



Hyperglycémie et tissu adipeux, deux acteurs de la dysfonction vasculaire : implication du couple stress oxydant - eNOS et modulation par l'exercice physique

Cindy Meziat

► To cite this version:

Cindy Meziat. Hyperglycémie et tissu adipeux, deux acteurs de la dysfonction vasculaire : implication du couple stress oxydant - eNOS et modulation par l'exercice physique. Cardiologie et système cardiovasculaire. Université d'Avignon, 2016. Français. $\langle$ NNT : 2016AVIG0713 $\rangle$. $\langle$ tel-01481761 $\rangle$

HAL Id: tel-01481761

<https://theses.hal.science/tel-01481761v1>

Submitted on 2 Mar 2017

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.



HAL Authorization



THÈSE

En vue de l'obtention du titre de **Docteur**

Spécialité : **Physiologie**

ECOLE DOCTORALE D'AVIGNON ET DES PAYS DE VAUCLUSE

**Hyperglycémie et tissu adipeux, deux acteurs de la
dysfonction vasculaire :
Implication du couple stress oxydant – eNOS et modulation
par l'exercice physique.**

Soutenue le 22 Novembre 2016

par **Cindy MEZIAT**

Membres du Jury :

Mme. Ariane Sultan	PU-PH, INSERM Montpellier	Rapporteur
Mr. Cédric Moro	CR, INSERM, Toulouse	Rapporteur
Mme. Dominique Sigaud-Roussel	DR, CNRS, Lyon	Examineur
Mr. Pascal Laurant	PR, Université d'Avignon	Examineur
Mr. Cyril Reboul	MCF-HDR, Université d'Avignon	Directeur de Thèse
Mr. Guillaume Walther	MCF-HDR, Université d'Avignon	Co-Directeur de Thèse

LISTE DES PUBLICATIONS

Publications acceptées

J. Loader, D. Montero, C. Lorenzen, R. Watts, **C. Meziat**, C. Reboul, S. Stewart, G. Walther. Acute Hyperglycemia impairs vascular function in healthy and cardiometabolic disease subjects. Systematic Review and Meta-Analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015 Sep;35(9):2060-72. doi: 10.1161/ATVBAHA.115.305530.

C. Meziat, J. Loader, C. Reboul, G. Walther. Acute hyperglycemia impairs flow-mediated dilatation through an increase in vascular oxidative stress: winter is coming for excess sugar consumption. Response Letter. *Journal of Thoracic Disease.* Manuscript ID: JTD-2016-236; doi: 10.21037/jtd.2016.07.99.

Publications en cours

C. Meziat^{*}, J. Loader^{*}, R. Watts, C. Lorenzen, S. Battault, D. Sigaud-Roussel, S. Stewart, C. Reboul, G. Meyer, G. Walther. Effects of sugar-sweetened beverage consumption on micro- and macrovascular function in healthy subjects: a key role for oxidative stress. *2nd revision. Arterioscler Thromb Vasc Biology.* _ATVB/2016/308010D

S. Battault, **C. Meziat**, A. Do Nascimento, J. Peyrol, L. Braud, C. Legros, F. Denardi, J. Drai, J. Thireau, S. Gayraud, C. Reboul, G. Meyer. Endothelium masks increased α -adrenergic vasopressor activity in normotensive rats with metabolic syndrome. *Submitted. Int J Obesity.* 2016IJO01462

C. Meziat, D. Boulgobhra, E. Strock, J. Peyrol, A. Do Nascimento, B. Jover, G. Walther^{*}, C. Reboul^{*}. Phenotypic remodeling of perivascular adipose tissue in a rat model of metabolic syndrome: vascular consequences and beneficial impact of exercise training. *Manuscript under preparation.*

LISTE DES COMMUNICATIONS

European Muscle Conferences, September 2016 (Montpellier, France) - Oral communication

C. Meziat, D. Boulghobra, J. Peyrol, A. Nascimento, B. Jover, Guillaume Walther, Cyril Reboul. Impact of exercise training on perivascular adipose tissue in obese rats: consequences on vascular function.

French congress of Cardiology, Basic and clinical research, April 2016 (Dijon, France) - Poster and oral communication

C. Meziat, D. Boulghobra, A. Do Nascimento, E. Strock, S. Battault, G. Meyer, B. Jover, G. Walther*, C. Reboul*. Phenotypic remodeling of perivascular adipose tissue in a rat model of metabolic syndrome: vascular consequences and beneficial impact of exercise training.

“Public Science”, April 2016 (Avignon, France) – Oral communication

« Sugar : friend or foe ? »

French congress of Cardiology, Basic and clinical research, April 2015 (Toulouse, France) - Poster and oral communication

C. Meziat, A. Do Nascimento, G. Meyer, S. Gayrard, C. Reboul*, G. Walther*. Effect of training on crosstalk between vascular and perivascular adipose tissue: preliminary results.

French congress of Cardiology, Basic and clinical research, April 2015 (Toulouse, France) - Poster and oral communication

C. Meziat, J. Loader, R. Watts, G. Meyer, C. Reboul, A. Vinet, C. Lorenzen, G. Naughton, G. Walther. Sweet beverages-related acute hyperglycemia and vascular nitric-oxide endothelial dysfunction: can exercise training be a preventive strategy?

French congress of Cardiology, Basic and clinical research, April 2014 (Strasbourg, France) – Poster

C. Meziat, S. Battault, S. Gayrard, G. Meyer, C. Reboul, G. Walther. Sweet beverages-related acute hyperglycemia and vascular nitric-oxide endothelial dysfunction: can exercise training be a preventive strategy?

Cardiovascular and muscular translational research meeting February 2014 (Montpellier, France) - oral communication

C. Meziat, S. Battault, S. Gayrard, G. Meyer, C. Reboul, G. Walther. Sweet beverages-related acute hyperglycemia and vascular nitric-oxide endothelial dysfunction: can exercise training be a preventive strategy?

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE.....	1
REVUE DE LITTÉRATURE.....	6
PARTIE 1 : PHYSIOLOGIE VASCULAIRE.....	7
1. ANATOMIE DU SYSTÈME VASCULAIRE.....	7
2. STRUCTURES VASCULAIRES.....	9
2.1. Composantes internes.....	9
2.2. Composante externe: le tissu adipeux périvasculaire.....	10
3. LA VASOMOTRICITE ARTERIELLE.....	12
3.1. Mécanisme de contraction/relaxation du muscle lisse vasculaire.....	13
3.2. Régulation du tonus vasculaire.....	14
3.2.1. Mécanismes nerveux.....	15
3.2.2. Mécanismes chimiques.....	16
3.3. Le NO.....	18
3.3.1. L'enzyme monoxyde d'azote synthase endothéliale (eNOS).....	19
3.3.1.1. L'activation calcium-dépendante.....	20
3.3.1.2. L'activation calcium-indépendante.....	21
3.3.2. Le NO et ses effets vasculaires.....	24
3.3.2.1. Voie NO/GMPc : mécanismes de vasodilatation.....	24
3.3.2.2. S-nitrosylation par le NO : mécanisme de modifications fonctionnelles.....	25
3.3.2.3. Effets anti-adhésif et anti-plaquettaire du NO.....	26
3.3.2.4. Rôle anti-oxydant du NO.....	26
3.4. Biocommunication entre le tissu artériel et le tissu adipeux périvasculaire.....	27
3.4.1. Le PVAT : phénotype particulier.....	27
3.4.2. Les effets vasorégulateurs du PVAT.....	29
3.4.2.1. Effet anti-contractile	30
3.4.2.2. Effet pro-contractile	31
3.4.2.3. Identité du/des PVRF.....	32
3.4.2.4. L'adiponectine : un messenger clé.....	33

PARTIE 2 : DESORDRES METABOLIQUES ET FONCTION VASCULAIRE	37
1. LA DYSFONCTION ENDOTHELIALE.....	37
1.1. Le stress oxydant vasculaire	37
1.1.1. Les sources d'EOR.....	38
1.1.2. Les défenses anti-oxydantes.....	39
1.2. Impacte des EOR sur la voie eNOS/NO	41
1.2.1. La diminution du substrat (L-arginine).....	41
1.2.2. L'oxydation du cofacteur essentiel : BH ₄	42
1.2.3. Le découplage de la eNOS par S-glutathiolylation.....	43
2. ALTERATIONS AIGUES ET CHRONIQUES DE LA FONCTION ENDOTHELIALE.....	44
2.1. Le syndrome métabolique et la fonction vasculaire	44
2.2. Impact de l'hyperglycémie sur la fonction endothéliale.	47
2.2.1. Hyperglycémie aigue.....	47
2.2.2. Hyperglycémie chronique.....	49
2.3. Impact de l'obésité sur la fonction endothéliale	50
2.4. Impact du syndrome métabolique sur le système nerveux sympathique	53
3. INFLUENCE DU PVAT SUR LA FONCTION VASCULAIRE AU SEIN DE PATHOLOGIES CARDIOMETABOLIQUES.....	54
3.1. Augmentation de la masse du PVAT	54
3.2. Modification du profil sécrétoire du PVAT	55
3.3. Quelle place pour le NO ?	57
3.3.1. Au sein du tissu adipeux.....	57
3.3.2. Au sein du PVAT.....	58

PARTIE 3 : L'EXERCICE PHYSIQUE, UNE STRATÉGIE NATURELLE POUR AMÉLIORER LA FONCTION ENDOTHÉLIALE VASCULAIRE	62
1. L'EXERCICE PHYSIQUE et LA FONCTION ENDOTHELIALE.....	62
1.1 La eNOS, une cible clé de l'exercice physique	63
1.2 Amélioration des défenses antioxydantes par l'exercice : une autre manière d'augmenter la bio-disponibilité du NO	64
2. L'EXERCICE PHYSIQUE et LES DESORDRES METABOLIQUES.....	65
2.1. Exercice physique et Syndrome métabolique	65
2.2. Exercice physique et Régulation de la glycémie	66
2.3. Exercice physique et Système nerveux sympathique	67

2.4. Exercice physique et Obésité.....	69
2.4.1. Quel est l'impact de l'exercice physique sur la masse du TA ?.....	69
2.4.2. Effets bénéfiques de l'exercice physique sur la dyslipidémie.....	70
2.4.3. Influence de l'exercice physique sur le phénotype adipocytaire.....	70
2.4.4. Comment l'exercice physique influence la sécrétion d'adipokines ?	72
OBJECTIFS DE THÈSE.....	76
MATERIELS ET METHODES.....	78
1. LES POPULATIONS.....	79
1.1. ETUDE N°1.....	79
1.2. ETUDE N°2.....	82
1.3. ETUDE N°3.....	83
2. PARAMETRES PHYSIOLOGIQUES ET BIOLOGIQUES.....	84
2.1.Mesure de la pression artérielle.....	84
2.1.1. Protocole clinique de l'ETUDE N°1.....	84
2.1.2. Protocole expérimental de l'ETUDE N°2.....	85
2.2.Evaluation du contrôle de la glycémie.....	86
2.2.1. Régulation de la glycémie chez l'homme.....	86
2.2.2. Régulation de la glycémie chez le rat.....	86
2.2.3. Evaluation de l'insulino-résistance.....	86
2.3.Evaluation de l'activité du système nerveux sympathique.....	87
2.3.1. Enregistrement ECG et analyse de la variabilité de la fréquence cardiaque.....	87
2.3.2. Mesure de la concentration plasmatique des catécholamines.....	88
3. EXPLORATION <i>IN VIVO</i> DE LA MICROCIRCULATION CUTANEE.....	89
3.1.Techniques d'exploration.....	89
3.2. Protocoles utilisés lors de l'ETUDE N°1.....	90
3.3. Protocole utilisé au cours de l'ETUDE N°2.....	93
4. EVALUATION <i>IN VIVO</i> DE LA FONCTION MACROCIRCULATOIRE.....	93
5. ETUDE DE LA REACTIVITE VASCULAIRE AORTIQUE <i>EX VIVO</i>	95
5.1.Protocole utilisé au cours de l'ETUDE N°1.....	96
5.2.Protocole utilisé au cours de l'ETUDE N°2.....	97
5.3.Protocoles utilisés au cours de l'ETUDE N°3.....	98

6. ANALYSES HISTOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES.....	101
6.1.Observation de coupes histologiques.....	101
6.2.Western Blots.....	102
6.2.1. Extraction et préparation des échantillons.....	102
6.2.2. Dosage des protéines.....	102
6.2.3. Western Immunoblotting.....	102
6.3.Evaluation du profil protéomique du tissu adipeux périvasculaire (Proteome Profiler [™] , RnDSystems).....	104
6.4.Evaluation du stress oxydant aortique.....	104
6.4.1. Résonance Paramagnétique Electronique (RPE).....	104
6.4.2. Dihydroéthidium (DHE).....	105
7. ANALYSES STATISTIQUES.....	106
 RESULTATS.....	 107
 ETUDE n°1.....	 108
ETUDE n°2.....	148
ETUDE n°3.....	175
 DISCUSSION GENERALE.....	 210
 CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	 219
 BIBLIOGRAPHIE.....	 222
 ANNEXES.....	 249

LISTE DES FIGURES

REVUE DE LITTÉRATURE

Figure 1 : Organisation du système cardiovasculaire.....	7
Figure 2 : Composantes vasculaires internes.....	10
Figure 3 : Organisation des différentes composantes de l'artère.....	12
Figure 4 : Mécanismes moléculaires de contraction/relaxation des CML vasculaires.....	14
Figure 5 : Mécanismes de régulation du tonus vasculaire.....	18
Figure 6 : Représentation schématique de la eNOS.....	20
Figure 7 : Action de l'insuline sur le tonus vasculaire en condition physiologique.....	23
Figure 8 : Mécanismes cellulaires impliqués dans la voie du NO.....	25
Figure 9 : Origine des différents types d'adipocytes.....	28
Figure 10 : Les différents phénotypes du PVAT.....	29
Figure 11 : Les fonctions pléiotropiques de l'adiponectine au sein du système cardiovasculaire.....	34
Figure 12 : Mécanismes des défenses antioxydantes.....	41
Figure 13 : Actions du stress oxydant sur la eNOS.....	43
Figure 14 : Prévalence de l'obésité chez l'adulte à travers le monde.....	45
Figure 15 : Prévalence du syndrome métabolique en fonction de l'âge et selon la définition de NCEP, ATP III et de l'IDF.....	46
Figure 16 : Mécanismes induit par le syndrome métabolique impliqués dans l'altération de la fonction endothéliale.....	47
Figure 17 : Altérations des voies de signalisations endothéliales de l'insuline dans un contexte d'obésité.....	52
Figure 18 : Représentation de la voie du NO dans la cellule adipeuse.....	58
Figure 19 : Production de NO par le TA, déterminée par 4,5-diaminofluorescein diacétate (DAF-2 DA).....	60
Figure 20 : Impact de l'exercice physique sur la fonction endothéliale en condition de syndrome métabolique.....	66
Figure 21 : Effets de l'exercice physique sur le métabolisme lipidique.....	74

MATERIELS ET METHODES

Tableau 1 : Résumé des différentes études réalisées au cours de ce travail.....	77
Tableau 2 : Composition nutritionnelles du régime HFS.....	83
Tableau 3 : Protocole d'entraînement utilisé au cours de l'ETUDE N°3.....	84
Tableau 4 : Liste des anticorps utilisés en Western Blot au cours de ce travail.....	103
Figure 22 : Protocole clinique de l'ETUDE N°1.....	80
Figure 23 : Protocole expérimental de l'ETUDE N°1.....	82
Figure 24 : Exemple de rendu graphique affiché par le logiciel du système CODA lors d'une mesure de pression artérielle.....	85
Figure 25 : Schéma du principe de la iontophorèse de drogues vasoactives.....	90
Figure 26 : Technique du LSCI couplé à l'iontophorèse de drogues vasoactives.....	91
Figure 27: Positionnement des sondes Doppler et électrodes d'iontophorèse sur un rat.....	92
Figure 28 : Représentation d'une cuve à organe isolé et de son fonctionnement.....	96
Figure 29: Représentation schématique du protocole utilisé au cours de l'ETUDE N°1....	97
Figure 30 : Représentation schématique du protocole utilisé lors de l'ETUDE N°2.....	98
Figure 31: Représentation schématique du protocole 1 de l'ETUDE N°3.....	99
Figure 32 : Représentation schématique du protocole 2 de l'ETUDE N°3.....	100
Figure 33 : Représentation schématique du protocole 3 de l'ETUDE N°3.....	101

RESULTATS

Résultats additionnels

Figure 34 : Flux sanguin cutané (CBF : cutaneous blood flow) de rats sains en situation normoglycémique (NG) ou en réponse à une hyperglycémie aiguë (HG).....	146
Figure 35 : Flux sanguin cutané (CBF : cutaneous blood flow) de rats sédentaires et entraînés, en situation normoglycémique (NG) ou en réponse à une hyperglycémie aiguë (HG).....	147
Figure 36 : Suivi longitudinal du flux sanguin cutané mesuré par Laser Doppler, en réponse à une iontophorèse d'acétylcholine (ACh) permettant d'évaluer la fonction de relaxation vasculaire endothélium-dépendante au niveau de la microcirculation cutanée de rats sains (Ctrl) et syndrome métabolique (HFS).....	174

ABRÉVIATIONS

ACh	Acétylcholine
AGE	Produits terminaux de glycation
Ang II	Angiotensine II
BH₄	Tétrahydrobioptérine
CaM	Calmoduline
CML	Cellules musculaires lisses
eNOS	Monoxyde d'azote synthase endothéliale
EOR	Espèces Oxygénées Réactives
ET-1	Endothéline 1
FAD	Flavine adenine dinucleotide
FMN	Flavine mono-nucléotide
GCs	Guanylate cyclase
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
GTP	Ganosine tri-phosphate
KCl	Chloride de potassium
NO	Monoxyde d'azote
O₂^{°-}	Anion superoxide
ONOO[°]	Peroxynitrite
PA	Pression artérielle
PE	Phényléphrine
PKG	Protéine Kinase G
PVAT	Perivascular Adipose Tissue
PVRF	PVAT-Relaxing factor
SMet	Syndrome Métabolique
SNS	Système Nerveux Sympathique
SOD	Superoxide Dismutase
TA	Tissu Adipeux
TNFα	Tumor Necrosis growth Factor α
UCP-1	Uncoupling protein 1

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Que ta nourriture soit ton médicament et que ton médicament soit dans ta nourriture » disait Hippocrate il y a environ 25 siècles. Ce précepte prend tout son sens à l'heure actuelle, où l'alimentation des populations est devenue un problème de santé majeur. En effet, l'augmentation de la consommation de plats industriels et de restauration rapide, pauvres en apports nutritionnels mais riche en lipides et en sucres simples, participent à l'épidémie de surpoids et d'obésité dans le monde.

D'après l'OMS en 2014, 39% (1,9 milliard) de la population mondiale adulte était en surpoids, et 13% (environ 600 millions) était obèse. Cette obésité est caractérisée par une accumulation progressive de tissu adipeux au sein de l'organisme résultant d'un déséquilibre important de la balance énergétique. En effet, il est souvent observé dans le développement de la pathologie un déséquilibre entre les apports, issus de l'alimentation, et les dépenses énergétiques, déterminées notamment par le niveau de sédentarité ou d'activité physique des personnes. Cette surcharge pondérale précède très fréquemment l'installation d'un syndrome métabolique (SMet), qui désigne une constellation de troubles biologiques et cliniques. Ces derniers (intolérance au glucose, dyslipidémie, hypertension artérielle), sont tous responsables de l'installation de pathologies cardiovasculaires (Fornoni et al., 2005), première cause de mortalité dans le monde. Il apparaît ainsi nécessaire d'améliorer la compréhension des mécanismes impliqués dans l'installation des dysfonctions cardiovasculaires chez ce type de population afin de pouvoir proposer des stratégies thérapeutiques efficaces.

Ces dysfonctions peuvent être induites par des troubles métaboliques aigus ou chroniques, et peuvent avoir comme conséquence des désordres de l'homéostasie et de l'hémodynamique sanguine jouant notamment sur l'intégrité fonctionnelle de l'endothélium, une des pierres angulaires du système cardiovasculaire. Cette monocouche de cellules qui tapisse l'intérieur des vaisseaux, joue un rôle primordial dans le maintien de l'homéostasie vasculaire. Sa proximité avec le tissu sanguin lui permet de réagir localement et rapidement à différents stimuli physiques ou chimiques, en partie grâce à la libération d'agents vasoconstricteurs et vasodilatateurs, dont le monoxyde d'azote (NO). Celui-ci, produit par la protéine eNOS (*endothelial nitric oxide synthase*) au sein des cellules endothéliales, est majoritairement responsable de la relaxation endothélium-dépendante des vaisseaux (Forstermann et al., 2006).

L'alimentation dite « western diet » comprend une part excessive de sucres simples. La principale source de ces sucres ajoutés est la consommation de boissons sucrées, type sodas, qui a fortement augmenté à partir des années 1970, notamment chez les jeunes adultes. Plusieurs études ont démontré l'implication de cette consommation dans l'augmentation de la prévalence de l'obésité et du diabète de type 2 (Fagherazzi et al., 2013 ; Malik et al., 2010). Dans ce contexte, des altérations de la réponse endothéliale lors d'une hyperglycémie aiguë ont été démontrées chez des patients atteints de pathologies métaboliques (Mah et al., 2012). Plus récemment, des travaux de notre laboratoire ont rapporté dans une méta-analyse, que même des sujets jeunes et en bonne santé, présentent une réponse vasculaire diminuée lors d'un stress hyperglycémique aigu (Loader et al., 2016). Bien que le stress oxydant et la voie métabolique du NO semblent être déterminants dans ces altérations vasculaires transitoires (Ceriello et al., 2002), très peu d'informations sur les mécanismes impliqués sont disponibles à ce jour.

Ainsi, au cours d'une première étude translationnelle, nous nous sommes intéressés à l'impact de la prise d'une boisson riche en sucres (glucose et fructose) sur la régulation de la fonction vasculaire et endothéliale. Pour cela, une approche clinique nous permettra d'appréhender les effets d'une prise de boisson sucrée sur la fonction vasculaire macro- et microcirculatoire. Puis, afin de tenter de comprendre le lien entre l'hyperglycémie aiguë et la dysfonction vasculaire, une approche expérimentale chez le rat nous autorisera l'exploration des mécanismes sous-jacents impliqués, notamment par l'étude du couple stress oxydant-voie du NO.

La récurrence du déséquilibre énergétique associée à une prise importante de lipides et de sucres simples, participent à l'installation de l'obésité et en conséquence du SMet. L'augmentation marquée du risque cardiovasculaire chez les sujets souffrant de désordres métaboliques semble être principalement expliquée par le développement d'une hypertension artérielle (Stas et al., 2004). En effet, l'obésité viscérale et l'hyperinsulinémie sont à l'origine d'une augmentation de l'activité du système nerveux sympathique (SNS) (Lambert et al., 2010), qui participe au développement d'une hypertension artérielle. Dès lors, il semble aujourd'hui essentiel de pouvoir prévenir cette augmentation pathologique de la pression artérielle chez des sujets développant une obésité abdominale associée à des désordres métaboliques. De plus, les désordres vasculaires observés dans ce type de pathologie semblent eux aussi, via une altération de la régulation du tonus vasculaire, contribuer au développement

d'une hypertension artérielle (Boulbou et al., 2005 ; Sowers et al., 2002). Il est néanmoins intéressant de noter que certains sujets atteints d'obésité ou de SMet, ne présentent pas d'hypertension artérielle malgré une activité élevée du SNS (Hugget et al., 2004 ; Agapitov et al., 2008). Ce découplage entre l'hyperactivité sympathique et l'élévation de la pression, semblerait pouvoir être expliqué par une hyporéactivité artérielle au stress adrénérgique (Jerez et al., 2012).

