Asahi, T., Oshiro, Y., Takasu, N., Tagawa, T., Ueda, S., Shimomura, I., Funahashi, T., and Matsuzawa, Y. (2003). Hypoadiponectinemia Is Closely Linked to Endothelial Dysfunction in Man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88, 3236–3240.

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

Silver, A.E., Beske, S.D., Christou, D.D., Donato, A.J., Moreau, K.L., Eskurza, I., Gates, P.E., and Seals, D.R. (2007). Overweight and Obese Humans Demonstrate Increased Vascular Endothelial NAD(P)H Oxidase-p47phox Expression and Evidence of Endothelial Oxidative Stress. *Circulation* 115, 627–637.

van Sloten, T.T., Czernichow, S., Houben, A.J., Protogerou, A.D., Henry, R.M., Muris, D.M., Schram, M.T., Sep, S.J., Dagnelie, P.C., van der Kallen, C.J., et al. (2014). Association Between

Arterial Stiffness and Skin Microvascular Function: The SUVIMAX2 Study and The Maastricht Study. *Am. J. Hypertens.*

Soleti, R., Benameur, T., Porro, C., Panaro, M.A., Andriantsitohaina, R., and Martínez, M.C. (2009). Microparticles harboring Sonic Hedgehog promote angiogenesis through the upregulation of adhesion proteins and proangiogenic factors. *Carcinogenesis* *30*, 580–588.

Stocker, R., and Keaney, J.F. (2004). Role of Oxidative Modifications in Atherosclerosis. *Physiol. Rev.* *84*, 1381–1478.

Straznicky, N.E., Grima, M.T., Sari, C.I., Eikelis, N., Lambert, E.A., Nestel, P.J., Esler, M.D., Dixon, J.B., Chopra, R., Tilbrook, A.J., et al. (2012). Neuroadrenergic Dysfunction Along the Diabetes Continuum A Comparative Study in Obese Metabolic Syndrome Subjects. *Diabetes* *61*, 2506–2516.

Sturm, W., Sandhofer, A., Engl, J., Laimer, M., Molnar, C., Kaser, S., Weiss, H., Tilg, H., Ebenbichler, C.F., and Patsch, J.R. (2009). Influence of Visceral Obesity and Liver Fat on Vascular Structure and Function in Obese Subjects. *Obesity* *17*, 1783–1788.

Sun, D., Huang, A., Koller, A., and Kaley, G. (1994). Short-term daily exercise activity enhances endothelial NO synthesis in skeletal muscle arterioles of rats. *J. Appl. Physiol.* *76*, 2241–2247.

Taganov, K.D., Boldin, M.P., Chang, K.-J., and Baltimore, D. (2006). NF- $\kappa$ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 12481–12486.

Tijssen, A.J., Pinto, Y.M., and Creemers, E.E. (2012). Circulating microRNAs as diagnostic biomarkers for cardiovascular diseases. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* *303*, H1085–H1095.

Tjønnå, A.E., Lee, S.J., Rognmo, Ø., Stølen, T.O., Bye, A., Haram, P.M., Loennechen, J.P., Al-Share, Q.Y., Skogvoll, E., Slørdahl, S.A., et al. (2008). Aerobic Interval Training Versus Continuous Moderate Exercise as a Treatment for the Metabolic Syndrome A Pilot Study. *Circulation* *118*, 346–354.

Tjønnå, A.E., Stølen, T.O., Bye, A., Volden, M., Slørdahl, S.A., Ødegård, R., Skogvoll, E., and Wisløff, U. (2009). Aerobic interval training reduces cardiovascular risk factors more than a multitreatment approach in overweight adolescents. *Clin. Sci.* *116*, 317–326.

Touati, S., Meziri, F., Devaux, S., Berthelot, A., Touyz, R.M., and Laurant, P. (2011). Exercise Reverses Metabolic Syndrome in High-Fat Diet-Induced Obese Rats: *Med. Sci. Sports Exerc.* *43*, 398–407.

Touati, S., Montezano, A.C., Meziri, F., Riva, C., Touyz, R.M., and Laurant, P. (2015). Exercise training protects against atherosclerotic risk factors through vascular NADPH oxidase, extracellular signal-regulated kinase 1/2 and stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase downregulation in obese rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* *42*, 179–185.

Trayhurn, P., and Wood, I.S. (2004). Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br. J. Nutr.* *92*, 347–355.

Tual-Chalot, S., Fatoumata, K., Priou, P., Trzepizur, W., Gaceb, A., Contreras, C., Prieto, D., Martinez, M.C., Gagnadoux, F., and Andriantsitohaina, R. (2012). Circulating Microparticles from Patients with Obstructive Sleep Apnea Enhance Vascular Contraction: Mandatory Role of the Endothelium. *Am. J. Pathol.* *181*, 1473–1482.

Tushuizen, M.E., Diamant, M., Sturk, A., and Nieuwland, R. (2011). Cell-Derived Microparticles in the Pathogenesis of Cardiovascular Disease Friend or Foe? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *31*, 4–9.

Ulker, S., McKeown, P.P., and Bayraktutan, U. (2003). Vitamins reverse endothelial dysfunction through regulation of eNOS and NAD(P)H oxidase activities. *Hypertension* *41*, 534–539.

Vague, J. (1956). The degree of masculine differentiation of obesities: a factor determining predisposition to diabetes, atherosclerosis, gout, and uric calculous disease. *Am. J. Clin. Nutr.* *4*, 20–34.