Dans une seconde étude, nous tenterons donc d'évaluer, à partir d'un modèle de rat nourrit avec un régime riche en lipides et en sucres (rats HFS), le potentiel couplage entre la régulation de la pression artérielle par le SNS et le rôle potentiellement hypotenseur de l'endothélium et de la voie du NO.

Parmi les différents facteurs du risque cardiovasculaire, l'hyperglycémie et l'hypertension peuvent, l'un comme l'autre, jouer des rôles non négligeables comme nous venons de le voir. Cependant, un autre élément clé du développement de la pathologie cardiométabolique est l'accumulation de tissu adipeux. En effet, celui-ci, via son expansion, est à l'origine d'une inflammation systémique qui contribue fortement à l'installation de pathologies cardiovasculaires (Berg et al., 2005 ; Hajer et al., 2008). Depuis peu, la communauté scientifique s'est intéressée à un tissu adipeux particulier qui semble pouvoir jouer un rôle important dans la régulation de l'homéostasie vasculaire : le tissu adipeux périvasculaire (PVAT : *perivascular adipose tissue*). De par sa proximité avec les vaisseaux, il existe une bio-communication facilitée entre ces deux tissus (Szasz et al., 2013), notamment via la sécrétion de nombreux agents potentiellement vasoactifs (adipokines, cytokines, hormones,...) pouvant agir de manière endocrine et/ou paracrine sur les cellules du tissu artériel. Le phénotype de ce PVAT est particulier, en effet selon sa localisation au niveau de l'arbre vasculaire, il peut s'apparenter à un tissu adipeux (TA) brun ou blanc, et s'intègre plus ou moins avec le tissu vasculaire sous-jacent. Par ailleurs, les désordres métaboliques, généralement associées à des modifications phénotypiques du tissu adipeux viscéral, semblent aussi pouvoir impacter le PVAT et ainsi modifier son phénotype sécrétoire vers un profil pro-inflammatoire et pro-oxydant (Chatterjee et al., 2009 ; Brown et al., 2014). Ce mécanisme, peu décrit à ce jour, pourrait jouer un rôle non négligeable dans l'installation des dysfonctions vasculaires.

Dans ce contexte, la troisième étude de ce travail de doctorat aura notamment comme objectif, à partir du même modèle de rat que celui décrit ci-dessus, d'évaluer les interactions potentielles entre la fonction vasculaire et le PVAT.

A ce jour, peu d'approches thérapeutiques se sont vraiment montrées efficaces afin de limiter les effets délétères des pathologies cardiométaboliques. La pratique régulière d'un exercice physique est néanmoins apparue comme une stratégie non pharmacologique, aux effets pleiotropes permettant à la fois d'impacter les désordres métaboliques et cardiovasculaires. En effet, l'exercice physique permet d'améliorer la relaxation vasculaire endothélium-dépendante, via notamment une potentialisation de la voie métabolique du NO (Boo et al., 2001 ; Maiorana et al., 2003), mais aussi, via ses effets sur le potentiel antioxydant cellulaire. Ces mécanismes participent à maintenir la bio-disponibilité du NO en prévenant sa réaction avec des espèces réactives oxygénées (EOR) (Ristow et al., 2009 ; Teixeira-Lemos et al., 2011). .

Ainsi, dans le cadre de l'étude n°1 s'intéressant aux effets d'un stress hyperglycémique aigu sur la fonction vasculaire, les effets potentiellement protecteurs ou pré-conditionnants de l'exercice physique seront évalués afin de prévenir les effets potentiellement délétères de la consommation d'une boisson très riche en sucre.

L'exercice physique est aussi reconnu pour ses effets sur l'accumulation du tissu adipeux. En effet, le stress métabolique qu'il génère permet notamment, de diminuer l'accumulation de masse grasse et d'améliorer le métabolisme lipidique (Thompson et al., 2012). Parmi les différents tissus adipeux qui peuvent être impactés par l'obésité, le PVAT semble pouvoir jouer un rôle non négligeable dans le développement d'une dysfonction cardiovasculaire (Antonopoulos et al., 2015 ; Xia et al., 2016). Néanmoins, à notre connaissance, une seule étude s'est intéressée aux effets de l'exercice sur le remodelage du PVAT. Il semblerait que l'exercice potentialise la « brunisation » du PVAT sans pouvoir impacter la fonction vasculaire (Araujo et al., 2015). Néanmoins, l'impact de l'exercice sur le remodelage phénotypique du PVAT d'animaux souffrant de désordres métaboliques n'a, à ce jour, jamais été abordé.

Au cours de notre troisième étude, nous nous sommes intéressés aux effets de l'exercice physique sur la modulation de la bio-communication entre le tissu vasculaire et le PVAT chez un modèle de rat HFS. Une attention particulière sera portée à l'impact du stress oxydant de la voie adiponectine/eNOS.

L'objectif global de ce travail de thèse était de tenter d'améliorer la compréhension de l'impact de différents paramètres de la pathologie cardiométabolique (hyperglycémie, hyperactivité du SNS, obésité) sur la fonction vasculaire. Une attention toute particulière a été portée sur l'impact de l'exercice physique sur la fonction vasculaire, et au rôle de la balance sensible entre la voie eNOS/NO et le stress oxydant.

REVUE DE LITTÉRATURE

PARTIE 1 : PHYSIOLOGIE VASCULAIRE

1. ANATOMIE DU SYSTEME VASCULAIRE.

Le système cardiovasculaire est composé du cœur et des vaisseaux, comprenant les artères et les veines. Son rôle est essentiel au sein de l'organisme puisqu'il permet, via le sang, l'apport de nutriments et d'oxygène aux différents tissus et organes. Il récupère ensuite les déchets métaboliques afin de les recycler ou de les évacuer. Il existe différents types de vaisseaux, dont la diversité de taille est en relation avec la fonction qu'ils exercent dans la vascularisation (**Figure 1**).

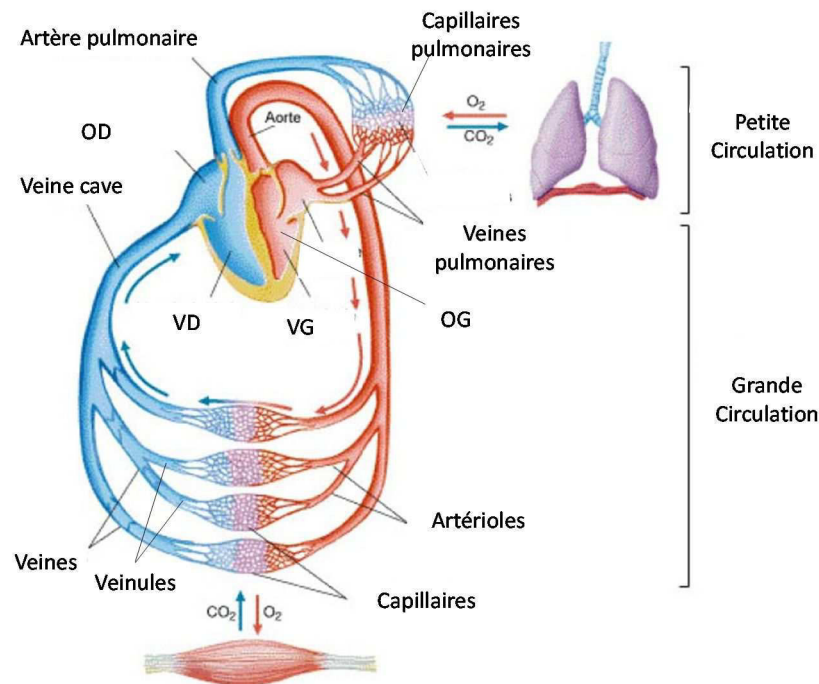


Figure 1 : Organisation du système cardiovasculaire.

Les gros vaisseaux, tels que l'aorte et ses principales ramifications, sont des artères élastiques, aussi nommées **artères de conduit** (diamètre : 1 à 2,5 cm). Elles permettent de transformer le débit sanguin cardiaque pulsé, en un débit sanguin vasculaire continu. Elles sont constituées principalement de cellules musculaires lisses (CML), de fibres de collagène et d'élastine. La composition riche en fibre d'élastine (25%) permet à ces artères de supporter de grandes fluctuations de pression, et de réguler le flux sanguin. Pour cela, les CML et les

fibres d'élastine forment une unité fonctionnelle et structurale, le feuillet musculo-élastique, qui permet une distribution uniforme des contraintes mécaniques au sein des vaisseaux. Elles ont aussi une capacité de mise en réserve de sang pendant la systole, qui sera écoulee en diastole. Composant un tiers de la média aortique, le collagène, est disposé en réseau ce qui lui confère une grande flexibilité, permettant ainsi, un rôle majeur dans le maintien de l'intégrité vasculaire, et de la résistance aux forces de traction.

Ces grosses artères donnent en se ramifiant, les **artères de résistance** aussi appelées artères distributrices, comprenant les artères musculaires (diamètre : 0,3 mm à 1 cm) et les artérioles (diamètre : 10µm à 0,3 mm). Contrairement aux artères conductrices, elles sont principalement composées de CML et de collagène, et de peu de fibre d'élastine, ce qui leur confère une meilleure capacité de contraction et une plus grande rigidité. Les artérioles sont ainsi les plus petites artères de la circulation, et permettent de réguler le débit sanguin capillaire en fonction des besoins des tissus irrigués.

Parmi les vaisseaux sanguins, seuls les **capillaires** sont en contact étroit avec les cellules. Leurs parois extrêmement fines permettent les échanges entre le sang et le liquide interstitiel, dans lequel baignent les cellules. Ces échanges fournissent aux cellules les nutriments et l'O₂ utiles à leur bon fonctionnement, et récupèrent les déchets issus de leurs activités métaboliques.

Enfin, le système veineux permet le retour du sang vers le cœur, après que celui-ci ait échangé avec l'ensemble des organes et tissus de l'organisme.

Ainsi, à la sortie des capillaires, on retrouve les veinules, dont le diamètre varie entre 8 et 100µm. Les plus petites, appelées veinules post-capillaires, ne sont constituées que d'une couche endothéliale poreuse qui les fait ressembler davantage à des capillaires plutôt qu'à des veines. Ensuite le long du trajet vasculaire, le diamètre des veines augmente tandis que leurs parois s'épaississent graduellement. Les veines sont formées comme les artères de trois tuniques distinctes (**Figure 2**), mais contrairement aux artères riches en fibres musculaires, les veines sont principalement constituées de fibres de collagènes, organisées en faisceaux longitudinaux importants, associées à un réseau élastique. Les parois veineuses sont donc plus minces que celles des artères correspondantes, et la lumière est plus importante (jusqu'à 3 cm de diamètre dans les plus grosses veines), conférant une faible résistance à la circulation sanguine. Les veines forment un réservoir de sang, elles stockent en permanence 65% du volume sanguin total.

Ces caractéristiques veineuses sont des adaptations structurales permettant le bon retour du sang au cœur, au même rythme que celui-ci a été propulsé dans les artères. Au niveau des membres, où la force gravitationnelle est plus importante, les veines sont dotées de valvules, qui sont des replis de la tunique interne, dont le rôle est d'empêcher le reflux sanguin (**Figure 2**).

2. STRUCTURES VASCULAIRES.

2.1. Composantes internes.

La paroi artérielle est généralement composée de trois tuniques : l'**adventice**, couche la plus externe - la **media**, l'intermédiaire - et l'**intima**, la plus interne (**Figure 2**).

La tunique externe, ou adventice, comprend principalement des fibres de collagènes entrelacées, qui apporte une protection mécanique et un maintien physique du vaisseau. Elle forme une enveloppe conjonctive parcourue de neurofibres et contenant des vaisseaux lymphatiques.

La tunique moyenne, ou media, est constituée principalement de fibres musculaires lisses disposées en anneaux, et de feuillets d'élastine continus. Les myocytes lisses possèdent des récepteurs chimiques qui lui permettent de réagir aux stimulations de l'endothélium et sont aussi innervées par des fibres sympathiques. Ainsi les CML sont capables de répondre aux besoins de l'organisme en induisant une vasoconstriction ou une vasodilatation locale. Cette tunique est donc primordiale dans la régulation du flux sanguin et de la pression artérielle.

La tunique interne, ou intima, est composée d'une limitante élastique interne, faite de tissu conjonctif fibro-élastique et d'un endothélium simple et squameux, qui tapisse la lumière de tous les vaisseaux. Ces cellules dérivant du mésoblaste embryonnaire, sont plates et polarisées. La face basale des cellules endothéliales repose sur une lame basale, composée principalement de collagène qui lui confère une résistance mécanique. Cette fine couche protectrice sépare l'endothélium des CML sous-jacentes, tout en restant perméable aux différentes molécules en transition entre les deux tissus artériels. Tandis que la face apicale est en contact direct avec le sang et les métabolites qui y circulent. Des protéines d'ancrage telles que des desmosomes, permettent de relier les cellules entre elles et de créer une barrière

imperméable aux grosses molécules, mais perméables aux substances dissoutes de petites tailles. La position stratégique de cet endothélium lui permet de capter les différents signaux chimiques et physiques contenus dans le sang, et d'y répondre afin de maintenir une homéostasie vasculaire. L'endothélium est au centre de la vasomotricité circulatoire, c'est lui qui répond aux besoins des tissus, en régulant le flux sanguin et la priorité de perfusion.

Dans le cadre de ce travail, nous nous intéresserons uniquement à la fonction artérielle, siège de régulation de la pression sanguine et des débits sanguins.

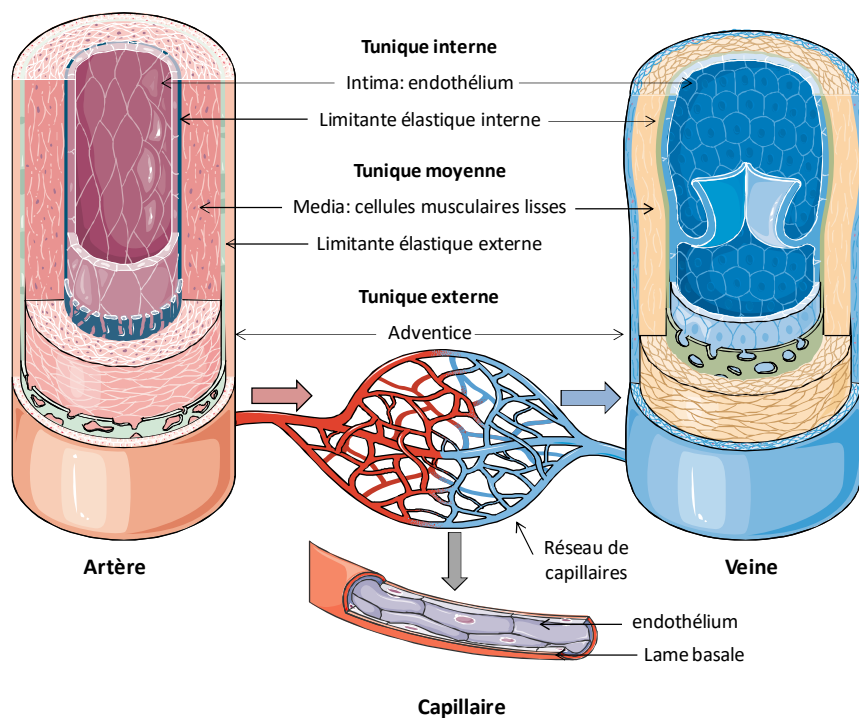


Figure 2: Composantes vasculaires internes

2.2. Composante externe : le tissu adipeux périvasculaire.

L'arbre vasculaire est constitué de différents types de vaisseaux permettant une adaptation spécifique des besoins hémodynamiques et métaboliques des différents territoires irrigués. On retrouve ainsi des disparités structurelles et histologiques à l'origine de différence de capacitance et de résistance, mais également de distribution et d'échange. On retrouve également une grande diversité d'agents vasoactifs produits par l'endothélium, dont la production varie en fonction des territoires vasculaires. Tous ces éléments sont bien décrits et

démontrent l'hétérogénéité de la régulation vasculaire. Cependant un nouvel acteur apparaît au sein de cette régulation: le PVAT (**Figure 3**).

Celui-ci est composé, comme tout tissu adipeux, d'adipocytes, de cellules stromales, de macrophages et de lymphocytes T. Pourtant il définit à lui seul, un type particulier de tissu adipeux. On le retrouve autour de tous les vaisseaux de l'organisme, à l'exception de la circulation cérébrale et des capillaires. Il y a cependant une différence d'intégration de ce PVAT en fonction de l'anatomie vasculaire (Brown et al., 2014 ; Fitzgibbons et al., 2014). En effet, au niveau des gros vaisseaux, le PVAT est séparé du tissu artériel par une barrière anatomique riche en collagène, élastine, et en fibroblaste. Elle contient également des terminaisons nerveuses qui supposent une régulation sympathique et/ou parasympathique, mais aussi des microvaisseaux qui viennent nourrir ce tissu adipeux, que l'on appelle le *vasa vasorum* (Ahmed et al., 2004). Ce dernier permet le passage des molécules sécrétées par le PVAT, jusqu'au tissu artériel (Dreifaldt et al., 2013). A l'inverse, le PVAT des petits vaisseaux et des microvaisseaux communiquent par diffusion, puisque les adipocytes font partie intégrante de la paroi vasculaire et constituent l'adventice (Chatterjee et al., 2009).

Jusqu'à ce que Soltis et al. découvrent en 1991, la capacité d'action du PVAT sur la contraction aortique, les biologistes pensaient que ce tissu n'avait qu'une fonction de protection mécanique autour des vaisseaux, limitant l'altération de ces derniers par les tissus à proximité (Soltis et Cassis, 1991). De ce fait, dans toutes les études expérimentales s'intéressant aux voies signalétiques de la vasomotricité, les artères étudiées étaient tout d'abord « nettoyées » de la couche de tissu adipeux superficielle. On pensait également que ce PVAT pouvait gêner la diffusion des agents pharmacologiques, utilisés expérimentalement, vers l'endothélium ou les CML. Mais l'avancée des connaissances sur les capacités sécrétrices du tissu adipeux, capable d'interagir avec différents tissus de l'organisme, confère au PVAT un intérêt particulier. Sa proximité avec la vascularisation, et sa capacité comme tout tissu adipeux à produire des molécules capables d'agir de manière endo- ou paracrine, font de ce tissu, un nouvel acteur participant à l'homéostasie vasculaire et à la régulation de la vasomotricité (cf. *Biocommunication entre le tissu artériel et le PVAT*, p 27).

Au cours de ce travail, le rôle de ce tissu sera particulièrement étudié, notamment son implication dans le processus de mise en place de la dysfonction vasculaire dans des situations de désordres cardiométaboliques (ETUDE N°3).

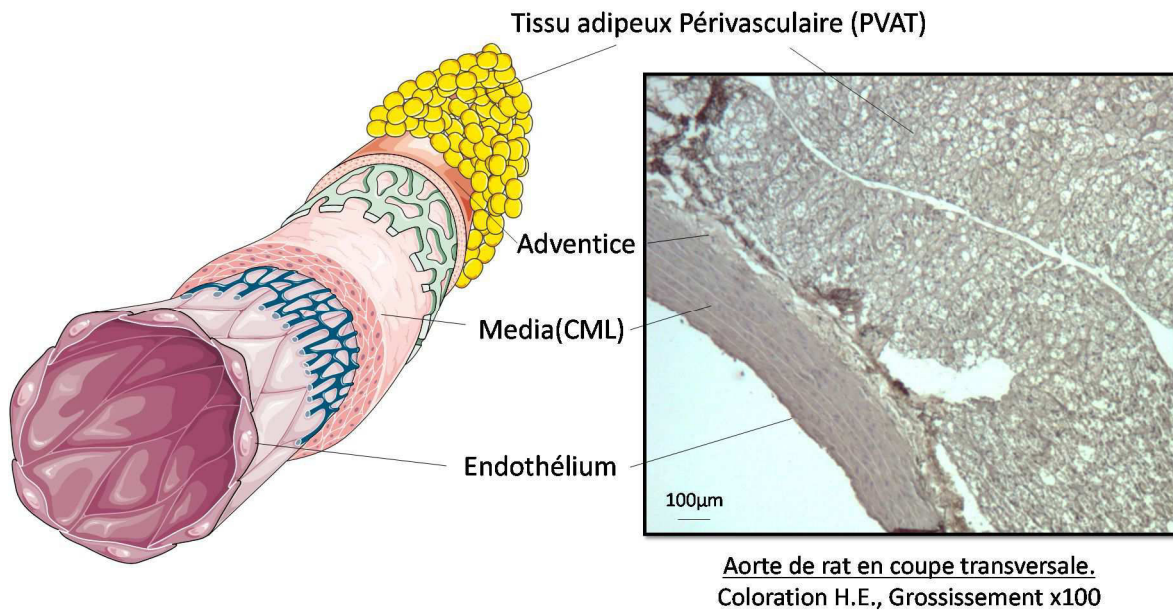


Figure 3 : Organisation des différentes composantes de l'artère.

3. LA VASOMOTRICITE ARTERIELLE.

Deux fonctions essentielles caractérisent le système artériel. La première est l'apport des nutriments et du dioxygène aux différents organes et tissus de l'organisme via le transport du sang. La seconde est le maintien de la pression artérielle (PA), tributaire du débit cardiaque (Q_c) et des résistances périphériques vasculaires (RPV) : $PA = Q_c \times RPV$. Les résistances périphériques vasculaires, quant à elles, sont principalement dépendantes du calibre artériel. En effet : $RPV = \frac{8\eta l}{\pi r^4}$ (η : viscosité du sang, l : longueur du vaisseau, r : rayon du vaisseau). Ainsi les fonctions artérielles sont dépendantes de la régulation du diamètre des vaisseaux.

La vasomotricité artérielle correspond à la capacité des vaisseaux à se contracter ou à se relâcher, induisant ainsi une modification de la vitesse et du volume du flux sanguin. Ces capacités d'adaptations vasculaires permettent de réguler le débit sanguin en fonction des besoins des différents territoires irrigués, selon des conditions de repos ou de stress physiologique ou pathologique. Cette capacité vasomotrice est assurée par les CML vasculaires.