Vanhees, L., Geladas, N., Hansen, D., Kouidi, E., Niebauer, J., Reiner, Z., Cornelissen, V., Adamopoulos, S., Prescott, E., Borjesson, M., et al. (2012). Importance of characteristics and modalities of physical activity and exercise in the management of cardiovascular health in

individuals with cardiovascular risk factors: recommendations from the EACPR (Part II). *Eur. J. Prev. Cardiol.* *19*, 1005–1033.

Vanhoutte, P. (2012). Obesity and vascular dysfunction: the fat-e of rich and poor. *Br. J. Pharmacol.* *165*, 541–543.

Vanhoutte, P.M. (1989). Endothelium and control of vascular function. State of the Art lecture. *Hypertension* *13*, 658–667.

Vanhoutte, P.M., Shimokawa, H., Tang, E.H.C., and Feletou, M. (2009). Endothelial dysfunction and vascular disease. *Acta Physiol. Oxf. Engl.* *196*, 193–222.

VanWijk, M.J., VanBavel, E., Sturk, A., and Nieuwland, R. (2003). Microparticles in cardiovascular diseases. *Cardiovasc. Res.* *59*, 277–287.

Vincent, H.K., and Taylor, A.G. (2005). Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. *Int. J. Obes.* *30*, 400–418.

Votruba, S.B., Horvitz, M.A., and Schoeller, D.A. (2000). The role of exercise in the treatment of obesity. *Nutrition* *16*, 179–188.

Wahl, P., Jansen, F., Achtzehn, S., Schmitz, T., Bloch, W., Mester, J., and Werner, N. (2014). Effects of High Intensity Training and High Volume Training on Endothelial Microparticles and Angiogenic Growth Factors. *PLoS ONE* *9*, e96024.

Walther, C., Gielen, S., and Hambrecht, R. (2004). The effect of exercise training on endothelial function in cardiovascular disease in humans. *Exerc. Sport Sci. Rev.* *32*, 129–134.

Watts, K., Beye, P., Siafarikas, A., O'Driscoll, G., Jones, T.W., Davis, E.A., and Green, D.J. (2004). Effects of exercise training on vascular function in obese children. *J. Pediatr.* *144*, 620–625.

Weber, M., Baker, M.B., Moore, J.P., and Searles, C.D. (2010). MiR-21 is induced in endothelial cells by shear stress and modulates apoptosis and eNOS activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *393*, 643–648.

Williams, I.L., Wheatcroft, S.B., Shah, A.M., and Kearney, M.T. (2002). Obesity, atherosclerosis and the vascular endothelium: mechanisms of reduced nitric oxide bioavailability in obese humans. *Int. J. Obes.* 26, 754–764.

Wing, R.R. (1999). Physical activity in the treatment of the adulthood overweight and obesity: current evidence and research issues. *Med. Sci. Sports Exerc.* 31, S547–S552.

Wisløff, U., Støylen, A., Loennechen, J.P., Bruvold, M., Rognum, Ø., Haram, P.M., Tjønnå, A.E., Helgerud, J., Slørdahl, S.A., Lee, S.J., et al. (2007). Superior cardiovascular effect of aerobic interval training versus moderate continuous training in heart failure patients: a randomized study. *Circulation* 115, 3086–3094.

Witko-Sarsat, V., Friedlander, M., Capeillère-Blandin, C., Nguyen-Khoa, T., Nguyen, A.T., Zingraff, J., Jungers, P., and Descamps-Latscha, B. (1996). Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int.* 49, 1304–1313.

Wolf, P. (1967). The Nature and Significance of Platelet Products in Human Plasma. *Br. J. Haematol.* 13, 269–288.

Woo, K.S., Chook, P., Yu, C.W., Sung, R.Y.T., Qiao, M., Leung, S.S.F., Lam, C.W.K., Metreweli, C., and Celermajer, D.S. (2004). Effects of Diet and Exercise on Obesity-Related Vascular Dysfunction in Children. *Circulation* 109, 1981–1986.

Xu, T., Liu, Q., Yao, J., Dai, Y., Wang, H., and Xiao, J. (2015). Circulating microRNAs in response to exercise. *Scand. J. Med. Sci. Sports* 25, e149–e154.

Yamakuchi, M. (2012). MicroRNAs in Vascular Biology. *Int. J. Vasc. Med.* 2012, e794898.

Yetik-Anacak, G., and Catravas, J.D. (2006). Nitric oxide and the endothelium: history and impact on cardiovascular disease. *Vascul. Pharmacol.* 45, 268–276.

Yudkin, J.S., Kumari, M., Humphries, S.E., and Mohamed-Ali, V. (2000). Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link? *Atherosclerosis* 148, 209–214.

Zahra, S., Anderson, J.A.M., Stirling, D., and Ludlam, C.A. (2011). Microparticles, malignancy and thrombosis. *Br. J. Haematol.* 152, 688–700.

Zernecke, A., Bidzhekov, K., Noels, H., Shagdarsuren, E., Gan, L., Denecke, B., Hristov, M., Köppel, T., Jahantigh, M.N., Lutgens, E., et al. (2009). Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *Sci. Signal.* 2, ra81.

Zhang, C. (2010). MicroRNAs in Vascular Biology and Vascular Disease. *J Cardiovasc. Transl. Res.* 3, 235–240.