3.1. Mécanisme de contraction/relaxation du muscle lisse vasculaire.

Les cellules musculaires lisses vasculaires sont des cellules mononucléées et fusiformes. Elles s'assemblent en couche de cellules, séparées entre elles par un tissu conjonctif lâche, l'endomysium, produit directement par les CML, perméables aux fibres nerveuses et aux vaisseaux. Bien qu'il n'y ait pas d'organisation sarcomérique comme dans les cellules musculaires striées, les CML contiennent elles aussi des filaments d'actine et de myosine, responsables de la contraction vasculaire. Ces filaments d'actine/myosine s'entrecroisent sur l'axe longitudinal des cellules, de manière hélicoïdale, ce qui permet une contraction en « tire-bouchon » (**Figure 4A**). Les filaments d'actine sont fixés à des corps denses, répartis sur l'ensemble de la cellule, notamment au niveau du sarcolemme. Ils forment avec des filaments intermédiaires, un cytosquelette intracellulaire résistant, qui dirige la traction exercée par le glissement des filaments d'actine et de myosine. Le synchronisme de contraction au niveau des CML est lié en partie à l'encrage des corps denses au niveau de l'endomysium et des cellules adjacentes, qui favorise la transmission de la force de contraction. Il est également lié aux jonctions ouvertes qui permettent la propagation de potentiels électriques d'une cellule à l'autre.

Contrairement aux cellules musculaires striées, les CML ne possèdent pas de tubules transverses au niveau de leur sarcolemme, cependant elles possèdent des « caveolae ». Celles-ci sont des invaginations du sarcolemme, qui renferment une forte concentration de calcium extracellulaire. De ce fait, l'ouverture des canaux calciques liée à une dépolarisation du sarcolemme au niveau de ces « caveolae », induit une forte augmentation du calcium intracellulaire, responsable majoritairement de la contraction des CML. Le relargage de calcium par le réticulum sarcoplasmique contribue également à l'augmentation de calcium intracellulaire. Cette forte affluence de calcium active les molécules de calmoduline (CaM) en formant un complexe $\text{CaM}/\text{Ca}^{2+}$. Ce complexe active à son tour une kinase, la MLCK (myosine light chain kinase), capable d'activer les ATPases présentes sur les chaînes légères de myosine. Cette activation entraîne un changement de conformation de la chaîne légère de myosine, avec un pivotement de la tête, responsable du glissement de la myosine sur le filament d'actine, et donc du raccourcissement de la cellule. La contraction des CML est lente et peu coûteuse en énergie en comparaison à celle des muscles striés, ce qui est nécessaire au maintien du tonus vasculaire.

La relaxation des CML, dépend de la diminution de la concentration intracellulaire de calcium, par transport actif des ions Ca^{2+} dans le réticulum sarcoplasmique et le liquide extracellulaire. Cependant, afin que toute activité contractile cesse, il est nécessaire de réduire l'activité ATPase de la myosine. Pour cela, il existe un mécanisme réversible permettant de déphosphoryler les chaînes légères de myosines (MLC₂₀), grâce à l'action d'une phosphatase spécifique (MLC-phosphatase), régulée par une protéine kinase A et G (**Figure 4B**).

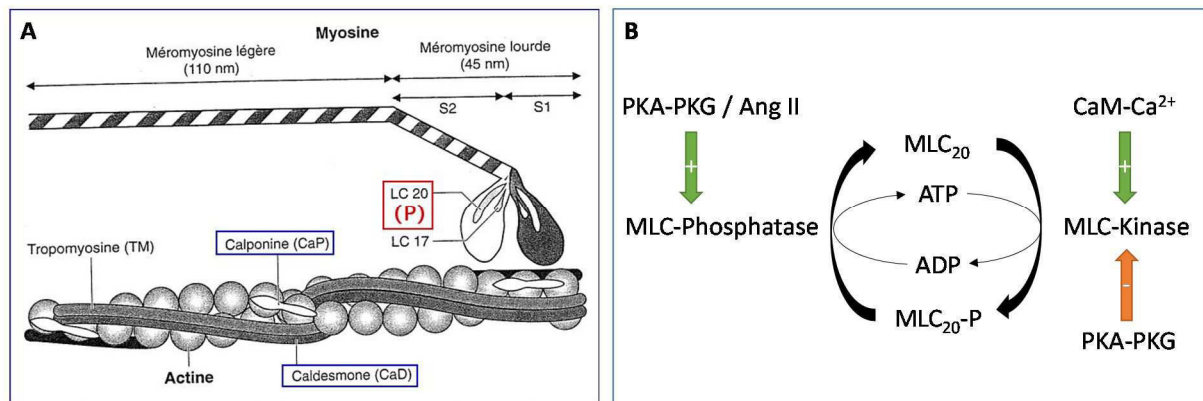


Figure 4 : Mécanisme moléculaire de contraction/relaxation des CML vasculaires.

A : Filaments d'actine et de myosine avec leurs différents composants. **B** : Mécanisme d'activation réversible de la chaîne légère de myosine (MLC₂₀). MLC : chaîne lourde de myosine ; CaM : calmoduline ; PKA : protéine kinase A ; PKG : protéine kinase G ; ATP : adénosine tri-phosphate ; ADP : adénosine di-phosphate.

3.2. Régulation du tonus vasculaire

Comme nous l'avons vu, le tonus vasculaire est assuré par la capacité contractile des vaisseaux, principalement par les artérioles. Cependant, afin de répondre au mieux aux besoins de l'organisme, ce tonus est finement régulé de manière systémique, par des mécanismes nerveux comprenant le centre vasomoteur, des neurofibres vasomotrices et des récepteurs sensibles aux variations de PA et d'oxygénation du sang. Il est également régulé localement par des mécanismes chimiques, correspondants aux hormones rénales et aux facteurs vasomoteurs produits par l'endothélium (**Figure 5**).

3.2.1. Mécanismes nerveux

Les mécanismes nerveux, responsables de la régulation du tonus vasculaire, sont un ensemble d'acteurs fonctionnant en synergie : le centre vasomoteur, les neurofibres vasomotrices, les baro- et chimiorécepteurs, les centres cérébraux supérieurs.

- **Le centre vasomoteur :**

Le centre vasomoteur est constitué d'un amas de neurones sympathiques situé dans le bulbe rachidien. Il innerve directement les CML, particulièrement au niveau des artérioles, grâce à des neurofibres vasomotrices. Les artérioles présentent continuellement un niveau de contraction, définissant ainsi le tonus vasomoteur. Les neurofibres libèrent principalement de la noradrénaline, un neurotransmetteur capable d'induire une constriction des vaisseaux innervés. Ainsi, une augmentation de l'activité du système nerveux sympathique (SNS), entraîne une vasoconstriction générale des artérioles conduisant à une augmentation de la PA. Et à l'inverse, une baisse de l'activité du SNS induit un relâchement des CML, responsable d'une diminution de la PA.

- **Les baro- et chimiorécepteurs :**

L'activité de ce centre vasomoteur dépend notamment de la sensibilité des **barorécepteurs** et des chimiorécepteurs. Ceux-ci sont situés au niveau des sinus carotidiens, aortiques et au sein de la paroi de presque toutes les grosses artères du cou et du thorax. Ces différentes régions sont constituées d'une part importante de fibres élastiques, leur conférant une grande extensibilité. Ainsi, une augmentation de la PA entraîne un étirement des barorécepteurs, responsables d'une inhibition du centre vasomoteur, ce qui a pour conséquence d'induire un relâchement des artérioles principalement, et donc une diminution de la PA.

Les **chimiorécepteurs** sont quant à eux sensibles à une éventuelle hypoxémie, une diminution de pH sanguin, ou bien encore une trop forte concentration de dioxyde de carbone. A l'inverse des précédents, les chimiorécepteurs déclenchent une vasoconstriction générale via l'activation du centre vasomoteur, et donc une augmentation de la PA. Ceci permet un meilleur retour veineux au cœur et aux poumons, ce qui facilite l'oxygénation du sang.

- **Les centres cérébraux spinaux supérieurs :**

Les centres cérébro-spinaux supérieurs peuvent également intervenir dans la régulation du tonus vasculaire. En effet, l'hypothalamus peut stimuler l'activité du centre bulbaire rachidien dans des conditions de stress psychologique, ou environnemental (exercice physique ou changement de température).

- **Neurofibres vasomotrices et récepteurs adrénargiques :**

Les CML sont innervées par des neurofibres autonomes, formées de varicosités axonales qui permettent de libérer les neurotransmetteurs dans une large fente synaptique. Les récepteurs de ces neurotransmetteurs sont dispersés au niveau du sarcolemme. On parle de jonctions diffuses. Ainsi, la réponse contractile/relaxante des CML à une stimulation autonome dépend de la proportion de récepteurs à agonistes adrénargiques. Les récepteurs alpha adrénargiques favorisent la contraction des vaisseaux, tandis que les récepteurs bêta-adrénargiques favorisent leur relaxation. Cette distribution permet d'irriguer tel ou tel territoire en fonction des besoins de l'organisme. Par exemple, au niveau des artères qui irriguent les muscles squelettiques, on observe une forte concentration de récepteurs bêta-adrénargiques, alors qu'au niveau splanchnique et rénal, on rencontre une plus large proportion de récepteurs alpha-adrénargiques. Ainsi, lors d'un stress physiologique causé par un exercice physique, le SNS est activé, les territoires actifs comme les muscles sont davantage irrigués, alors que les territoires inactifs associés à la digestion ou autres fonctions végétatives le sont moins. Cette régulation autonome favorise donc une redistribution des apports sanguins au niveau de l'organisme, en fonction des besoins des différents territoires irrigués.

3.2.2. Mécanismes chimiques :

En plus des mécanismes d'origine nerveuse, il existe différentes substances chimiques véhiculées par le sang, capable d'influencer le tonus vasculaire en stimulant le centre vasomoteur, les mécanismes rénaux ou bien directement les CML.

- **Les hormones de la médulla surrénale :**

La glande surrénale sécrète en condition de stress physique ou émotionnel, de l'**adrénaline** et de la **noradrénaline** dans le sang. Ces hormones comme nous l'avons vu

précédemment, entraînent une vasoconstriction généralisée, excepté au niveau du cœur et des muscles squelettiques, favorisant l'état de fuite.

- **L'angiotensine II:**

L'angiotensine II (Ang II) est un puissant agent vasoconstricteur, dérivé de l'angiotensinogène produit par le foie. Ainsi, lorsque la PA diminue, la perfusion rénale s'en ressent et déclenche la production de la rénine, qui est impliquée dans la transformation de l'angiotensinogène en Ang II. Cette hormone hypertensive stimule la constriction des vaisseaux, mais également l'activité du SNS, ainsi que la sécrétion d'aldostérone et d'ADH (Hormone Anti-diurétique). Ces deux dernières hormones rénales favorisent la réabsorption de sodium au niveau des tubules rénaux, permettant ainsi d'augmenter le volume sanguin et donc la PA.

- **Les facteurs endothéliaux :**

La fonction principale de l'endothélium est de maintenir l'homéostasie vasculaire, en régulant notamment le tonus vasculaire. Il va ainsi produire et sécréter différents agents vasoactifs, capables d'agir au niveau des CML, en se fixant sur des récepteurs membranaires ou bien en diffusant directement à travers la bi-couche phospholipidique. Afin d'assurer le maintien du tonus vasculaire, l'endothélium assure un équilibre de production entre des agents vasoconstricteurs tels que l'endothéline-1 ou le thromboxane A₂, dérivé des prostanoides, et des agents vasodilatateurs tels que les prostaglandines, ou des facteurs hyperpolarisants, regroupés sous le terme d'EDHF (*endothelial-derived hyperpolarizing factors*), ainsi que du monoxyde d'azote (NO). Ce dernier est majoritairement responsable des capacités vasodilatatrices de l'endothélium, mais également fortement impliqué au sein des régulations nitro-oxidatives notamment en condition pathologique.

Ainsi, comme nous avons pu le voir de manière non-exhaustive, le tonus vasculaire est régulé par de nombreux mécanismes. Cependant, la plupart d'entre eux ont des répercussions systémiques, alors que les facteurs endothéliaux agissent localement, assurant ainsi une réaction directe et rapide sur des éléments perturbateurs de l'homéostasie vasculaire.

Pour ces raisons, le rôle clé de la fonction endothéliale, et plus précisément à la voie du NO, dans la régulation de la fonction vasculaire a été au centre de ce travail de doctorat.

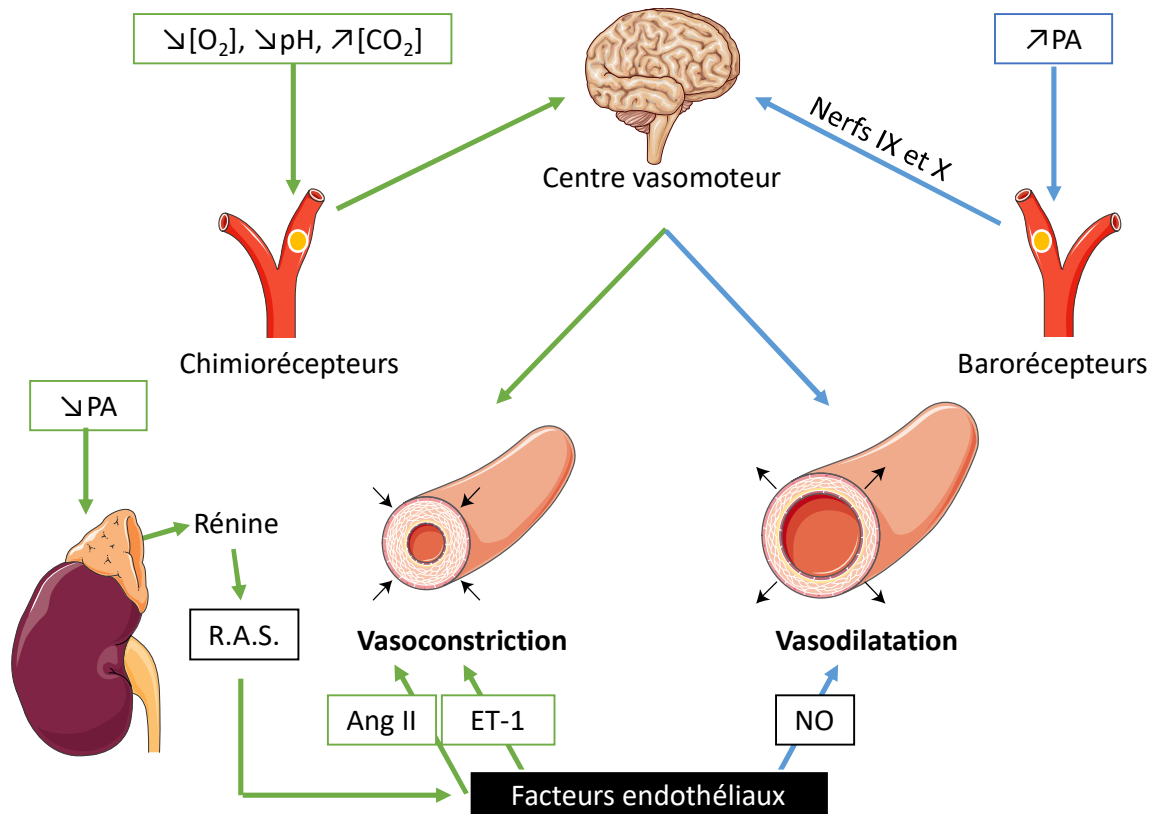


Figure 5 : Mécanismes de régulation du tonus vasculaire

PA : Pression artérielle ; R.A.S. : Système rénine-angiotensine ; Ang II : angiotensine II ; ET-1 : endothéline-1 ; NO : monoxyde d'azote

3.3. Le NO.

Furchtgott et Zawazki découvrent en 1980 une molécule produite et libérée par l'endothélium, l'EDRF (*endothelium-derived relaxing factor*) capable d'induire un relâchement des CML, et ainsi faciliter l'augmentation du flux sanguin en augmentant le diamètre des vaisseaux sanguins. Quelques années plus tard, Ignarro affirme qu'il s'agit en réalité du NO, et qu'il joue un rôle primordial dans la régulation du tonus et de l'homéostasie vasculaire (Ignarro et al., 1987).

Il existe trois isoformes de NO-synthase (NOS) : la NOS neuronale (nNOS ou NOS I), la NOS inductible (iNOS ou NOS II) et la NOS endothéliale (eNOS, ou NOS III). Leur noms font référence aux tissus dans lesquels elles ont été découvertes, cependant leur localisation ne s'arrête pas à ces dénominations.

La **nNOS** est exprimée notamment au sein des fibres nerveuses périvasculaires, mais également au niveau de la paroi artérielle (Schwartz et al., 1999 ; Melikian et al., 2009). Cette

enzyme joue un rôle important dans la régulation du tonus basal (Seddon et al., 2008), mais n'est cependant pas sensible à l'acétylcholine (ACh) ni au shear stress (Seddon et al., 2008 et 2009). La nNOS induit également une vasodilatation liée au stress mental (Seddon et al., 2008) et à l'augmentation de la température cutanée globale (Seddon et al., 2009).

La iNOS n'est pas exprimée en condition physiologique. Cependant, on la retrouve dans les vaisseaux en présence d'une forte inflammation, d'une infection du sang, ou encore en condition de stress oxydant (Pautz et al., 2010). Contrairement à la nNOS et à la eNOS, celle-ci produit du NO indépendamment de la concentration calcique cytosolique, et sa production est continue sur de longues périodes, ce qui engendre des concentrations en NO cent fois plus importante qu'avec les autres isoformes de NOS (10nM pour la eNOS et nNOS, 1µM pour la iNOS). Ce phénomène entraîne des troubles endothéliaux en altérant à la fois les voies de vasoconstriction et de vasodilatation (Li et al., 2014).

Au cours de notre exposé, nous nous intéresserons davantage à la eNOS, qui est prépondérante au niveau du système cardiovasculaire, et particulièrement sensible aux stress physiologiques et pathologiques.

3.3.1. L'enzyme monoxyde d'azote synthase endothéliale (eNOS).

La eNOS est une protéine homodimérique, dont chaque dimère est formé d'un domaine C-terminal réducteur, contenant des sites de liaisons pour FMN, FAD, NADPH et la calmoduline, et d'un domaine N-terminal oxydant, contenant des sites de liaisons pour un hème, la L-arginine, et un co-facteur essentiel, le tétrahydrobiopterine (BH₄). La formation de NO requiert un flux d'électrons, débutant au niveau des flavines du domaine réductase, et se terminant au niveau de l'hème, présent sur le domaine oxygénase de l'enzyme. L'hème oxydé est alors capable de fixer le dioxygène et la L-arginine afin de synthétiser du NO et de la L-citrulline (**Figure 6A**) (Alderton et al., 2001).

La présence du BH₄ est essentielle au couplage de la protéine et donc à la formation de NO, car il assure le couplage de la protéine sous sa forme homodimérique. Il participe également à la fixation du substrat, la L-Arginine, ainsi qu'au transfert d'électron. En l'absence de ce co-facteur, la L-arginine ne peut se fixer sur son site au niveau de la protéine, et l'accepteur terminal d'électron devient le dioxygène, formant ainsi un anion superoxide (**Figure 6B**). Il en résulte une diminution de la biodisponibilité en NO, et une augmentation de la production de stress oxydant sous forme d'anion superoxide (O₂^{•-}) mais également de peroxynitrite (ONOO⁻), responsables de dommages cellulaires, qui seront à long terme

impliqués dans l'installation d'athérosclérose et également d'hypertension artérielle (Chanon et al., 2004) (cf. *Impact des EOR sur la voie eNOS/NO p 41*).

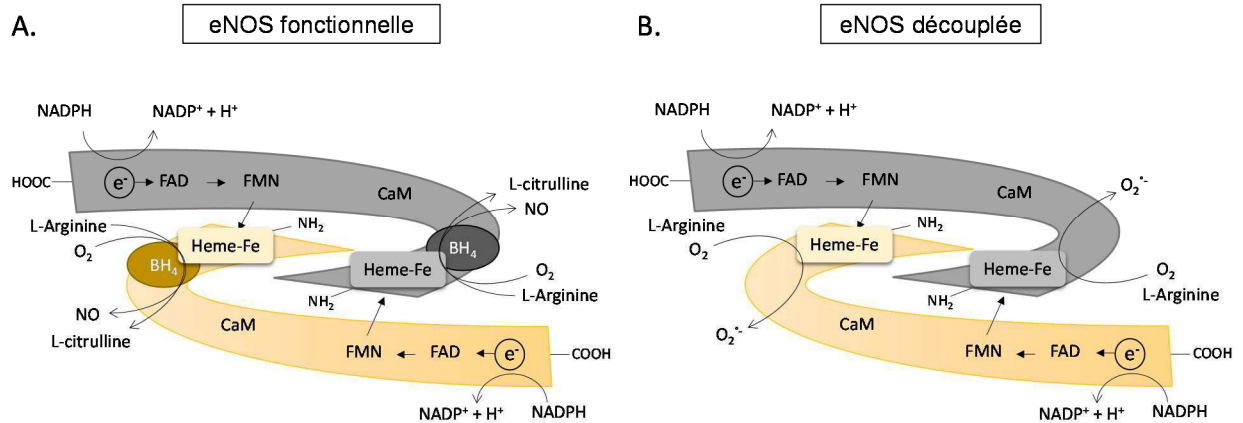


Figure 6 : Représentation schématique de la eNOS.

A. eNOS fonctionnelle, production de NO grâce au flux électronique assuré par le système de flavines et le BH₄ intimement lié à l'hème ferrique. **B.** eNOS découplée à cause de l'absence de BH₄, production d'anion superoxyde et donc source de stress oxydant. NO: monoxyde d'azote ; CaM : calmoduline ; FMN : flavine mono-nucléotide ; FAD: Flavine adenine dinucléotide.

Ainsi la eNOS est un acteur majoritairement responsable du statut oxydant des cellules et donc de la santé de l'endothélium. De ce fait, il existe un système complexe de régulation de cette protéine, impliquant différentes sous unités peptidiques activatrices ou inhibitrices, dépendant ou non de la concentration de calcium intracellulaire (**Figure 8A**).

3.3.1.1. L'activation calcium-dépendante

- **Interaction eNOS-Calmoduline/Ca²⁺ :**

Le site de fixation pour la calmoduline (CaM) a été très rapidement mis en évidence, la eNOS et la nNOS sont d'ailleurs classées comme des protéines constitutives calcium/CaM-dépendantes. En effet, suite à une augmentation de calcium intracellulaire au niveau des cellules endothéliales, on observe une forte production de NO suivie d'une vasodilatation, et ce phénomène est aboli si on supprime le calcium extracellulaire. Cette augmentation de calcium au sein de la cellule endothéliale, est causée notamment pas la fixation d'une molécule d'acétylcholine au niveau de son récepteur, placé au niveau de la membrane plasmique des cellules endothéliales. La fixation de l'ACh entraîne la formation d'une molécule d'inositol 3-phosphate (IP₃) qui provoque l'ouverture des canaux calciques, situés sur la membrane du réticulum endoplasmique. L'ouverture de ces canaux permet au stock

calcique du réticulum endoplasmique de se déverser dans le cytosol de la cellule endothéliale, augmentant ainsi considérablement la concentration calcique intracellulaire.

La fixation de la CaM sur son site, inhibe l'activité de la eNOS, ce qui suggère que la formation du complexe CaM/Ca²⁺ est essentielle à l'activation de l'enzyme. Outre son utilité dans la détermination de la sensibilité de la eNOS pour le calcium, la CaM améliore le pouvoir réducteur de l'enzyme, en contrôlant le transfert d'électrons entre le domaine réductase et l'hème, et également en favorisant le taux de réduction des flavines. Cette sous-unité protéique est elle-même régulée. Il existe une séquence peptidique auto-inhibitrice aux abords du site de fixation de la CaM sur la eNOS, qui empêche le flux électronique au niveau de l'homodimère. Cette séquence peut être inhibée par la phosphorylation de la Serine 1177, facilitant ainsi le transfert d'électrons, et augmentant de deux à trois fois la production de NO. À l'inverse, la phosphorylation de la thréonine 495 au niveau de la eNOS, inhibe la fixation de la CaM sur son site (Forstermann et al., 2012, Piazza et al., 2015).

- **Interaction eNOS-caveolae :**

Le site de fixation de la CaM est commun à celui des caveoline-1, qui ont donc un rôle antagoniste compétitif. En effet, cette eNOS a été observée dans différentes localisations cellulaires, et notamment au niveau d'invaginations de la membrane plasmique, les caveolae. La partie C-terminale des caveolines fixées sur leur site au niveau de la eNOS, permet de rattacher la protéine aux caveolae. Ces protéines ainsi fixées à la membrane, sont inactives, mais peuvent être réquisitionnées, suite à différents stimuli, notamment par la fixation d'une CaM.

3.3.1.2. L'activation calcium-indépendante

La eNOS possède de nombreux sites de phosphorylation activateurs et inhibiteurs. Elle peut également s'associer à différentes protéines telles que les protéines chaperonnes HSP90, ou ENAP-1 qui régulent son activité. Cependant, au cours de notre exposé nous nous intéresserons principalement à l'activation de la serine 1177 par un mécanisme de *shear stress* et via la voie de l'insuline. En effet, dans le cadre de l'étude de la fonction endothéliale en condition pathologique et/ou suite à un protocole d'entraînement préventif/thérapeutique, ces deux voies d'activation sont principalement impactées.

- **Le shear stress :**

La membrane plasmique des cellules endothéliales, en contact avec la lumière des vaisseaux, contient des mécanorécepteurs qui leur permettent de réagir aux contraintes de cisaillements générées par un afflux important de sang. Ce phénomène se produit notamment au cours d'un exercice physique, qui requiert un apport important d'O₂ aux muscles en activité. Ces mécanorécepteurs participent eux aussi à la régulation du tonus vasculaire, en activant la production de NO, par la phosphorylation notamment de la serine 1177 de la eNOS, via une voie PI3K/Akt. La phosphorylation de cette serine permet d'augmenter la sensibilité de la eNOS au calcium, ce qui lui permet de s'activer malgré une faible concentration de calcium intracellulaire. Outre ces effets aigus, à répétition ces contraintes de cisaillement, ou « shear stress », stimulent l'expression protéique de la eNOS (Sriram et al., 2016). Ce phénomène participe notamment à l'amélioration de la fonction vasculaire liée à la pratique régulière d'exercice physique, et ce point sera plus précisément développé dans la PARTIE 3 de notre exposé.

- **L'insuline :**

L'insuline est la seule hormone hypoglycémisante de l'organisme, elle est produite par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas. Lorsque la glycémie augmente, l'insuline stimule la translocation de transporteurs du glucose (GLUTs), au sein des cellules musculaires squelettiques, adipocytaires et hépatiques. Une fois accrochés à la membrane plasmique, ces GLUTs captent le glucose circulant et lui facilite l'entrée dans la cellule, afin de l'utiliser comme substrat énergétique, ou bien de le stocker sous forme de glycogène.

Cependant, l'insuline est également capable d'interagir avec l'endothélium pour induire une vasorelaxation, en se fixant en priorité au niveau des artérioles, permettant d'induire une augmentation du recrutement capillaire, sans modification du flux sanguin global. L'hormone agit dans un second temps au niveau d'artérioles de plus gros calibres, induisant une augmentation du flux sanguin total (Rossi et al., 2005). Le recrutement capillaire au niveau du muscle squelettique via l'action vasodilatatrice de l'insuline, favorise une plus grande captation de glucose par le tissu, grâce à l'augmentation de la surface d'échanges entre les capillaires et les cellules musculaires squelettiques (Serné et al., 2002 ; Potenza et al., 2009).



Les mécanismes d'action de l'insuline au niveau des cellules endothéliales sont assez complexes. La fixation de l'insuline sur son récepteur tyrosine kinase (RTK) permet l'activation de deux voies parallèles et contradictoires. En effet, l'activation de ce récepteur RTK stimule à la fois la phosphorylation du substrat IRS 1, responsable de l'activation de la eNOS via la voie PI3K/Akt (Kobayashi et al., 2005), et également la voie Ras/Raf/MAPK, qui active la voie de l'endothéline-1 (ET-1) (**Figure 7**). Ainsi, la régulation vasculaire par l'insuline dépend de la balance entre la voie vasodilatatrice du NO et la voie vasoconstrictrice de l'ET-1. En condition physiologique la voie du NO est prépondérante en induisant ainsi un relâchement des vaisseaux. Cependant, en condition pathologique, comme dans le cadre de l'obésité, différents facteurs pro-inflammatoires issus notamment du TA, favorisent la voie de l'ET-1. Dans ce cas, la fixation de l'insuline induit une vasoconstriction, limitant ainsi le flux sanguin et donc l'apport des nutriments et de l'insuline. Cette dérégulation semble participer à l'installation de l'insulino-résistance, mais également à l'hypertension (Woerdeman et al., 2016) (cf. *Impact de l'obésité sur la fonction endothéliale*, p50).

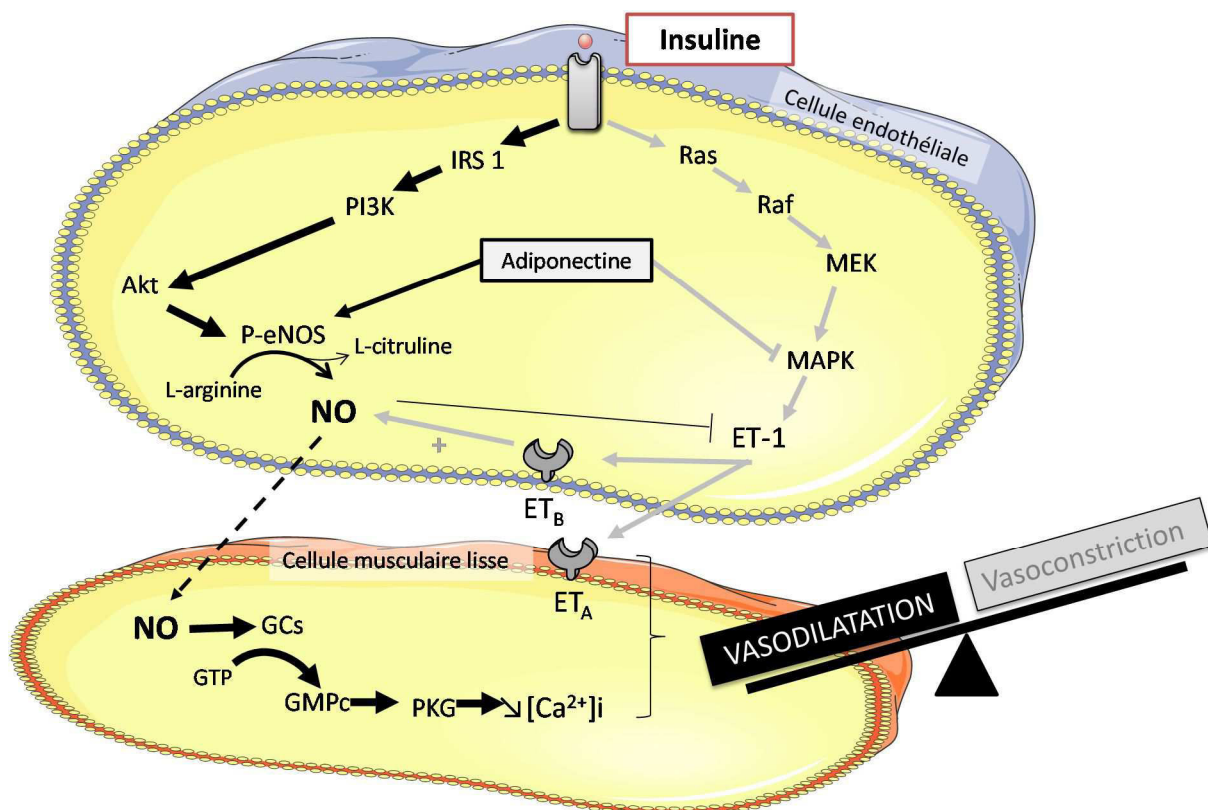


Figure 7 : Action de l'insuline sur le tonus vasculaire en condition physiologique.

IRS1 : *insulin receptor substrate 1* ; PKC : protéine kinase C ; Ang II : angiotensine 2 ; ET-1 : endothéline 1 ; ET_A et ET_B : récepteur à l'endothéline ; GTP : guanosine tri-phosphate ; GMPc : guanosine monophosphate cyclique ; PKG : protéine kinase G ; PI3K : inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase.

3.3.2. Le NO et ses effets vasculaires.

Le monoxyde d'azote formé par les différentes NOS est un agent signalétique impliqué dans différentes importantes fonctions physiologiques, telle que la régulation de la pression artérielle, la vasomotricité locale, la potentialisation des capacités du système nerveux central à long terme, et également au sein du système immunitaire. Nous nous attarderons uniquement sur les fonctions vasculaires du NO pour la suite de notre exposé.

Au niveau des cellules endothéliales et musculaires lisses, le NO est capable d'induire des effets suivant deux modes d'actions direct ou indirect. La voie directe est celle de la S-nitrosylation, qui permet au NO, de modifier les propriétés fonctionnelles de protéines sur lesquelles il se fixe. La voie indirecte est celle du GMPc (Guanosine monophosphate cyclase), responsable des propriétés vasorelaxante du NO.

3.3.2.1. Voie NO / GMPc : mécanismes de vasodilatation

Le NO produit par la eNOS au niveau des cellules endothéliales, diffuse à travers les bicouches lipidiques jusqu'aux CML. Il active une enzyme soluble, la guanylate cyclase (GCs) en se fixant sur l'hème associé à cette enzyme. L'hème nitrosylé est alors capable de fixer une molécule de guanosine tri-phosphate (GTP) et de la transformer en GMPc par déphosphorylation (Ignarro et al., 1999). Ce GMPc active ensuite une protéine kinase G (PKG) à l'origine de différentes actions synergiques et complémentaires, aboutissant à une diminution de la concentration de calcium intracellulaire. En effet, cette protéine kinase induit une fermeture des canaux calciques positionnés sur la membrane du réticulum endoplasmique en phosphorylant l'IRAG (*IP₃-receptor associated cGMP kinase substrate*). Cette protéine inhibe l'action de l'IP₃, et empêche donc un afflux trop important de calcium au sein du cytosol (Schlossmann et al., 2000). Cette PKG agit également au niveau de la pompe calcique SERCA, via la phosphorylation de son site inhibiteur le phospholamban (PLB) (Cornwell et al., 1991 ; Simmerman et al., 1998). Ces deux mécanismes permettent de concentrer le calcium intracellulaire au sein du réticulum endoplasmique. De plus, la PKG active des canaux potassiques calcium-dépendants, au niveau de la membrane sarcoplasmique, participant à la diminution du stock calcique cytoplasmique (Bolotina et al., 1994) (**Figure 8B**). Cette baisse de calcium intracellulaire entraîne un relâchement des fibres musculaires lisses, et réduit également la formation du complexe CaM-Ca²⁺, inhibant ainsi la vasoconstriction (Horowitz et al., 1996).

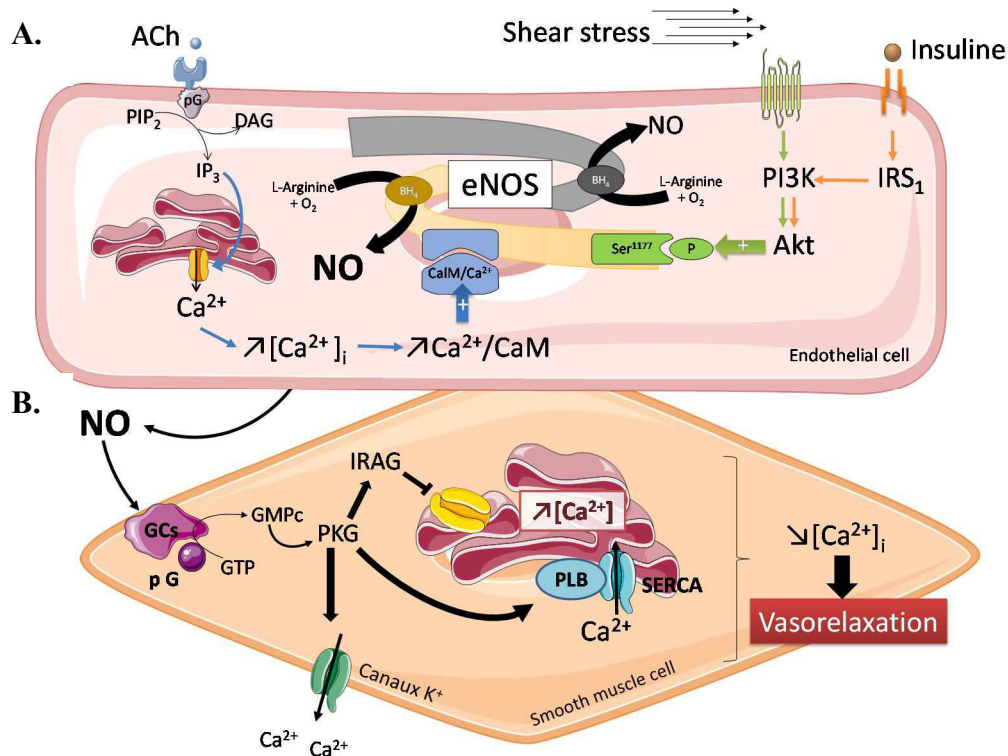


Figure 8: Mécanismes cellulaires impliqués dans la voie du NO.

A. Différentes voies d'activation de la eNOS au niveau de la cellule endothéliale. **B.** Action du NO via une PKG au niveau d'une cellule musculaire lisse vasculaire (cf § 3.1.3.2.Effets vasodilatateurs du NO). _ACh : acétylcholine ; IP₃ : inositol tri-phosphate 1,4,5; PIP₂ : phosphatidylinositol-4,5-biphosphate; DAG: diacyl glycerol; PI3K: phosphatidyl inositol 3 phosphate ;gcs : guanylate cyclase soluble ; CaM : calmoduline ; PKG : protéine kinase G ; IRAG : IP₃ receptor associated GMPc kinase ; PLB : phospholamban.

3.3.2.2. S-nitrosylation par le NO : mécanismes de modifications fonctionnelles.

Bien que la GCs ait été décrite comme le premier récepteur du NO, ce dernier aurait une influence ubiquitaire indépendante de la voie du GMPc. En effet, le NO a la capacité de se fixer à des résidus cystéines de protéines, pour former des groupements nitrosothiols (SNO). La S-nitrosylation d'une protéine entraîne une modification réversible de sa fonction. Ainsi, le NO est capable d'agir sur différentes cibles protéiques, et notamment au niveau de la eNOS (Ravi et al., 2004) et de la protéine chaperonne HSP90 (Martinez Ruiz et al., 2005), entraînant un rétrocontrôle négatif de sa propre production. Ce mécanisme aurait également un effet potentialisateur, via une inhibition de la phosphodiesterase 5 (Murray et al., 2008), entraînant une augmentation de l'activité du GMPc. La réversibilité de ce phénomène est liée à l'action dénitrosylante de certaines enzymes telle que la nitrosogluthathione réductase (GSNOR). Cette enzyme régule la quantité de glutathion nitrosylé, et donc indirectement la nitrosylation des protéines à proximité.

Malgré le fait que la S-nitrosylation des protéines soit majoritairement responsable des effets du NO sur le tonus vasculaire (Bolotina et al., 1994), ce phénomène est encore trop peu décrit.

3.3.2.3. Effet antiadhésif et antiplaquettaire du NO

Les plaquettes jouent un rôle essentiel au niveau de l'homéostasie vasculaire. Leur fonction antihémorragique doit cependant être scrupuleusement régulée pour éviter la formation de thrombus et maintenir une bonne fluidité sanguine (Radomski et al., 1993). Une hyperactivité plaquettaire associée à un phénomène de thrombose, conduit fréquemment à l'installation d'athérosclérose, participant ainsi à l'infarctus du myocarde. Le rôle régulateur du NO au niveau plaquettaire est donc essentiel. De manière similaire à son action au niveau des CML, le NO entraîne une diminution de la concentration calcique intracellulaire au niveau des plaquettes, via une voie GCs/GMPc/PKG, inactivant ainsi le processus d'aggrégation (Benjamin et al., 1991 ; Moro et al., 1996 ; Rao et al., 1990).

L'adhésion leucocytaire est une étape majeure de l'apparition d'athérosclérose (Ross et al., 1999). Les leucocytes circulants peuvent se fixer aux cellules endothéliales grâce à des molécules spécialisées telles que les VCAM (*vascular cell adhesion molecule*), situées sur la membrane plasmique de l'endothélium (Kunsch et al., 1999). Leur fixation facilite leur pénétration au sein des cellules endothéliales, favorisant ainsi l'augmentation du stress oxydant intracellulaire (Ross et al., 1999). Des études mettent en évidence que le NO est capable de limiter la production des VCAM, en inhibant l'expression d'un facteur de transcription essentiel à la production de ces molécules d'adhésion, le NFκB (*nuclear factor-kappa B*) (Khan et al., 1996, Niu et al., 1994). Cependant, le rôle antiadhésif du NO est principalement lié à ses capacités antioxydantes.

3.3.2.4. Rôle antioxydant du NO

Le stress oxydant vasculaire contribue à l'installation des maladies cardiovasculaires et parmi la diversité d'espèces oxygénées réactives qui existent, l'anion superoxyde est le plus important d'entre eux (Harrison et al., 2003). Cet anion superoxyde est capable de se lier au NO afin de produire du peroxy-nitrite, molécule reconnue comme ayant un pouvoir pro-oxydant puissant (Koppenol et al., 1998). Cet anion superoxyde est à l'origine de la formation de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) lors de sa dismutation par la superoxyde dismutase (SOD) (Forstermann et al., 2012). L'anion superoxyde réagit beaucoup plus vite avec le NO, qu'avec la SOD. Cependant la concentration de SOD est, en condition physiologique, bien plus élevée

que la concentration de NO, qui a une durée de vie limitée (Koppenol et al., 1998). Donc, en condition physiologique, la SOD bloque l'action pro-oxyante de l'anion superoxide en le transformant en H_2O_2 , capable d'augmenter la production et l'activité de la eNOS (Drummond R 2000). De plus, des études montrent que le NO favoriserait l'expression de la SOD extracellulaire (ecSOD) (Fukai et al., 2000), qui correspond au tiers des SOD totales présentes au niveau vasculaire (Stralin et al., 1995). Ce phénomène a été observé chez des souris entraînées pendant trois semaines, alors que sur des souris n'exprimant pas le gène eNOS (eNOS^{-/-}), la concentration de ecSOD n'est pas modifiée (Fukai et al., 2000).

Comme le NO a révolutionné la compréhension des mécanismes vasorégulateurs dans les années 1980, grâce aux travaux de Furchgott (Furchgott et al., 1980), un nouvel acteur participant à la régulation de l'homéostasie vasculaire est entré en scène lors de la dernière décennie : le tissu adipeux périvasculaire.

3.4. Bio-communication entre le tissu artériel et le tissu adipeux périvasculaire.

Nous avons vu jusqu'ici que le tonus vasculaire est régulé par différents mécanismes, principalement nerveux et endothéliaux. Cependant, comme présenté dans le paragraphe *Composante externe : le tissu adipeux périvasculaire* (p10), les vaisseaux possèdent une composante externe que la littérature a récemment décrite comme un nouvel acteur impliqué dans la régulation de la motricité vasculaire : le PVAT.

3.4.1. Le PVAT : un phénotype particulier.

Il existe trois groupes de TA au sein de l'organisme : le TA blanc, le TA brun, et le TA beige. Cependant, de récentes études semblent démontrer que le PVAT pourrait faire partie d'une catégorie à part. En effet, outre la localisation spécifique de ces adipocytes, leur origine cellulaire est différente de celles des adipocytes blancs, beiges ou bruns (**Figure 9**). Ainsi, tandis que les adipocytes blancs, retrouvés dans le TA viscéral et sous-cutané, sont dotés d'un fort pouvoir adipogénique, les adipocytes du PVAT, qui dérivent des cellules progénitrices des CML, possèdent une faible capacité adipogénique mais un fort potentiel inflammatoire (Brown et al., 2014 ; Gil-Ortega et al., 2015).

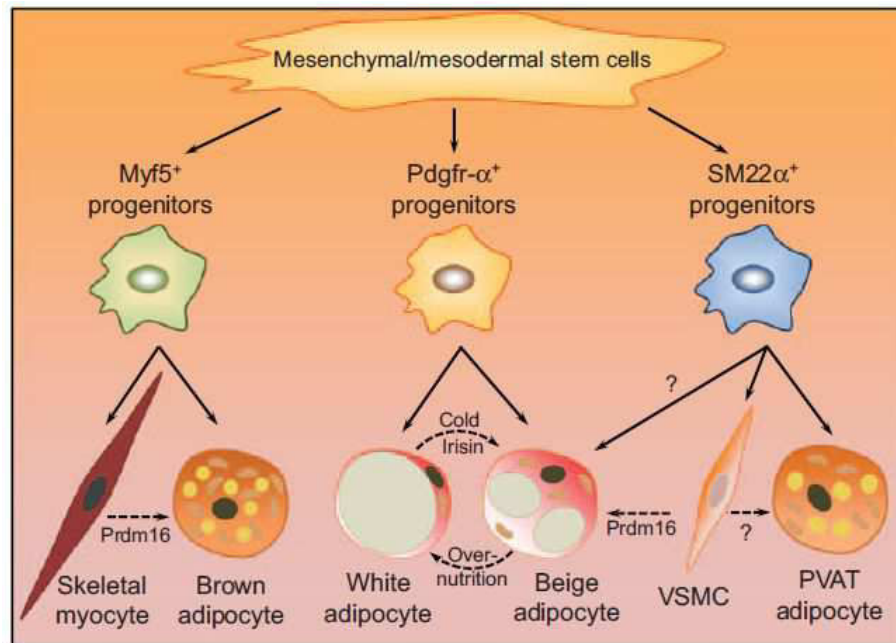


Figure 9 : Origine des différents types d'adipocytes. (Reproduit de Brown et al., 2014)

Le PVAT impose donc sa propre signature phénotypique. En effet les adipocytes du PVAT coronarien présentent, en comparaison au TA blanc, une faible capacité de différenciation, une forme irrégulière, et une plus petite taille associée à de plus petites gouttelettes lipidiques (Chatterjee et al., 2009). L'expression de différentes cytokines telles que l'adiponectine, la leptine, le TNF α , les MCP-1, est moins importante dans le PVAT que dans le TA blanc sous-cutané (Mauro et al., 2013). Il sécrète également un facteur pro-fibrotique, le PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1), comme les autres TA, mais son expression au sein du PVAT serait positivement corrélée à l'âge, suggérant un rôle prépondérant de ce tissu dans le développement de l'athérosclérose (Ghosh et al., 2012).

Cependant, le PVAT n'a pas un phénotype homogène sur l'ensemble des territoires vasculaires. En effet, Galvez Prieto et al. observent une hypertrophie des adipocytes, ainsi qu'une diminution de l'expression d'UCP1 (*uncoupling protein 1*), aussi appelée thermogénine, un marqueur de « brownisation », dans le PVAT mésentérique en comparaison aux adipocytes du PVAT aortique (Galvez Prieto et al., 2008).

Ainsi, ces éléments démontrent une forte hétérogénéité du PVAT pour les différents lits vasculaires. Et de manière surprenante, on observe des différences phénotypiques au sein d'une même artère. C'est le cas de l'aorte. En effet, le PVAT de l'aorte thoracique est composé d'adipocytes bruns multiloculaires, alors que le PVAT de l'aorte abdominale

possède des adipocytes blancs uniloculaires (Padilla et al., 2013). Le phénotype du PVAT thoracique favorise une production de chaleur et une dépense énergétique importante, responsables d'une activité thermogénique permettant une meilleure acclimatation au froid et surtout une protection contre l'athérosclérose (Chang et al., 2012). Il semble également résister à une nourriture riche en gras et en sucre, en limitant l'infiltration des macrophages (Fitzgibbons et al., 2011), l'athérosclérose (Chang et al., 2012) et l'hypoxie (Maenhaut et al., 2010). Le PVAT de l'aorte abdominale, est lui, beaucoup plus sensible à ce genre de stress métabolique, et réagit par une forte production de cytokines pro-inflammatoires (Police et al., 2009) participant ainsi au développement de complications vasculaires (Greenstein et al., 2009).

Ainsi, on considère aujourd'hui que le PVAT de l'aorte thoracique possède un phénotype à caractère brun, le PVAT des artères abdominales serait plutôt beige, et plus on descend au niveau de l'arbre artériel, et plus le PVAT a tendance à se « blanchir » (**Figure 10**).

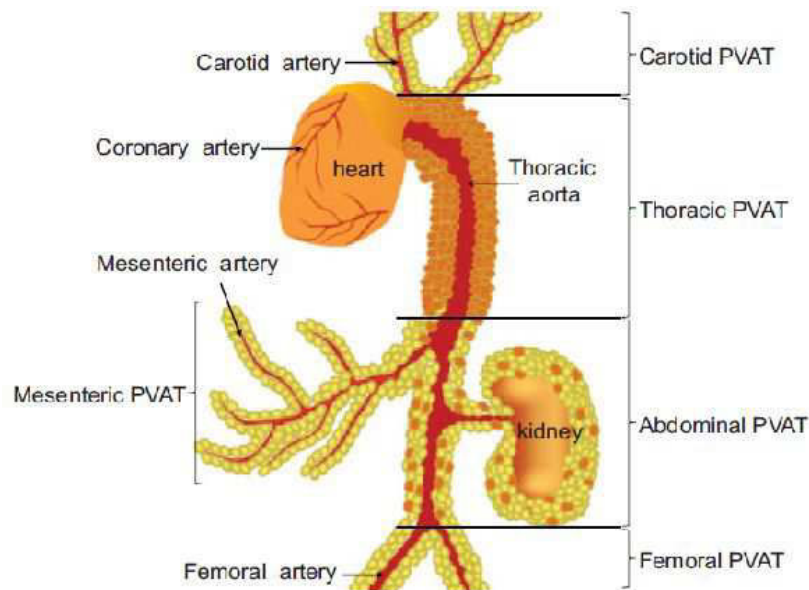


Figure 10 : Les différents phénotypes du PVAT (Brown, 2014)

3.4.2. Les effets vasorégulateurs du PVAT.

Soltis et Cassis, montrent pour la première fois en 1991 l'impact du PVAT sur la régulation de la vasomotricité. Pour cela ils utilisent un système de cuve à organe isolé, dans lequel ils testent la vasoréactivité d'anneaux d'aorte en tension, en présence ou non de PVAT. Ils utilisent différents agents vasoactifs comme la noradrénaline (NA) et ils remarquent que la présence du PVAT limite la contraction de l'artère. Cependant, l'utilisation de la désipramine,

capable d'inhiber la réabsorption de NA, efface l'effet anti-contractile du PVAT, qui serait donc lié à une absorption de cette hormone par le tissu. Ils semblent aussi démontrer que le PVAT serait potentiellement excitable par le SNS, qui aboutirait à la formation d'Ang II, reconnu pour ses capacités vasoconstrictrices. Cette étude pionnière présente ainsi le PVAT comme un nouvel acteur clé de la régulation de l'homéostasie vasculaire (Soltis and Cassis, 1991).

Suite à ces premiers travaux, différentes équipes s'intéressent aux effets vasomoteurs du PVAT, et deux courants vont s'opposer. Une majorité d'études s'accorde à dire que le PVAT possède des capacités anti-contractiles, tandis que d'autres démontrent un effet pro-contractile de ce tissu, et ce indépendamment de la nature des artères étudiées.

3.4.2.1. Effet anti-contractile.

C'est plus de dix ans plus tard, que Löhn et son équipe, publient un article sur les influences vasomotrices du PVAT (Lohn et al., 2002). Ils sont les premiers à parler d'agents relaxants produits par les adipocytes (EDRF : *adipocyte-derived relaxing factor*, remplacé plus tard par le terme PVRF : *PVAT-Relaxing Factor*) rassemblant divers agents produits par le PVAT, capables d'interagir avec l'endothélium et les CML. Cette seconde étude présente également un effet anti-contractile du PVAT sur l'aorte de rat pré-contractée par différents agents (Phényléphrine, Sérotonine, Angiotensine II). Ils démontrent également que le PVRF quel qu'il soit, est bien d'origine adipocytaire, puisque le transfert d'adipocytes en culture induit une relaxation, à l'inverse d'une culture de fibroblastes. Ce résultat a récemment été confirmé par l'équipe de Lee (Lee et al., 2011). Tout comme le NO, précédemment nommé EDRF, a révolutionné la compréhension des mécanismes vasculaires en son temps, aujourd'hui les travaux scientifiques s'intéressent à de nouveaux acteurs issus du PVAT. Le mécanisme de relaxation du PVRF agirait au niveau des CML en stimulant l'ouverture des canaux potassiques, provoquant ainsi une hyperpolarisation de la membrane sarcoplasmique. Plusieurs études mettent en évidence ce mécanisme et tentent de discriminer le type de canal potassique impliqué (Wojcicka et al 2010). Ainsi l'implication des canaux potassiques voltages-dépendants (K_v) est démontrée sur l'artère mésentérique (Verlohren et al., 2004) et l'aorte (Lee et al., 2011). D'autres études mettent cependant en évidence l'implication des canaux potassiques calcium-dépendants (K_{Ca}) (Gao et al., 2007 ; Weston et al., 2010), sur les deux mêmes types d'artères. Il ne semble donc pas y avoir de spécificité du type de canal potassique activé en fonction du type d'artère étudiée. Ce schéma d'action du PVRF n'inclut

pas l'endothélium et les différents agents vasoactifs qu'il est capable de produire. Cependant, l'équipe de Gao propose pour la première fois un mécanisme endothélium-dépendant, impliquant le NO (Gao et al., 2007). Un PVRF de nature inconnue, stimulerait l'ouverture des canaux K_{Ca} via le monoxyde d'azote. La production de NO est démontrée au sein du PVAT, mais ne semble pas jouer un rôle direct sur la vasomotricité (Sun et al., 2013 ; Virdis et al., 2014).

3.4.2.2. Effet pro-contractile.

Bien qu'aujourd'hui un consensus semble apparaître sur l'effet anti-contractile du PVAT, plusieurs études démontrent à l'inverse, un effet pro-contractile de celui-ci. La première étude témoin de ce phénomène est celle de l'équipe de Gao et al. Ils montrent que les artères mésentériques présentent une contraction à la phényléphrine (PE) ou par électro-stimulation, plus importante lorsque le PVAT est laissé intact autour des artères. La stimulation électrique, active le réseau nerveux du PVAT, qui va alors activer la NADPH oxydase, responsable de la contraction des artères sous-jacentes, via une voie $O_2^{\cdot-}$ /ERK-MAPK (Gao et al., 2006).

Cette différence de résultats pourrait être liée à l'utilisation d'un protocole méthodologique très différent de ceux décrits précédemment. Néanmoins, ces observations sont confirmées par Payne et al. sur des coronaires de chien testées *in vivo* et *ex vivo* à l'aide d'un myographe, qui semblent montrer que l'action pro-contractile du PVAT est liée à une inhibition de la eNOS par la phosphorylation de la thréonine 495 (Payne et al., 2008 et 2009). Cette inactivation serait causée par une PKC, activée par un agent vasoactif non-identifié libéré par le PVAT. Ces auteurs ont évalué la vasomotricité de ces microvaisseaux en présence ou non du PVAT coronarien, et également après une perfusion de tissu adipeux péri-coronarien, soit des protocoles d'études similaires à ceux utilisés par des équipes qui observent des effets anti-contractile du PVAT (Lohn et al., 2002 ; Gao et al., 2007 ; Verlorhen et al., 2004). Une étude récente retrouve les effets pro-contractile du PVAT aortique chez le rat, grâce à un transfert de secretome de ce même PVAT sur des anneaux d'aorte en tension (Lee et al., 2014). Ce protocole permet de mettre en évidence l'effet propre des sécrétions du PVAT et de ses adipokines sur la vasomotricité artérielle, limitant les effets confondant lié à la présence du tissu autour du vaisseau.

3.4.2.3. Identité(s) du/des PVRF.

Ces premières études mettent en évidence l'importance du rôle vasoactif du PVAT sur différents lits artériels. Cependant, l'identité de l'agent libéré par le PVAT reste floue. De nombreux auteurs cherchent à mettre en évidence la nature et le mode d'action de cet/ces agent(s). Lohn et al. affirment que le PVRF est d'origine protéique ou peptidique, car l'ajout d'albumine, capable de séquestrer les acides gras, n'a aucun effet sur l'action anti-contractile du PVAT (Lohn et al., 2002). Mais en 2011, une autre étude semble montrer que le PVRF serait plutôt de nature lipidique. En effet, l'ajout d'extrait d'héxane, une molécule capable d'inhiber l'action des lipides, limite fortement l'action anti-contractile du PVAT (Lee et al., 2011). Ces résultats laissent entendre qu'il existe très probablement plusieurs types de molécules libérées par le PVAT capable d'interagir avec le tissu artériel, que ce soit l'endothélium ou directement les CML.

En effet, au regard de la littérature, plusieurs candidats potentiels au rôle de PVRF ont été mis en évidence. Tout d'abord, on s'aperçoit que le PVAT est capable de produire comme tout tissu adipeux, des agents du stress oxydant vasculaire, qui semblent avoir un rôle important sur la vasomotricité. Gao et son équipe, proposent en 2006 **l'anion superoxide**, qui stimulerait l'activation de la voie tyrosine kinase/MAPK-ERK au niveau des CML, conduisant à une vasoconstriction de l'artère mésentérique (Gao et al., 2006). En 2007 ils présentent le **peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)**, capable d'induire un effet anti-contractile endothélium-indépendant au niveau de l'aorte, via l'activation directe de la guanylate cyclase soluble (GCs), responsable d'un relâchement artériel (Gao et al., 2007). Au niveau aortique, une étude démontre que le PVAT produirait du **sulfure d'hydrogène (H_2S)** capable d'activer l'ouverture des canaux potassique (non discriminés) au niveau des CML (Wojcicka et al., en 2010).

Le tissu adipeux est également une grande source de cytokines pro- et anti-inflammatoires. Au niveau vasculaire, ce type de molécules serait capable d'intervenir au niveau de l'homéostasie vasculaire et donc des capacités vasomotrices des différents types de vaisseaux. Un facteur pro-inflammatoire bien connu, le **TNF α** (*Tumor Necrosis growth Factor α*) semble influencer la balance ET-1/NO et donc les capacités vasorelaxantes et constrictrices des artères (Virdis et al., 2014). Ce TNF α semble également capable de stimuler l'activité de la NADPH oxydase et donc d'augmenter la production d'espèces oxygénées réactives (EOR), ce qui participe à la diminution de la biodisponibilité en NO. Cette cytokine est présente en condition saine mais sa concentration est augmentée en condition pathologique



comme en cas d'obésité, où le tissu adipeux, surtout viscéral, voit sa masse augmentée et son phénotype modifié vers un profil pro-inflammatoire.

Hormis les cytokines inflammatoires, les adipocytes sécrètent d'autres types de molécules, comme les acides gras ou des macromolécules protéiques. Sun et al. notent l'action néfaste sur la vasomotricité des acides gras libres (AGL) sécrétés par le PVAT, mais seulement en condition pathologique (Sun et al., 2013). Ils agiraient en synergie avec le stress oxydant vasculaire, en induisant une diminution de la biodisponibilité en NO. L'effet du **Palmitic Acid Methyl Ester (PAME)**, sécrété par le PVAT aortique en condition saine est également mis en évidence, il semble responsable d'un effet anti-contractile direct du PVAT en stimulant l'ouverture des canaux K_v au niveau des CML (Lee et al., 2011). Ces auteurs démontrent également la capacité du PVAT à produire **l'angiotensine II**, provoquant via son action sur les récepteurs AT1 et AT2 au niveau des CML, une vasoconstriction. Chez des rats hypertendus (SHR) la production de cette hormone serait exacerbée, et limiterait les effets vasodilatateurs du PAME, via son action directe sur les CML, mais aussi grâce à sa capacité à bloquer les canaux K_v . **L'angiotensine 1-7** serait également un candidat potentiel pour expliquer les effets anti-contractile du PVAT au niveau aortique (Lee et al., 2009) ainsi qu'au niveau veineux (Lu et al., 2010). Enfin, grâce à ses différentes actions métaboliques, l'adiponectine pourrait être sécrétée par le PVAT et impacter la fonction vasculaire (Zhu et al., 2008).

3.4.2.4. L'adiponectine : un messager clé.

L'adiponectine est une des rares cytokines libérées par le tissu adipeux qui soit bénéfique pour l'organisme. De nombreuses publications ont permis de mettre en évidence ses fonctions dans différents tissus (Xu and Vanhoutte, 2011), et plus particulièrement au niveau de l'homéostasie vasculaire (Zhu et al., 2008). Cette protéine possède trois différentes conformations, de faible (homotrimérique), moyen (hexamérique) ou haut (multimérique) poids moléculaire. Chacune de ces formes oligomériques possède ses propres fonctions biologiques. Il existe trois types de récepteurs sur lesquels l'adiponectine peut se fixer, l'ADIPO R1, l'ADIPO R2 et la T-cadhérine beaucoup moins bien décrite que les deux précédents, et qui pourtant serait largement exprimée au niveau du cœur, des muscles lisses et de l'endothélium (Hug et al., 2004). Ces multiples conformations et récepteurs confèrent à l'adiponectine des effets pléiotropiques sur différents types de cellules (**Figure 11**), notamment au niveau des cellules endothéliales et des CML.

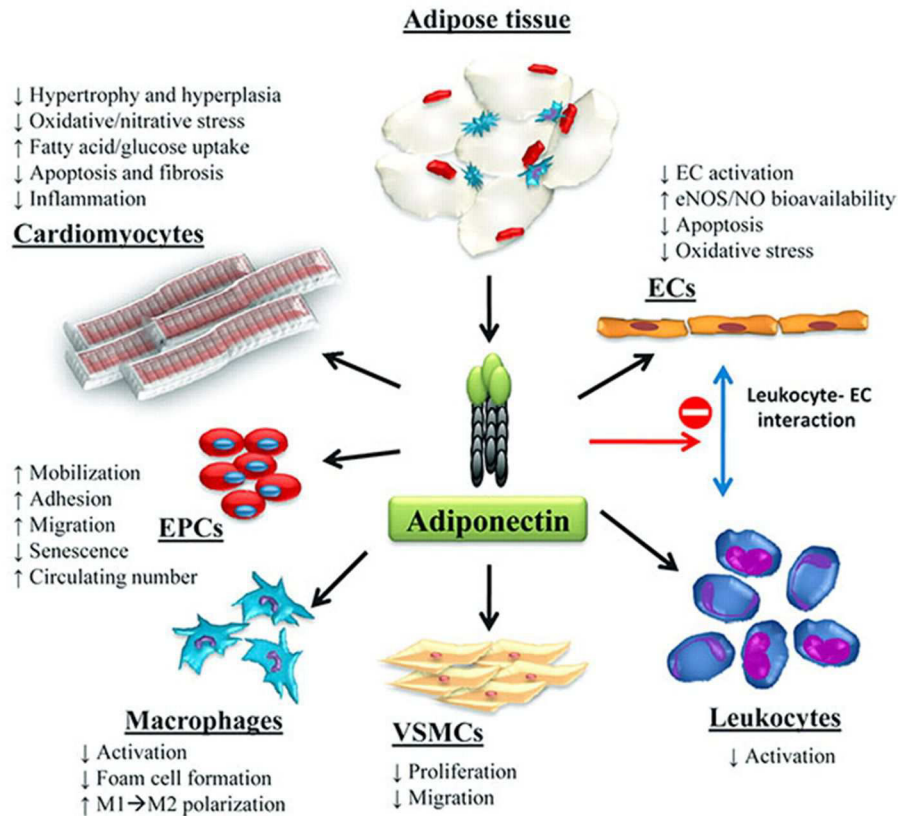


Figure 11 : Les fonctions pléiotropes de l'adiponectine au sein du système cardiovasculaire. (Reproduit de Xu et al., 2012).

Les travaux actuels démontrent que la fixation de l'adiponectine sur ses récepteurs ADIPO R1 et ADIPO R2 permet l'activation de l'AMPK via la phosphorylation du résidu thréonine 172. Ceci active la voie PI3K/Akt, responsable de l'activation de la eNOS par la phosphorylation de sa serine 1177 (Hattori et al., 2003, Chen et al., 2003 ; Tan et al., 2004 ; Xi et al., 2005). L'adiponectine semble également favoriser l'interaction entre la eNOS et la protéine chaperonne HSP90, qui augmente l'activité catalytique de l'enzyme en assurant une bonne conformation quaternaire de celle-ci, et également grâce à son pouvoir attractif pour les différentes molécules utiles à l'activité de la eNOS (Flemming et al., 2010 ; Xu et al., 2011).

Dans ce contexte, l'adiponectine semble être un candidat important au rôle de PVRF. Fesus et al. observent un relâchement d'anneaux d'aorte de rat mis sous tension dans des cuves à organe isolé, en présence d'adiponectine (Fesus et al., 2007). Ils semblent également montrer que cet effet vasorelaxant de l'adiponectine passe par la stimulation des canaux potassiques calcium-dépendants. Cependant, ils ne retrouvent pas le même résultat sur des artères mésentériques de souris. En effet, des souris *Apn^{-/-}* n'exprimant pas le gène de l'adiponectine, répondent de la même manière que des souris *wild type* à un agent

vasoconstricteur. Ainsi, les effets vasodilatateurs de l'adiponectine semblent différents selon les territoires vasculaires étudiés.

Mais, cette hormone est capable d'impacter l'homéostasie vasculaire, et de manière indirecte la vasomotricité grâce à d'autres propriétés. Comme, par exemple, sa capacité anti-oxydante au sein de l'endothélium (Motoshima et al., 2004). L'adiponectine limite la production d'EOR, via une voie AMPc/PKA dépendante (Ouedraogo et al., 2006), mais également grâce à l'inactivation de la NADPH oxydase comme en témoigne l'intéressante étude d'Antonopoulos (Antonopoulos et al., 2015). Ainsi, en modulant le stress oxydant vasculaire, l'adiponectine participe aux capacités anti-contractiles du PVAT en condition saine. Cependant, il est bien décrit qu'en condition pathologique comme dans le cadre de l'obésité et du diabète de type 2, la concentration plasmatique d'adiponectine est fortement diminuée. Ce phénomène semble important puisque des travaux récents ont démontré la corrélation forte entre la diminution de sécrétion d'adiponectine et l'augmentation de l'activité de la NADPH oxydase (Antonopoulos et al., 2015). Cette augmentation du stress oxydant vasculaire engendre ainsi une diminution de la biodisponibilité du NO, comme nous avons pu le décrire précédemment.

Ainsi, le PVAT, quelle que soit son origine au niveau de l'arbre artériel, semble participer à la régulation de la vasomotricité. Néanmoins, bien que différentes molécules aient été identifiées comme jouant potentiellement le rôle de PVRF, les mécanismes impliqués restent encore flous. Il paraît important de mieux comprendre l'ensemble des modes d'action de ce tissu sur la vasomotricité, et notamment dans le cadre de pathologies métaboliques. En effet, chez des sujets atteints d'obésité, le métabolisme et le phénotype du TA est modifié, et devient une source de molécules pro-inflammatoires, pouvant être à l'origine de l'altération de nombreuses grandes fonctions physiologiques. Notamment, la proximité du PVAT avec le tissu artériel, peut avoir des conséquences majeures sur l'installation de complications cardiovasculaires.



Partie I - Ce qu'il faut retenir :

- ✓ La **fonction endothéliale** possède un rôle majeur au sein du système cardiovasculaire. Elle joue un rôle clé dans la régulation du tonus vasculaire. Elle utilise pour cela, différents agents vasoactifs, dont le **NO**, qui est responsable majoritairement de la relaxation endothélium-dépendante des vaisseaux. Cet agent est produit par une enzyme endothéliale, la **eNOS**, régulée de manière fine par différents mécanismes (shear-stress, voie de l'insuline, activation cholinergique), et sensible aux modifications des conditions redox cellulaires.

- ✓ Les vaisseaux possèdent une composante externe au schéma classiquement décrit (intima-media-adventice), composé d'adipocytes, de fibroblastes, de macrophages, et de cellules stromales : **le tissu adipeux périvasculaire (PVAT)**. Celui-ci possède un phénotype particulier, qui le différencie des autres tissus adipeux (viscéral, sous-cutané). En effet, selon sa localisation son aspect est modifié, ainsi au niveau de l'aorte thoracique ce PVAT est plutôt brun, alors qu'il « blanchit » tout au long du développement de l'arbre artériel. Ce PVAT semble jouer un rôle important dans la régulation de la vasomotricité, grâce à la libération de facteurs vasoactifs qui agiraient de manière endo- ou paracrine au niveau des cellules endothéliales ou musculaires lisses. L'**adiponectine** pourrait être l'un de ces facteurs, en modulant la voie eNOS/NO et la bio-disponibilité du NO.

PARTIE II: DESORDRES METABOLIQUES ET FONCTION VASCULAIRE

D'après l'OMS, les pathologies cardiovasculaires telles que les cardiopathies ischémiques et les accidents vasculaires cérébraux, sont à l'heure actuelle la principale cause de mortalité dans le monde. Or, la dysfonction endothéliale est non seulement un marqueur précoce de l'apparition de ces pathologies cardiovasculaires (Bonetti et al., 2003 ; Higashi et al., 2009) mais aussi un acteur clé du développement de la pathologie ischémique, ce qui en fait un élément d'étude majeur.

Au cours de notre exposé, nous nous intéresserons aux impacts vasculaires de troubles métaboliques aigus, induits par une hyperglycémie transitoire ; et chroniques, associés au syndrome métabolique. Dans le cadre de cette pathologie, nous développerons le rôle du PVAT sur la régulation de la motricité vasculaire.

1. LA DYSFONCTION ENDOTHELIALE.

La dysfonction endothéliale reflète un déséquilibre entre les substances vasodilatatrices et vasoconstrictrices produites et sécrétées par l'endothélium. Notamment, la déplétion du NO, est souvent la cause de dysfonctions endothéliales. En effet, grâce aux effets bénéfiques pour la fonction vasculaire du NO, la préservation de sa biodisponibilité est essentielle à la prévention de dysfonctions vasculaires (Flammer et al., 2012). Toutefois, cette molécule est particulièrement sensible aux EOR et le déséquilibre entre la concentration en NO et en EOR en faveur de ces dernières, favorise l'installation de dysfonctions endothéliales (Higashi et al., 2009).

1.1. Le stress oxydant vasculaire

Toutes les cellules aérobies, qui fonctionnent grâce à l'énergie fournie par l'O₂, sont source d'EOR. Ceux-ci sont caractérisés par un électron non apparié associé à un radical libre, comme l'anion superoxide (O₂^{•-}), l'hydroxyle radicalaire (HO[•]), le monoxyde d'azote radicalaire (NO[•]) ou encore les radicaux lipidiques. D'autres, tels que le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), le peroxydinitrite, l'acide hypochlorite (HOCl) ne sont pas des radicaux

libres mais possèdent également des capacités oxydantes et contribuent largement à l'installation du stress oxydant.

La production excessive d'EOR, dépassant les capacités de défenses antioxydantes endogènes, engendre l'oxydation de macromolécules biologiques telles que l'ADN, les protéines, les carbohydrates et les lipides. Ce phénomène est nommé stress oxydant. Dans ce chapitre seront développées les sources principales de stress oxydants, ainsi que les mécanismes antioxydants mis en place au sein des cellules endothéliales notamment.

1.1.1. Les sources d'EOR

Il existe de nombreuses sources d'EOR au sein des cellules eucaryotes, incluant la respiration mitochondriale, la voie de l'acide arachidonique, les cytochromes p450s, la xanthine oxydase, la NADH/NADPH oxydase (NOx), les NOS, les peroxidases et d'autres protéines sanguines. La xanthine oxydase, les NADPH oxydase, les enzymes de la respiration mitochondriale et les NOS ont une importance majeure au sein du système cardiovasculaire.

- **La xanthine oxydase :**

La xanthine oxydase est exprimée notamment au niveau des cellules endothéliales (Guzik et al., 2006). Son expression et son activité semblent être fortement régulées par, notamment, l'angiotensine II (Landmesser et al., 2007) et des facteurs pro-inflammatoires tels que TNF α , IL-1, IL-6 et l'interféron γ (Berry et Hare, 2004). Cette enzyme catalyse la dégradation de l'hypoxanthine en xanthine puis en acide urique, associée à une production d'O $_2^{\cdot-}$ et d'H $_2$ O $_2$. La concentration d'acide urique et donc de xanthine oxydase seraient des prédictors du niveau de risque cardiovasculaire et des pathologies métaboliques (Dawson et al., 2006).

- **Les NADPH oxydases (NOX) :**

Les NOX sont considérées comme la principale source de stress oxydant vasculaire. Ces enzymes, principalement membranaires, produisent des anions superoxydes dans différents compartiments (noyau, réticulum endoplasmique, endosome, phagosome, mitochondrie, ou membrane plasmique) de multiples cellules. Globalement, les NOX transfèrent un électron issu de leur domaine C-terminal relié à une molécule de NADPH (ou NADH) et de FAD, vers une molécule de dioxygène capturée, pour former un anion superoxyde. Il existe différents isoformes de NOX constitutives exprimées dans les cellules endothéliales, les CML et les fibroblastes de l'adventice. La NOX2 notamment est surexprimée en présence de facteurs de

risques cardiovasculaires, et particulièrement par des stimuli pro-inflammatoires (Brandes et al., 2008). Cet isoforme a tout d'abord été étudié dans les phagosome, où la production d'anion superoxide permet de tuer les bactéries phagocytées. Cependant, on le retrouve également au sein du cytosol des cellules endothéliales, où il peut participer à l'apparition d'un stress oxydant, notamment à cause d'une surexpression induite par l'Ang II. La forte concentration de NOX2 et donc la production excessive d'EOR, participe à l'installation de dysfonctions endothéliales via la réduction de production de NO (Tetsuro et al., 2011).

- **La chaîne de transport d'électrons mitochondriale (CTM)**

La chaîne de transport d'électrons mitochondriale (CTM) est une source majeure d'EOR, (O_2° , H_2O_2 et OH°) (Loshen et al., 1971 ; Boveris et al., 1972 ; Chance et al., 1979). Couramment, certains électrons s'échappent de la CTM, et se fixent sur une molécule de dioxygène, formant un O_2° , qui est rapidement transformé en H_2O_2 par la SOD mitochondriale (SOD-Mn) (Loshen et al., 1974 ; Boveris and Cadenas 1975). La production d'EOR par la mitochondrie est fortement impliquée dans l'installation de l'athérosclérose et dans différentes pathologies cardiovasculaires.

Des études ont montré que cette production d'EOR mitochondriales est un phénomène physiologique, fortement régulé par la SOD mitochondriale. En effet, des souris qui n'expriment pas le gène de la SOD-Mn, meurent prématurément d'insuffisance cardiaque et/ou d'autres myopathies (Li et al., 1995 ; Nojiri et al., 2006). Cette enzyme antioxydante est essentielle au bon fonctionnement d'organes riches en mitochondries tels que le cœur, le foie et le cerveau (Liu et al., 2002).

1.1.2. Les défenses antioxydantes

La paroi vasculaire est constituée d'une variété d'enzymes anti-oxydantes capables de lutter contre la propagation et l'effet délétère des EOR. Celles-ci, incluent entre autres, la superoxide dismutase, la catalase, et la glutathione peroxydase (**Figure 12**).

- **La superoxide Dismutase (SOD)**

Il existe trois isoformes de SOD au sein de la paroi vasculaire : la SOD1 (SOD_{Cu-Zn}) que l'on retrouve essentiellement au niveau du cytoplasme et de l'espace inter membranaire mitochondrial ; la SOD2 (SOD_{Mn}) située au niveau de la matrice mitochondriale, qui se trouve en première ligne face à la production d'EOR de cet organite (Ballinger et al., 2002);

et enfin la SOD3 (SOD_{Ec}) produite essentiellement par les CML et les macrophages mais agissant uniquement au niveau extracellulaire (Fukai et al., 2011). Cette enzyme est responsable de la transformation de l'anion superoxide en peroxyde d'hydrogène (Forstermann et al., 2012), elle aurait un effet anti-athérogène grâce à son action anti-oxydante, qui permet de préserver la biodisponibilité du NO (**Figure 12**). Un défaut de synthèse de ces SOD entraîne des dégâts considérables au sein de la paroi vasculaire (Ballinger et al., 2002), mais une trop forte concentration peut également avoir des conséquences fonctionnelles, notamment liées à la production excessive de peroxyde d'hydrogène (Fukai et al., 2011).

- **La catalase :**

La catalase possède un hème-ferrique grâce auquel il peut se lier au peroxyde d'hydrogène, et ainsi catalyser sa transformation en molécule d'eau et d'oxygène (**Figure 12**). Une surexpression de cette enzyme induit une diminution de l'athérosclérose chez des souris ApoE (Yang et al., 2004), alors qu'une forte expression de SOD n'a que peu d'effets. Ces résultats laissent entendre que le peroxyde d'hydrogène, plus que l'O₂^{•-}, jouerait un rôle important dans le développement de la plaque d'athérome (Yang et al., 2004 et 2009).

- **La glutathione peroxydase :**

La glutathione peroxydase est une protéine ubiquitaire, majoritairement responsable de l'action anti-oxydante dans de nombreuses cellules (Lubos et al., 2011). La GPx1 est la plus abondante, elle catalyse la transformation du peroxyde d'hydrogène en molécule d'eau. Son activité est inversement corrélée aux risques cardiovasculaires (Blankenberg et al., 2003), et une diminution prononcée de son expression induit une augmentation de la concentration de LDL oxydés, responsable d'un accroissement de l'activité des macrophages (Cheng et al., 2013).

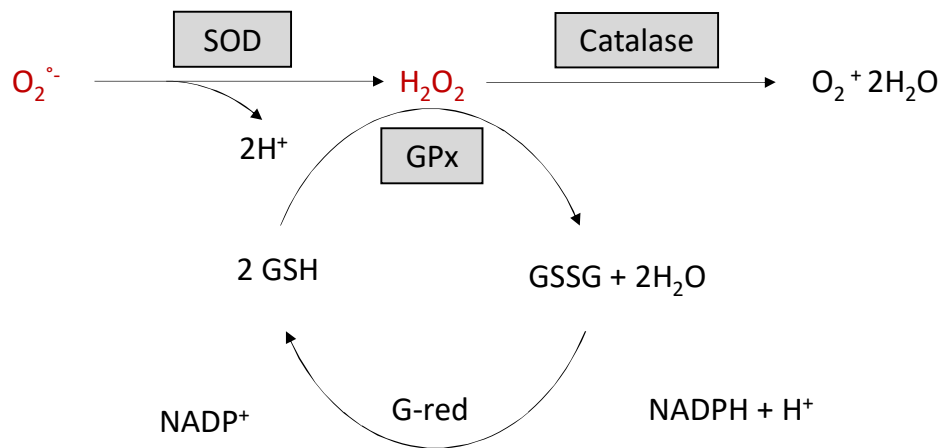


Figure 12 : Mécanismes des défenses antioxydantes.

SOD : superoxide dismutase ; GPx : Glutathion peroxidase; G-red : glutathione réductase ; GSH : glutathion réduit ; GSSG : glutathion oxydé, H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène, $O_2^{\bullet-}$: anion superoxide.

1.2. Impact des EOR sur la voie eNOS/NO.

La voie eNOS/NO est particulièrement impactée par le stress oxydant. Une forte production d'EOR entraîne une diminution de la biodisponibilité du NO, d'une part en réduisant la quantité déjà formée par réaction avec l' $O_2^{\bullet-}$ responsable de la formation de peroxynitrite (Chanon et al., 2004), et d'autre part en limitant l'activité catalytique de la eNOS (**Figure 13**).

1.2.1. La diminution du substrat (L-arginine)

L'activité enzymatique de la eNOS dépend de ses nombreux cofacteurs (BH_4 , FAD, FMN, NADPH) mais également de la disponibilité de son substrat, la L-arginine. La L-arginine plasmatique (80 à $120\mu\text{M}$), ne représente que 1,2% de la fraction totale, mais contribue pourtant à 60% de la formation de NO au sein des cellules endothéliales (Wu and Morris, 1998). En effet, la part extra-cellulaire de L-arginine serait limitante pour la production de l'agent vasodilatateur. Ainsi, il existe de nombreux canaux ioniques transmembranaires, qui permettent la régulation de la concentration cellulaire de ce substrat (Chin-Dusting et al., 2007).

Néanmoins, le flux de L-arginine n'est pas le seul facteur impactant sa biodisponibilité au sein des cellules endothéliales. En effet, le métabolisme de cette molécule est complexe et fait intervenir différents facteurs qui peuvent être influencés par le stress oxydant notamment. La L-arginine peut être dégradée en ornithine et en urée par l'arginase, enzyme dont l'expression

augmente considérablement en présence d'EOR (Wu and Morris, 1998). De plus, la protéine arginine N-méthyltransférase (PRMT) catalyse la formation d'asymmetric methylarginine (ADMA) à partir de la L-arginine (Bedford et Clarke, 2009). Cet ADMA est un agent compétitif inhibiteur de la L-arginine, empêchant ainsi la synthèse de NO. Le stress oxydant favorise l'expression de PRMT, participant ainsi à la dégradation du substrat de la eNOS, et à son inhibition. Une enzyme permet cependant de dégrader les molécules d'ADMA en citrulline et en diméthylamine, la diméthylarginine diméthylarginohydrolase (DDAH) (Vallance et Leiper, 2004). Malheureusement, elle est également la cible des EOR qui inhibent son activité (Palm et al., 2007).

1.2.2. L'oxydation du cofacteur essentiel : BH₄

Le BH₄ possède un métabolisme assez complexe, sa viabilité est assurée par deux voies, une voie de synthèse à partir de la sepiaptérine et une voie de synthèse de novo à partir de guanosine triphosphate (GTP). Une enzyme clé impliquée dans la première voie, la dihydrofolate réductase (DHFR), est limitante dans la production de BH₄ et donc déterminante pour l'état de couplage de la eNOS (Zhang et al., 2007).

La disparition du BH₄ en condition de stress oxydant semble être la principale cause de découplage de la eNOS, ce qui en fait également une très bonne cible thérapeutique. Le BH₄ stabilise la forme dimérique de la eNOS, permet la fixation de la molécule de dioxygène et participe au transfert électronique au sein de l'enzyme. Ce dernier se déroule en deux étapes :

- 1) Fixation d'un premier électron, provenant du domaine réductase, sur l'hème => formation de l'hème ferreux qui fixe l'O₂ (Hème ferreux – O₂).
- 2) Le BH₄ apporte ensuite un second électron au complexe précédemment formé, produisant ainsi un complexe oxygéné-ferrique nécessaire à la catalyse de la réaction.

Le BH₄ oxydé (BH₃[°]) est ensuite réduit par le domaine réductase pour reformer une molécule de BH₄, et perpétuer le cycle. Ainsi, sans la présence de BH₄, le complexe hème-ferreux se dissocie formant l'anion superoxide O₂^{°-} et un hème ferrique.

La déplétion de BH₄ est généralement attribuée à son oxydation par les EOR et notamment, par l'ONOO[°], il est alors oxydé en dihydrobioptine (BH₂). Sous cette forme il peut toujours se lier à la eNOS mais ne permet plus la formation de NO, participant ainsi à la production d'O₂^{°-}. Le ratio BH₄/BH₂ est donc déterminant dans la production de NO (Crabtree et al., 2011 ; Chen et al., 2014).

1.2.3. Le découplage de la eNOS par S-glutathionylation

La S-glutathionylation consiste en une modification post-transcriptionnelle, au cours de laquelle une molécule de glutathione (GSH) se fixe sur une protéine grâce à la formation d'un pont disulfure avec un groupement thiol. La eNOS qui possède deux résidus cystéines (Cys689 et Cys908) au sein de sa structure protéique, peut être la cible de S-glutathionylation, comme l'ont démontré (Chen et al., 2010). Ce phénomène engendre un découplage fonctionnel de la eNOS, qui devient alors source de stress oxydant, malgré la conservation de sa conformation homodimérique. Cette même étude met d'ailleurs en évidence chez des rats hypertendus, une augmentation du niveau de la eNOS-S-gluthathionylée, corrigée par un traitement visant à réduire les groupements thiols. Ainsi, le découplage fonctionnel de la eNOS par la S-glutathionylation semble contribuer à la constriction des vaisseaux, et à long terme, à l'installation de maladie cardiovasculaire hypertensive, très souvent associé aux désordres métaboliques.

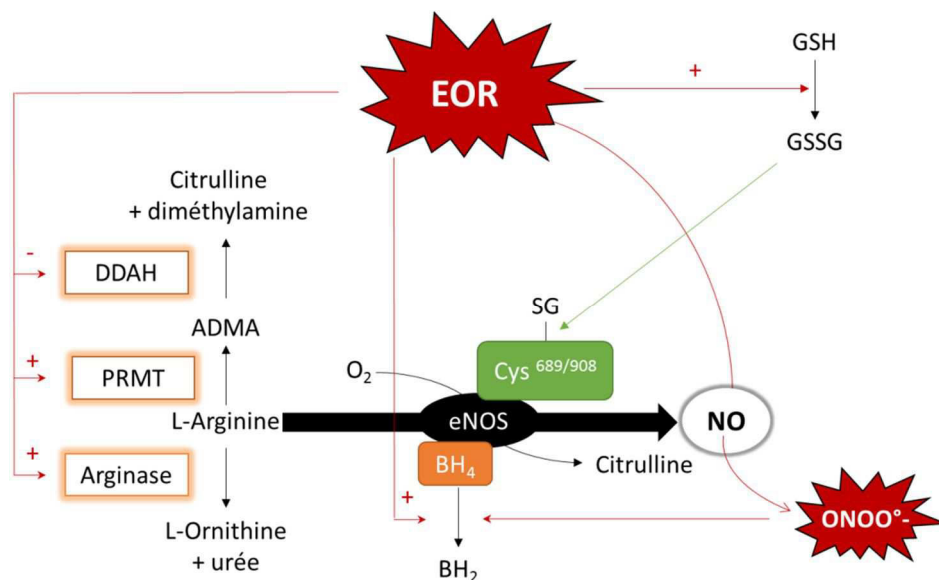


Figure 13 : Actions du stress oxydant sur la eNOS.

EOR : espèces oxygénées réactives ; DDAH : diméthylarginine diméthylarginohydrolase ; PRMT : protéine arginine N-méthyltransférase ; GSH/GSSG : glutathion réduit/oxydé ; BH₄ : tétrahydrobioptérine, ONOO⁻ : peroxyde nitrite.

Dans la suite de notre exposé, nous nous intéresserons plus particulièrement aux dysfonctions endothéliales induites dans le cadre de **troubles métaboliques aigus**, comme lors d'une hyperglycémie transitoire, ou **chroniques**, apparenté aux altérations caractéristiques du syndrome métabolique.

2. ALTERATIONS AIGUES ET CHRONIQUES DE LA FONCTION ENDOTHELIALE

La fonction endothéliale est très sensible aux différentes modifications métaboliques transitoires ou chroniques, de par son interaction directe avec le compartiment sanguin qui achemine les divers agents délétères sécrétés ou absorbés par l'organisme. Différents facteurs de risques des pathologies cardiovasculaires, tels que l'âge / le tabac / la dyslipidémie / l'hypertension artérielle et l'hyperglycémie chronique intimement liée au diabète, contribuent à l'installation de dysfonctions endothéliales.

2.1. Le syndrome métabolique et la fonction vasculaire

L'obésité est un fléau pour nos sociétés modernes. En 2014 l'OMS a recensé 1.9 milliards d'individus en surpoids à travers le monde, soit 39% de la population mondiale adulte, et environ 600 millions d'individus atteints d'obésité, soit 13% de la population mondiale (**Figure 14**). L'obésité tue plus de personnes dans le monde que la malnutrition. Elle est la résultante d'un déséquilibre énergétique entre les calories consommées et dépensées, lié à l'augmentation de la sédentarité des populations, associée à un régime alimentaire trop riche en lipides et en glucides, notamment en sucres ajoutés.

L'obésité est caractérisée par une accumulation progressive de tissu adipeux au sein de l'organisme, déterminé par un indice de masse corporelle ($IMC = \frac{\text{poids (kg)}}{\text{taille (m)}^2} \geq 30 \text{ kg.m}^{-2}$). Elle précède généralement l'apparition du syndrome métabolique (Deedwania et al., 2006), dont elle demeure une des principales caractéristiques (O'Neill et al., 2014).

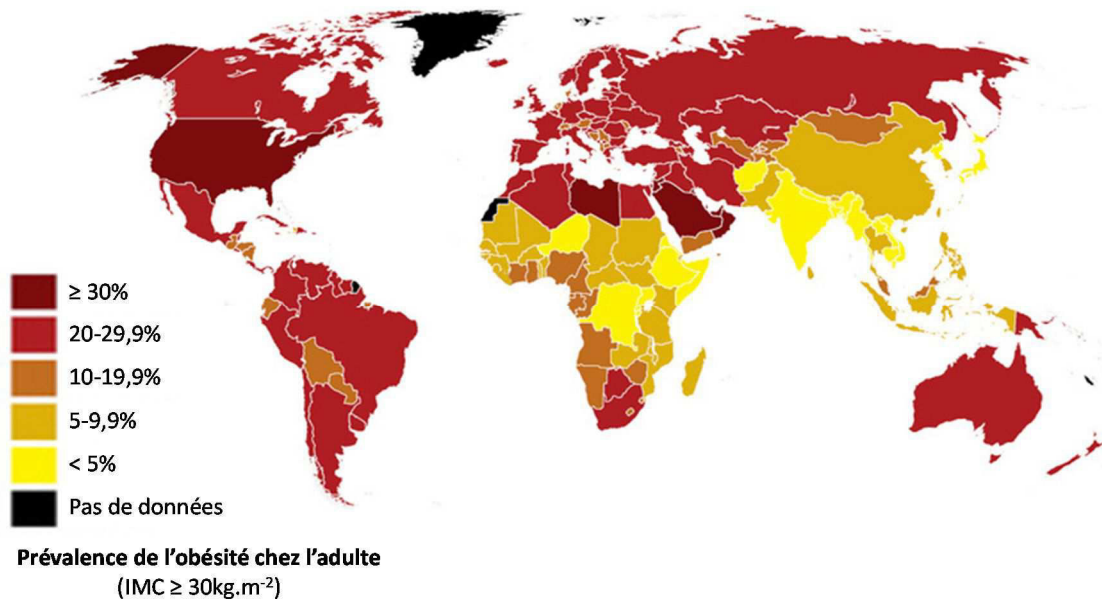


Figure 14: Prévalence de l'obésité chez l'adulte à travers le monde.
 (D'après l'OMS, 2014)

Le SMet est une entité clinique définie par une constellation de plusieurs facteurs de risque des pathologies cardiovasculaires et du diabète de type 2.

Sa complexité a généré différentes définitions depuis les premiers travaux de Raven et al. (Raven et al., 1988), cependant, récemment les principales organisations de santé se sont réunies afin d'unifier les différents critères qui définissent ce SMet (Alberti et al., 2009). Ces critères incluent une obésité abdominale, une hypertriglycémie ($> 150\text{mg/dl}$), une diminution du taux d'HDL ($< 40\text{mg/dl}$ chez les hommes et $< 50\text{mg/dl}$ chez les femmes), une hypertension artérielle ($> 130/85\text{mmHg}$) et une hyperglycémie à jeun ($> 100\text{mg/dl}$). Trois de ces critères précédemment décrits sont nécessaires au diagnostic clinique d'un SMet. Malgré cette définition commune, la prévalence du SMet à travers le monde est difficile à évaluer en fonction des différents pays et de l'origine ethnique des populations (Kaur et al., 2014). Cependant, il est généralement accepté par toutes les organisations de santé, que la prévalence du SMet suit celle de l'IMC et de l'âge (Ervin et al., 2009) (**Figure 15**).



Country	<i>n</i>	Age (years)	NCEP:ATPIII	IDF
Australia (15)	11,247	≥25	24.4% male 19.9% female	34.4% male 27.4% female
China (19)	15,540	35–74	9.8% male 17.8% female	N/R N/R
Denmark (17)	2,493	41–72	18.6% male 14.3% female	23.8% male 17.5% female
India (21)	2,350	>20	17.1% male 19.4% female	N/R N/R
Ireland (16)	890	50–69	21.8% male 21.5% female	N/R N/R
South Korea (23)	40,698	20–28	5.2% male 9.05% female	N/R N/R
United States (13)	3,601	≥20	33.7% male 35.4% female	39.9% male 38.1% female

Prevalence of MetS according to age and NCEP:ATPIII or IDF definitions.

IDF, International Diabetes Federation; MetS, metabolic syndrome; NCEP:ATPIII, National Cholesterol Education Program – Third Adult Treatment Panel; N/R, not reported.

Figure 15 : Prévalence du SMet en fonction de l'âge et selon la définition de NCEP ;ATPIII, et de l'IDF (Reproduit de O'Neill et al., 2014).

Les différents troubles métaboliques qui définissent ce SMet sont tous des facteurs de risques interdépendants de pathologies cardiovasculaires, première cause de mortalité dans le monde (OMS, 2014). Ainsi le SMet participe à l'augmentation de la prévalence des maladies cardiovasculaires, via une détérioration de la fonction de l'endothélium. En effet, tous les éléments qui caractérisent ce SMet, sont associés à l'apparition de dysfonctions endothéliales (Fornoni et al., 2005) (**Figure 16**).

Il apparaît ainsi nécessaire de mieux comprendre les mécanismes physiologiques, menant au développement des maladies cardiovasculaires dans le cadre d'un syndrome métabolique. L'évaluation de la fonction endothéliale et de ses capacités de relaxation, en présence des différents facteurs de risques caractéristiques du SMet, sont des éléments clés dans la compréhension de ces mécanismes physiopathologiques.

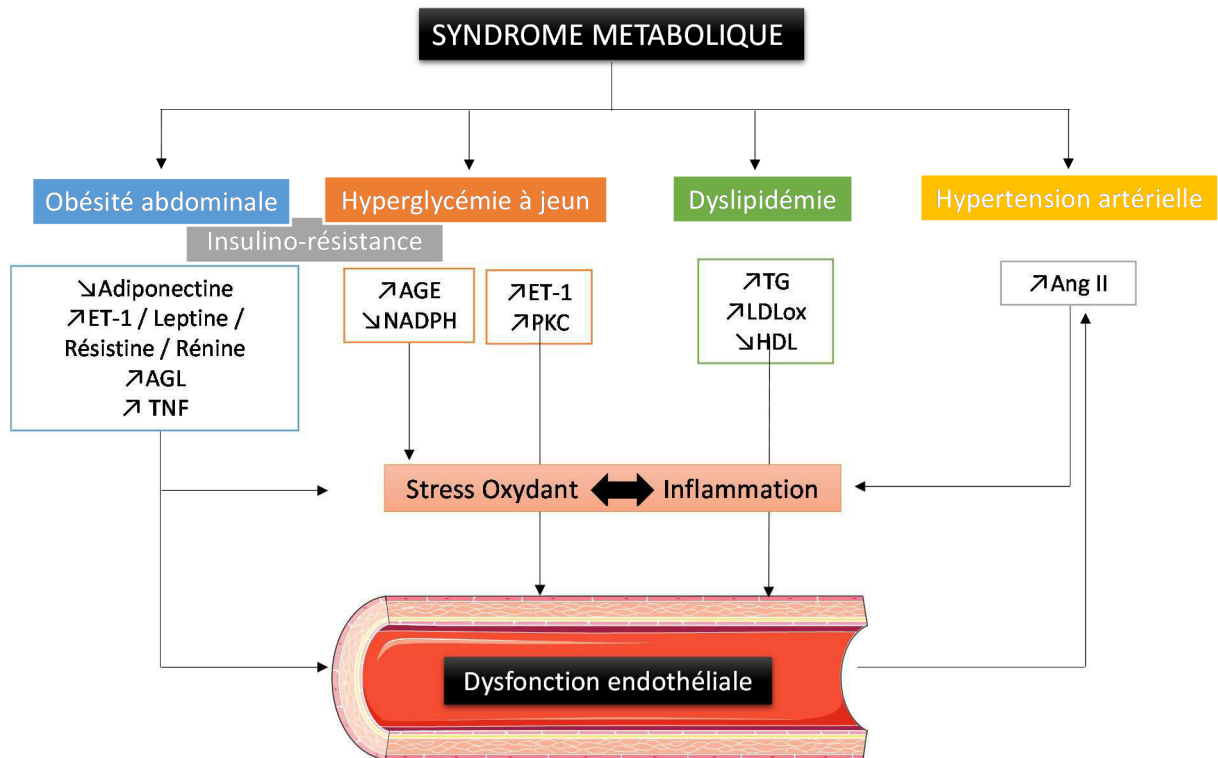


Figure 16 : Mécanismes induit par le syndrome métabolique impliqués dans l'installation de la dysfonction endothéliale.

2.2.Impact de l'hyperglycémie sur la fonction endothéliale.

L'hyperglycémie (HG) chronique, caractéristique principale du diabète de type 2, est un facteur de risque majeur de pathologie cardiovasculaire. Cependant, d'après différentes études épidémiologiques, la réponse endothéliale à une HG post-prandiale, et non à jeûn, serait un meilleur indice de la présence de potentielle maladie cardiovasculaire, chez des patients diabétiques mais également chez des patients normoglycémiques (Mah et al., 2012).

Ainsi, dans ce chapitre nous nous intéresserons, dans un premier temps, à l'impact de l'HG aiguë sur la fonction endothéliale, puis à celui de l'HG chronique.

2.2.1. Hyperglycémie aiguë

- **Stress aigu nutritionnel : les boissons sucrées**

La consommation de boissons sucrées est une source de sucre ajouté très importante dans l'alimentation à travers le monde. (Brown et al., 2008 ; Huang et al., 2014). Dans une récente étude, Singh et al. affirment que sur l'année 2010, 184 000 personnes dans le monde seraient

décédées à cause d'une trop forte consommation de boissons sucrées (Singh et al., 2015). Ces sodas ou autres boissons sucrées, sont des éléments ajoutés, non nécessaires à notre alimentation, qui augmentent considérablement la prévalence des pathologies cardiométaboliques telles que l'obésité, l'insulino-résistance, le syndrome métabolique ou bien encore le diabète de type 2. (Hu et al., 2010 ; O'Connor et al., 2015).

Il a également été démontré qu'une consommation excessive de ces boissons sucrées cause une augmentation de l'incidence des maladies cardiovasculaires (Xi et al., 2015). Or, le précurseur de toutes pathologies cardiovasculaires est l'atteinte de la fonction vasculaire (Souza et al., 2014), qui est particulièrement sensible au stress hyperglycémique. Notre équipe a récemment mis en évidence par une revue systématique et méta-analyse, que l'HG aigue provoque une altération de la fonction endothéliale au niveau macrocirculatoire chez des patients atteints de pathologies cardiométaboliques mais, de manière très intéressante, également chez des personnes jeunes et en bonne santé (Loader et al., 2015). Ces altérations semblent être liées à une augmentation du stress oxydant vasculaire induit par l'HG aigue (Mah et al., 2011 et 2012). Cependant, ce phénomène n'a pas été retrouvé au niveau de la microcirculation. En effet, ce territoire étant difficile d'accès, trop peu de données existent pour conclure sur un éventuel effet de l'HG.

- **Effet de l'hyperglycémie aigue sur la fonction vasculaire**

L'étude de Mah et ses collaborateurs en 2011 montrent qu'une HG aigue induite par un test de tolérance au glucose chez de jeunes hommes en bonne santé, provoque des dysfonctions endothéliales causées par une altération de la voie du NO. En effet, ils montrent une diminution de la concentration de L-arginine, associée à une augmentation du ratio ADMA/L-arginine, reconnu comme étant un facteur de risque des maladies cardiovasculaires. Ils mettent également en évidence une augmentation des malonaldéhydes (MDA) marqueurs de la peroxydation lipidique et une absence d'effet sur l'inflammation. Ainsi, une HG aigue, provoquée ici par une forte dose de glucose (75 g), semble induire un stress oxydant systémique, responsable de l'altération de la relaxation eNOS-dépendante des vaisseaux via une limitation de son substrat. Toutefois, toutes les mesures réalisées au cours de cette étude sont systémiques. Il serait intéressant d'explorer les effets propres d'une HG aigue au niveau fonctionnel vasculaire, et plus particulièrement au niveau endothélial.

Comme nous l'avons décrit précédemment, les EOR sont capables d'altérer la voie du NO par différents mécanismes et notamment, via un découplage de l'enzyme eNOS. En effet, sur

des cellules endothéliales issues de veines ombilicales humaines (HUVEC), plongées dans un milieu hyperglycémique (30mM de glucose), une diminution du ratio dimère/monomère de la eNOS a été observée, en comparaison à des cellules issues d'un milieu normoglycémique (Zhu et al., 2012). Associé à cela, les auteurs ont noté une diminution de la production de NO ainsi qu'une augmentation de la production d'anion superoxide. Un traitement au propofol, un piègeur de peroxy-nitrite, normalise le ratio dimère/monomère ainsi que la production de NO et d'O₂^{•-}. De plus, l'incubation de cellules murines pendant 8h dans un milieu HG induit une diminution du ratio BH₄/BH₂, suggérant que l'HG aigue induit une oxydation du cofacteur essentiel de la eNOS (Crabtree et al., 2008). Ainsi l'HG semble induire un stress oxydant responsable du découplage de la eNOS, et donc de la diminution de la biodisponibilité en NO. Bien que ces études offrent des pistes, permettant la compréhension des mécanismes induits par une HG aigue sur la fonction endothéliale, leur validation in vivo au niveau de l'organisme entier est nécessaire. Ceci permettrait également de mettre en place des stratégies préventives. Ainsi, il nous a semblé intéressant, dans une première étude, **d'évaluer les effets de l'hyperglycémie aigue sur la fonction endothéliale. Une étude clinique nous a permis de mettre en évidence l'impact de boissons sucrées commerciales au niveau vasculaire chez des volontaires sains, et une étude expérimentale a été menée en parallèle afin de tenter d'éclaircir les mécanismes mis en jeu au cours de ce phénomène transitoire délétère.**

2.1.2. Hyperglycémie chronique

La répétition d'HG aiguës participe à l'installation progressive d'une HG chronique, caractéristique du diabète de type 2. L'HG chronique et l'insulino-résistance qui lui est généralement associée, altère la fonction endothéliale via différents mécanismes.

L'hyperglycémie, par différents mécanismes, engendre la formation d'une grande quantité d'EOR, qui aura notamment pour cible les cellules endothéliales. En effet, l'hyperglycémie entraîne une surproduction de diacylglycérol, à l'origine de l'activation d'une protéine kinase C (PKC). Celle-ci, en plus de favoriser la voie de l'ET-1 (Park et al., 2000), activerait la NADPH oxydase, enzyme majoritairement responsable de la production d'EOR au niveau de la paroi vasculaire (Brandes et Kreuzer, 2005). De plus, la chaîne mitochondriale serait particulièrement impliquée dans l'apparition d'EOR en condition d'hyperglycémie. Cette voie serait même majeure au sein de l'impact vasculaire délétère induit par une hyperglycémie (Nishiwaka et al., 2000 ; Suzuki et al., 2011).

Le glucose, en grande concentration dans les cellules, entraîne également une forte production de sorbitol par la voie des polyols (Oates et al, 2002). Cette réaction nécessite l'oxydation d'une molécule de NADPH. Ainsi, le taux de NADPH/NADP⁺ est diminué en présence d'une forte concentration de glucose, via la voie des polyol, ce qui va altérer la régénération du glutathion réduit (GSH) impliqué dans la régulation du stress oxydant cellulaire.

Le glucose est capable de réagir de façon non enzymatique avec différentes protéines, produisant ainsi des produits avancés de glycation (AGE : *advanced glycation end-products*). La formation de ces AGE entraîne des modifications irréversibles des fonctions des protéines ainsi transformées, conduisant à des altérations vasculaires importantes, qui accélèrent le phénomène d'athérosclérose et l'évolution du diabète. En effet, la fixation des AGE au niveau de la paroi vasculaire, notamment au niveau des fibres de collagène, leur permet d'interagir avec un grand nombre de récepteurs et donc de modifier un grand nombre de propriétés cellulaires. Ils piègent également les protéines plasmatiques, bloquent l'activité du NO, et initient l'oxydation des LDL (*low density lipoprotein*).

La grande différence entre l'impact vasculaire de l'hyperglycémie chronique et celui de l'HG aiguë, est l'augmentation de la perméabilité vasculaire, via l'interaction des AGE avec les CML. La fixation des AGE sur la paroi vasculaire stimule également l'expression de molécules pro-coagulantes, d'EOR et de VCAM-1, qui participent à l'expansion de la plaque athérosclérotique (Wen et al., 2002 ; Hink et al., 2003 ; Basta et al., 2004).

2.3. Impact de l'obésité sur la fonction endothéliale.

Le surpoids et l'obésité sont des facteurs de risques majeurs des pathologies cardiovasculaires. L'obésité est caractérisée par une expansion du TA, organe qui permet le stockage d'énergie sous forme de triglycérides, mais aussi doué d'une capacité sécrétrice endocrine qui lui permet d'agir à distance sur d'autres tissus via des molécules bioactives. Ainsi, le TA peut agir sur la sensibilité à l'insuline systémique, le métabolisme énergétique, la réponse immunitaire et l'homéostasie cardiovasculaire (Gu et al., 2013).

Le TA est la source principale de cytokines pro-inflammatoires, et chez les individus obèses, l'augmentation de l'infiltration des macrophages et de l'expression des facteurs pro-inflammatoires sont associés à une insulino-résistance et une dysfonction artérielle systémique (Apovian et al., 2008). Ces cytokines, agissent de manière endocrine et/ou paracrine notamment sur les cellules endothéliales. En effet, la forte production de MCP-1,

d'IL-8 et de RANTES favorise le recrutement et l'infiltration des monocytes, lymphocytes et neutrophiles à l'intérieur de la paroi vasculaire, entraînant une inflammation vasculaire (Libby et al., 2010) ; et les facteurs $TNF\alpha$, résistine et FABP limitent la production de NO et engendrent des dommages endothéliaux (Li et al., 2010).

Outre les effets délétères liés à l'augmentation des processus inflammatoires, l'accumulation de TA multiplie la sécrétion de substances actives adipocytaires, et entraîne des altérations vasculaires. Ces altérations sont liées à une dérégulation de la balance vasorelaxante/vasoconstrictrice maintenue par l'endothélium (Xu et al., 2012), qui participe à l'installation d'une insulino-résistance. La forte production AGL non estérifiés par le TA, entraîne une utilisation préférentielle des acides gras libres comme substrat énergétique, par les cellules insulino-sensibles, en inhibant le catabolisme du glucose (Randle et al., 1963). De plus, la forte production de $TNF\alpha$ et d'AGL favorise la voie MAPK/JNK médiée par l'insuline, ce qui entraîne un déséquilibre de la balance vasorégulatrice endothéliale, en faveur de l'action vasoconstrictrice de l'ET-1. Ces cytokines inhibent la voie PI3K/Akt via la stimulation d'une protéine kinase C, et l'inactivation des substrats IRS-1 et IRS-2. La PKC stimule également en parallèle la voie des MAPK renforçant ainsi l'action vasoconstrictrice de l'insuline (Shimomura et al., 1996 ; Potenza et al., 2009 ; Shulman et al., 2000) (**Figure 18**).

Le TA sécrète également des hormones telles que l'adiponectine et la leptine, qui possèdent des rôles physiologiques important notamment au niveau vasculaire. La leptine, dont le rôle principal est le contrôle de la satiété, participe à la régulation du tonus vasculaire. Pour cela, la leptine active au niveau de ces cellules endothéliales, la voie AMPK/Akt, responsable de l'activation de la eNOS via la phosphorylation de sa sérine 1177 (Procopio et al., 2009). En parallèle, cette hormone stimule le SNS et engendre une augmentation de la pression artérielle (Haynes et al., 1997) Ainsi, en condition physiologique, la leptine n'a pas d'impact sur le tonus vasculaire et donc sur la pression artérielle (Beltowski et al., 2012). En condition d'obésité ou de SMet, l'activation de la eNOS par la leptine est limitée, alors que l'activation du SNS est maintenue, ce qui favorise une vasoconstriction pathologique (Beltowski et al., 2012).

L'adiponectine est l'une des adipokines les plus abondamment produite et sécrétée par les adipocytes (Arita et al., 1999), mais contrairement aux autres cytokines, en condition pathologique, sa production est réduite, ce qui engendre des désordres cardiométaboliques, telles que le l'hypertension artérielle, l'infarctus du myocarde et les dysfonctions



endothéliales (Zhu et al., 2008 ; tan et al., 2004 ; Chow et al., 2007). Des études longitudinales sur différents types de populations ont montré qu'une faible concentration d'adiponectine est un facteur de risque indépendant pour ces pathologies (Xu et al., 2012). L'hypoadiponectinémie a notamment un effet néfaste sur la balance vasoactive de l'insuline (Shimabukuro et al., 2003 ; Tsuchida et al., 2004). En effet l'utilisation de souris délétées pour le gène de l'adiponectine permet de mettre en évidence son rôle dans l'installation d'une pathologie métabolique associée à une dysfonction endothéliale. En effet, ce modèle de souris transgéniques présente une obésité, une hypertension artérielle, une hyperglycémie chronique, accompagnée d'une diminution de la réponse endothéliale aortique (Ouchi et al., 2003).

Ainsi, l'obésité caractérisée par une augmentation de la masse adipeuse, semble participer à l'installation de dysfonctions endothéliales, en lien étroit avec le développement d'une insulino-résistance. Ces deux facteurs, qui sont à l'origine d'une augmentation de l'activité du SNS, semble donc être impliqués dans le développement d'une hypertension artérielle, chez le sujet souffrant d'un syndrome métabolique (Tentolouris et al., 2006, Grassi et al., 2007).

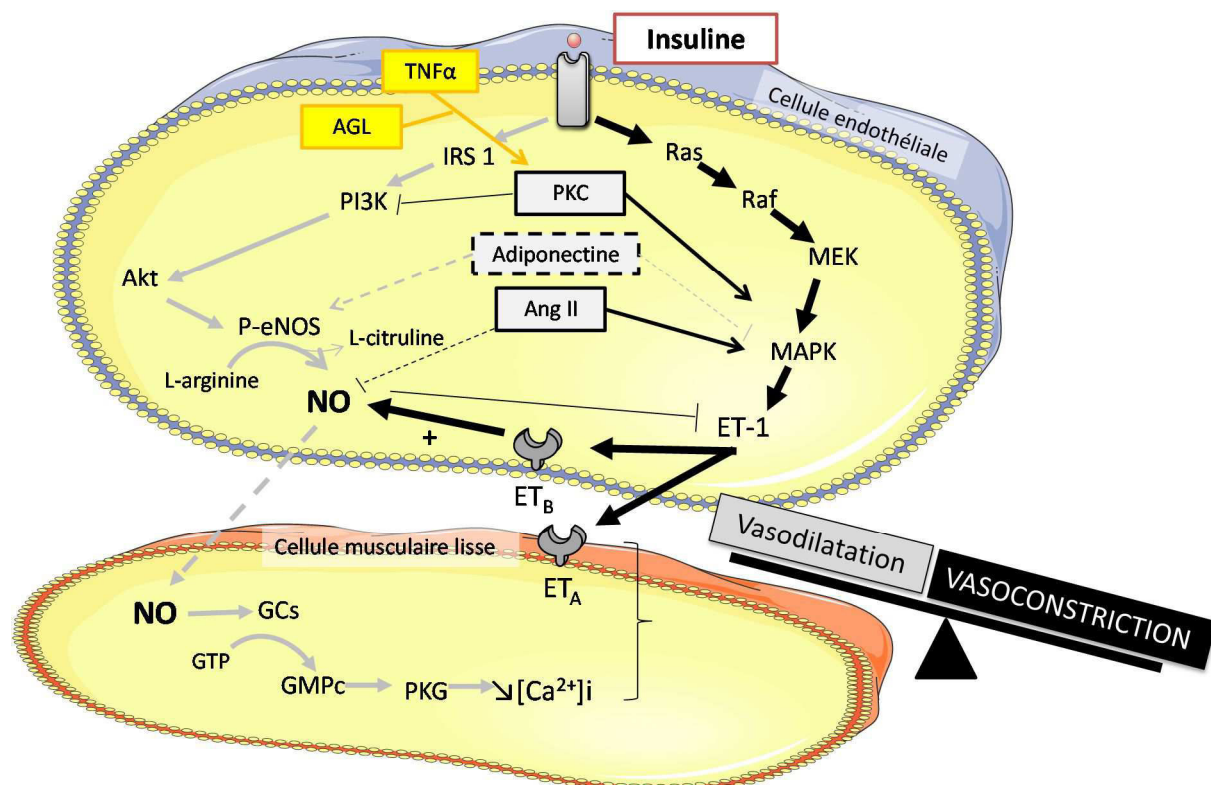


Figure 17: Altération des voies de signalisation endothéliales de l'insuline dans un contexte d'obésité.

IRS1 : *insulin receptor substrate 1* ; TNF α : *tumor necrosis factor α* ; AGL : acides gras libres ; PKC : protéine kinase C ; Ang II : angiotensine 2 ; ET-1 : endothéline 1 ; ET $_A$ et ET $_B$: récepteur à l'endothéline ; GTP : guanosine triphosphate ; GMPc : guanosine monophosphate cyclique ; PKG : protéine kinase G.

2.4. Impact du syndrome métabolique sur le système nerveux sympathique.

De nombreuses études suggèrent, que le SNS joue un rôle important dans le développement du syndrome métabolique et notamment au niveau des altérations cardiovasculaires. En effet, une sur-activation du SNS entraîne une hypertrophie cardiaque ainsi que des dysfonctions endothéliales (Grassi et Seravalle, 2006).

Chez l'individu atteint d'obésité, la sensibilité des barorécepteurs est diminuée et le ratio LF/HF (*low frequencies/high frequencies*) définissant la variabilité de la fréquence cardiaque (HRV) est considérablement augmenté (Skrapari et al., 2007). La quantité de masse adipeuse serait d'ailleurs corrélée à la sensibilité des barorécepteurs (Beske et al., 2002), ainsi qu'à l'activité sympathique au niveau musculaire (Alvarez et al., 2002 ; Grassi et al., 1995). On observe également une plus large proportion de récepteurs β_3 -adrénergiques au niveau du TA, responsable d'une suractivation de la lipolyse (Busetto et al., 1993). L'activité du SNS serait également stimulée par une forte production d'AGL, (Paolisso et al., 2000 ; Gadegbeku et al., 2002).

Bien que les mécanismes ne soient pas vraiment clairs, il semblerait qu'une suractivation du SNS participe à l'installation d'une insulino-résistance (Mancia et al., 2007). En effet, l'hyperactivité sympathique, est associée à une baisse de la libération d'insuline associée à une forte production du glucose hépatique (Nonogaki et al., 2000 ; Fehm et al., 2006).

L'hyperactivation sympathique est également impliquée dans les effets pathologiques liés à l'hypertension artérielle, via l'augmentation de la fréquence cardiaque, des résistances vasculaires périphériques et de la rétention rénale en sodium (Grassi et al., 2006). Cependant, il apparaît chez certains sujets obèses ou souffrant d'un syndrome métabolique, que l'hyperactivité sympathique n'est pas toujours associée à des modifications du tonus vasculaire et de la PA (Huggett et al. 2004; Agapitov et al. 2008). En condition physiologique, l'endothélium par la synthèse de facteurs vasoactifs, et notamment du NO, assure un équilibre dans la régulation du tonus vasculaire et joue, par conséquent, un rôle important dans le contrôle de la pression artérielle. De façon intéressante, il a été rapporté dans un contexte d'obésité, une hypo-réactivité vasculaire face à une stimulation adrénergique. Cette hypo-réactivité pourrait être liée à une forte production compensatrice de NO au niveau de l'endothélium (Jerez et al. 2012). **Au cours de notre étude n°2, nous nous sommes donc intéressés chez un modèle de rat nourrit avec un régime riche en graisse et en sucre à la**

modulation du tonus vasculaire en réponse à un stress adrénérgique et au rôle potentiel de cette réponse sur la régulation de la pression artérielle.

3. INFLUENCE DU PVAT SUR LA FONCTION VASCULAIRE AU SEIN DES PATHOLOGIES CARDIOMETABOLIQUES.

Comme précédemment décrit, le PVAT est un nouvel acteur de la régulation de la fonction endothéliale. De plus, sa nature adipocytaire lui conférant une fonction potentiellement pro-inflammatoire, en fait une cible intéressante quant à la compréhension des mécanismes vasculaires dysfonctionnels, dans le cadre de pathologies cardiométaboliques.

En situation non pathologique, le PVAT semble avoir un rôle plutôt protecteur des vaisseaux et de l'homéostasie vasculaire. Cependant, dans les pathologies métaboliques, le phénotype de ce PVAT est modifié, et ses fonctions vasculaires sont potentiellement délétères. Comme pour le tissu adipeux, l'obésité semble induire une augmentation de la masse du PVAT et une modification de son profil sécrétoire, activant ainsi des processus inflammatoires et oxydants, qui participent à l'apparition de dysfonctions vasculaires.

3.1. Augmentation de la masse du PVAT.

D'après les mesures réalisées par imagerie de résonnance magnétique sur des sujets sains, Rittig K et al. observent que la masse du PVAT de l'artère brachiale est corrélée à la masse du tissu adipeux viscéral ainsi qu'à la masse de TA hépatique (Rittig et al., 2008). Ils observent également une corrélation négative entre la masse de ce PVAT et la sensibilité à l'insuline des sujets, ayant tous des prédispositions à développer un diabète de type 2. Verlohren et son équipe quant à eux, rapportent chez un modèle de rat, un effet anti-contractile du PVAT d'artères mésentériques, plus ou moins important en fonction de la masse du PVAT ajouté dans la cuve à organe isolé (Verlohren et al., 2004). Ces études laissent supposer que la masse du PVAT est un facteur déterminant de l'homéostasie vasculaire.

Différentes études démontrent une augmentation de la masse du PVAT aortique sur des modèles de rats rendus obèses par un régime riche en lipides (high fat diet) (Ma et al., 2010 ; Ketonen et al., 2010), et également une augmentation de la masse du PVAT d'artères mésentériques sur des souris atteintes de syndrome métabolique (New Zealand obese)

(Marchesi et al., 2009). L'excès de PVAT au niveau de l'aorte thoracique, malgré l'absence d'augmentation marquée du TA viscéral, favorise la diminution du taux d'HDL et augmente la prévalence des pathologies cardiovasculaires telles que l'hypertension artérielle et la calcification coronarienne et aortique (Britton et al., 2012, Lehman et al., 2010).

Le PVAT serait également, dans certains cas, un excellent prédicteur des pathologies vasculaires (Owen et al., 2013). En effet, ces auteurs décrivent une corrélation positive entre la masse du PVAT épicardique et le développement de dysfonctions coronariennes associées au diabète ou à l'obésité. De plus, le PVAT situé au niveau du sinus rénal serait corrélé au risque d'atteinte de microalbuminurie (Wagner et al., 2012), et la prescription médicamenteuse pour les problèmes d'hypertension du stade 2 serait établi en fonction de la masse de ce TA (Chughtai et al., 2010).

3.2. Modification du profil sécrétoire du PVAT

L'augmentation de la masse adipocytaire dans le cadre de l'obésité, s'accompagne d'un accroissement de la lipolyse adipocytaire. Celle-ci serait liée à une infiltration accrue des macrophages au sein des adipocytes, responsable du phénotype pro-inflammatoire des adipocytes (Kosteli et al., 2010). Les cellules adipeuses du PVAT ne font pas exception, et les agents pro-inflammatoires produits par le PVAT pourraient jouer un rôle néfaste sur la fonction endothéliale vasculaire. La très belle étude de Greenstein, illustre ce phénomène. En effet, sur des artères humaines (glutéeale sous cutanée) de patients obèses, ils montrent une altération de la relaxation endothélium-dépendante, restaurée à l'aide d'un inhibiteur de $\text{TNF}\alpha$ et d'IL-6 (Greenstein et al., 2009). D'autres études retrouvent une augmentation de ces facteurs pro-inflammatoires au sein de différents types de PVAT, et également une augmentation de la production de molécules d'adhésion (VCAM1, PECAM1, ICAM1) au niveau d'artères mésentériques de souris obèses, responsables d'altérations vasculaires (Marchesi et al., 2009). L'étude du profil inflammatoire de différents tissus adipeux révèle que le PVAT sécrète d'avantage de cytokines pro-inflammatoires que les autres (TA sous cutané et périrénal), en condition basale sur des adipocytes de souris. Ce phénomène serait exacerbé par un régime riche en gras et en sucre, suggérant que le PVAT joue potentiellement un rôle majeur dans l'atteinte inflammatoire du tissu artériel conduisant à l'athérosclérose (Chatterjee et al., 2009).

Les effets vasculaires de la leptine sont peu décrits, et nécessitent davantage d'investigations. Une étude s'est intéressée à l'implication de cette hormone issue du PVAT de coronaires, sur la fonction endothéliale. Celle-ci révèle que dans le cadre d'un syndrome métabolique établi, la leptine serait capable d'inhiber l'activité de la eNOS en phosphorylant son site inhibiteur, la thréonine 495, via l'activation d'une PKC, (Payne et al., 2010).

Contrairement à la leptine, le rôle vasoactif de l'adiponectine a suscité davantage d'intérêt, notamment, dans le cadre de l'étude de la biocommunication entre le PVAT et le tissu artériel. En condition pathologique, comme sa concentration plasmatique, la production d'adiponectine par le PVAT est diminuée (Meijer et al., 2013; Li et al., 2015). Ce phénomène serait corrélé à une augmentation de la production d'EOR par la NADPH oxydase (Antonopoulos et al., 2015), et serait également en lien avec l'installation d'une insulino-résistance. En effet, la vasorelaxation insulino-dépendante au niveau d'artère de résistance musculaire de souris diabétiques (db/db) disparaît, et ce phénomène est associé à une diminution de la sécrétion d'adiponectine par le PVAT des artères mésentériques. En effet, lorsque cette hormone est supplémentée dans les cuves d'organe isolé, la relaxation est restaurée. Cette inhibition de la relaxation insulino-dépendante serait liée à une stimulation de la voie JNK (Meijer et al., 2013).

Le stress oxydant semble également jouer un rôle prépondérant au niveau des dysfonctions endothéliales dépendantes du PVAT. Il est bien décrit que l'obésité induit une dérégulation du système rénine-angio-tensine (RAS), caractérisé par une augmentation de la concentration en Ang II circulante (Lastra et al., 2006). Or cette hormone est responsable de l'activation de la NADPH oxydase, source majoritaire de stress oxydant vasculaire sous forme d'anion superoxide et de peroxyde d'hydrogène (Nguyen et al., 2013). Ce processus, bien que largement décrit au niveau du tissu adipeux de manière générale, n'a été montré que récemment au niveau de différents types de PVAT (Ketonen et al., 2010; Marchesi et al., 2009), accompagné d'une diminution de l'activité du système anti-oxydant (Marchesi et al., 2009, Ketonen et al., 2010, Rebolledo et al., 2010). Ce stress oxydant au niveau du PVAT altère la voie eNOS/NO en limitant la biodisponibilité de l'agent vasodilatateur, comme nous avons pu le décrire précédemment, engendrant une perte des effets anti-contractiles du PVAT, ainsi qu'une altération de la relaxation endothélium-dépendante.

3.3. Quelle place pour le NO?

Comme nous avons pu le voir précédemment, la voie de production du NO joue un rôle essentiel dans la régulation de la fonction vasculaire. La diminution de sa biodisponibilité est fortement impliquée dans l'installation des complications cardiovasculaires liées aux pathologies métaboliques. Son rôle prépondérant dans la régulation des processus hémodynamiques favorisant le métabolisme énergétique au sein des différents tissus, a forcé l'intérêt de son action au sein du tissu adipeux. Par ailleurs, le NO semble aussi pouvoir agir sur de nombreuses cibles cellulaires, notamment par S-nitrosylation, et ainsi modulé directement le métabolisme cellulaire (Chouchani et al., 2013).

3.3.1. Au sein du tissu adipeux :

De nombreuses études rapportent ainsi l'expression de eNOS et de iNOS au sein d'adipocytes de rats (Ribière et al., 1996) et d'humains (Elizalde et al., 2000 ; Gaudiot et al., 2000). Le NO est essentiel à la régulation de nombreux processus au sein des adipocytes, mais son action dépend de son site et de son niveau de production, ainsi que de son interaction avec d'autres molécules (**Figure 18**). En effet, en condition physiologique la eNOS produit de faible taux de NO (nM), tandis que la iNOS favorise une forte production de ce gaz (μM), et l'expression de celle-ci est stimulée notamment par $\text{TNF}\alpha$ (Stamler et Meissner, 2001 ; Pilon et al., 2004).

Le NO possède un rôle essentiel au sein du tissu adipeux lorsqu'il est produit en proportion physiologique. Sur des souris n'exprimant pas le gène de la eNOS il a été observé une augmentation de leur masse corporelle associée à une insulino-résistance, et au niveau adipocytaire, une diminution de l'expression d'UCP-1, de $\text{PPAR}\gamma$, et du nombre de mitochondries, résultant d'une diminution de la dépense énergétique (Nisoli et al., 2007)..

L'action du NO au sein de ces cellules adipeuses serait principalement liée à l'activation d'une AMP-Kinase (AMPK), via une PKG stimulée par le GMPc (Jobgen et al., 2006). En effet, l'activation de cette AMPK par le NO permettrait d'augmenter l'expression de $\text{PGC-1}\alpha$ (*PPAR γ co-activator-1 α*), principal régulateur de la biogénèse et de la fonction mitochondriale. Ce $\text{PGC-1}\alpha$ augmente notamment la β -oxydation et les défenses antioxydantes mitochondriales, ainsi que l'expression d'UCP1, dans les adipocytes bruns (Bossy-Wetzel et Lipton, 2003 ; Kelly et Scarpulla, 2004) et blancs (Clementi et Nisolli, 2005). De plus, le NO faciliterait l'absorption du glucose au sein des adipocytes en activant la

translocation des GLUT4 au niveau de la membrane plasmique, et ce dépendamment (Roy et al., 1998) et indépendamment de l'insuline (Tanaka et al., 2003). Cette AMPK activée permettrait également d'inhiber la synthèse de novo d'acides gras libres, et de favoriser leur oxydation et leur transport dans les mitochondries (Tedesco et al., 2010). Ces différents mécanismes démontrent que le NO permet de préserver une insulino-sensibilité au niveau du tissu adipeux.

Le NO aurait également un rôle important dans la régulation de la masse adipeuse. En effet, une supplémentation en L-arginine, substrat essentiel à la formation de NO, permet de réduire la masse adipeuse de rats diabétiques (Zucker) (Fu et al., 2005 ; Wu et al., 2007), en augmentant notamment l'expression d'AMPK, et de PGC1 α . Ce phénomène pourrait également être expliqué par l'augmentation de l'expression d'UCP-1 (Jankovic et al., 2016).

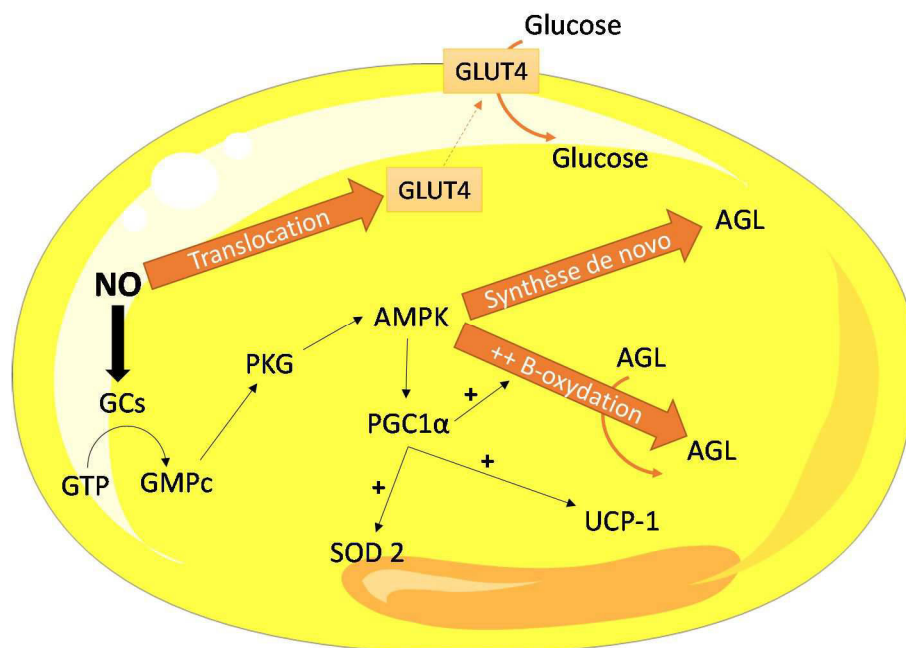


Figure 18 : Représentation de la voie du NO dans la cellule adipeuse.

GLUT4 : transporteur de glucose 4 ; NO : monoxyde d'azote ; GCs : guanylate cyclase soluble ; GTP : guanosine tri-phosphate ; GMPc : guanosine mono-phosphate cyclique ; PKG : protéine kinase G ; AMPK : adénosine monophosphate kinase ; PGC1 α : peroxisome proliferator-activated receptor co-activator 1 α ; SOD : superoxide dismutase ; UCP1 : uncoupling protein 1 ; AGL : acides gras libres.

3.3.2. Au sein du PVAT :

De nombreuses études ont évalué l'impact de différentes adipokines libérées par le PVAT sur l'expression et l'activation de la eNOS issue des cellules endothéliales (Lohn et al., 2002 ; Gao et al., 2007 ; Payne et al., 2008 et 2009 ; Sun et al., 2013 ; Virdis et al., 2014).

Mais très peu de travaux se sont intéressés aux effets vasculaires liés au NO produit par les cellules adipeuses du PVAT.

L'équipe de Xia a évalué l'influence vasculaire d'un PVAT de souris rendues obèses par un régime riche en gras (High Fat diet) de 20 semaines. L'étude confirme tout d'abord l'expression de eNOS et la production de NO dans le PVAT aortique de ces souris. Dans le PVAT de souris obèses, les auteurs observent une diminution de l'expression de cette protéine associée à une diminution de production de NO. Ils ne retrouvent cependant pas ces résultats au niveau des cellules endothéliales. Une augmentation de la production d'anion superoxide, dépendante de la eNOS a également été mesurée dans le PVAT HF, suggérant ainsi un découplage de cette enzyme (Xia et al., 2016) (**Figure 19**). Ainsi, le stress oxydant généré par une augmentation de la production d'anion superoxide et de la diminution de NO dans le PVAT, semble pouvoir participer à l'altération de la fonction endothéliale artérielle de souris obèses.

De manière intéressante, une étude similaire a été conduite par l'équipe de Gil-Ortega et al. mais avec un régime HF plus court (8 semaines) (Gil-Ortega et al., 2010). Les auteurs observent une amélioration de la relaxation endothélium-dépendante, associée à une surproduction de NO au sein du PVAT-HF. Ils notent également une hyperleptinémie chez ces souris HF, positivement corrélée à la production de NO au sein du PVAT, suggérant ainsi une stimulation de l'activité des NOS par la leptine. En effet, ceci a été démontré par Mehebig et al., la leptine activerait la eNOS exprimée par les adipocytes, via la phosphorylation de la serine 1179 et de la thréonine 497, grâce à des messagers tels que JAK2/PKA/MAPK (Mehebig et al., 2005). Ce phénomène n'est pas dépendant de la masse du PVAT, puisque sur des souris ob/ob, rendues génétiquement obèses par une déficience de production de leptine, le PVAT mésentérique contient peu de NO malgré une masse importante (Gil Ortega et al., 2010). A noter, qu'un traitement de ces mêmes adipocytes à la leptine permet d'augmenter considérablement leur production de NO.

Ainsi, il semblerait que lors de la phase précoce de l'installation de la pathologie, le PVAT pourrait jouer un rôle de compensation afin de prévenir l'installation de la dysfonction vasculaire mais, lors de l'évolution de la pathologie, contribuer au développement de la dysfonction endothéliale.

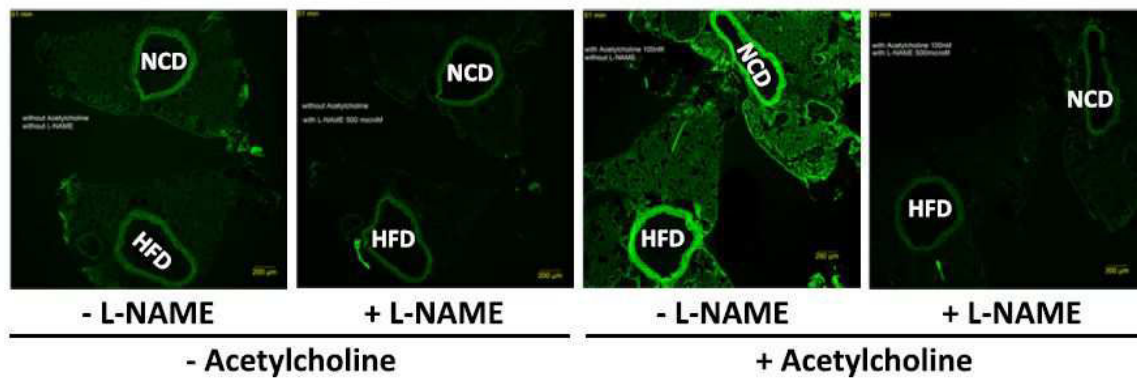


Figure 19: Production de NO par le TA, déterminée par 4,5-diaminofluorescein diacetate (DAF-2 DA). (Xia et al., 2015).

Bien que le nombre d'études traitant des effets du PVAT sur la fonction vasculaire en condition pathologique ait augmenté depuis quelques années, il reste encore beaucoup de mécanismes à explorer. En effet, la plupart des études se basent sur des corrélations cliniques, sans être capable de présenter des preuves physiologiques de la biocommunication entre le PVAT et les tissus vasculaires. De plus, l'hétérogénéité phénotypique du PVAT en fonction des territoires vasculaires, ainsi que la grande diversité des adipokines qu'il sécrète, offrent de nombreuses perspectives de recherche dans ce domaine.

Ainsi, malgré le peu de littérature disponible, il semble que ce tissu spécifique puisse jouer un rôle important dans le développement des complications cardiovasculaires. Faisant ainsi de ce tissu, une cible thérapeutique potentiellement intéressante.



Partie II - Ce qu'il faut retenir :

- ✓ Le stress oxydant joue un rôle clé dans l'apparition des dysfonctions endothéliales.
- ✓ L'hyperglycémie aigue induit des altérations transitoires de la fonction endothéliale, qui, à répétition, peut participer au développement de pathologies cardiovasculaires.
- ✓ L'obésité associée au syndrome métabolique est caractérisée par des complications cardiovasculaires initiées par une dysfonction endothéliale vasculaire chronique.
- ✓ L'obésité et l'insulino-résistance favorisent l'hyperactivité du système nerveux sympathique, qui est à l'origine d'une hypertension artérielle chez des patients atteints de syndrome métabolique. Pourtant, dans certains cas, aucune altération de la pression artérielle n'est observée.
- ✓ Le tissu adipeux périvasculaire semble pouvoir être un acteur non négligeable dans le développement des dysfonctions vasculaires en condition d'obésité.

PARTIE 3 : L'EXERCICE PHYSIQUE, UNE STRATÉGIE NATURELLE POUR AMÉLIORER LA FONCTION ENDOTHÉLIALE VASCULAIRE

L'exercice physique permettrait de réduire de plus de 30% le risque de pathologies vasculaires (Thijsser et al., 2010), en jouant sur les désordres métaboliques mais aussi en activant directement le système cardiovasculaire (Mora et al., 2007, Green et al., 2008). De nombreuses études démontrent que la pratique régulière, entraîne des adaptations structurelles, morphologiques et fonctionnelles des vaisseaux, permettant de prévenir les altérations vasculaires.

1. L'EXERCICE PHYSIQUE ET LA FONCTION ENDOTHÉLIALE.

La fonction endothéliale est caractérisée par sa capacité à répondre à différents stimuli. Lors d'un exercice aigu, plusieurs mécanismes entrent en jeu afin d'augmenter le flux sanguin nécessaire à l'apport croissant de nutriments, essentiels au fonctionnement musculaire. Les muscles en activité libèrent des métabolites vasoactifs, tels que les ions potassiques, l'adénosine ou bien encore le NO (Kobzik et al., 1994), qui vont agir au niveau des artérioles terminales à proximité. Le NO est transporté dans le sang en se fixant sur l'hémoglobine des globules rouges (Joyner et al., 1992 ; Gow et al., 1998), mais il peut aussi être produit directement au niveau des cellules endothéliales des artérioles terminales, grâce à une stimulation cholinergique-dépendante, *via* la libération de molécules d'ACh par un motoneurone (Segal et al., 1995). Cependant, ce mécanisme est insuffisant, et ne concerne que les petits vaisseaux à proximité des muscles en activité (Segal et al., 1992). La libération locale de ces métabolites permet l'ouverture progressive des vaisseaux de plus gros calibre par un mécanisme de proche en proche, conduisant à une augmentation du flux sanguin au niveau des gros vaisseaux. Les fortes contraintes de cisaillement (ou *shear stress*), induites par cet afflux sanguin au niveau des mécanorécepteurs de l'endothélium vont permettre une production de NO à l'origine d'une augmentation du calibre des vaisseaux (Zhang et al., 2009).

1.1 La eNOS, une cible clé de l'exercice physique.

L'exercice physique est reconnu comme étant un potentialisateur de la voie du NO notamment au niveau vasculaire, grâce au phénomène de *shear stress*, et ceci a été démontré au niveau de cultures cellulaires, de modèle animaux et également dans des études cliniques (Boo et al., 2002 ; Woodman et al., 1997 ; Hambrecht et al., 2003). Cet effet bénéfique de l'exercice physique passe par une augmentation de l'activation et de l'expression de la eNOS, et semble être lié principalement à l'augmentation du *shear stress* vasculaire.

- **Le *shear stress* stimule l'activation de la eNOS**

Les contraintes mécaniques imposées par le *shear stress* à la membrane plasmique des cellules endothéliales, sont transmises au reste de la cellule par les mécano-senseurs intégrines (Shyy et al., 2002). Cette mécano-transduction semble aboutir à l'activation du complexe VEGFR2/PI3K/Akt et ainsi à la phosphorylation de la eNOS sur son site activateur (sérine 1177)(Jin et al., 2005 ; Corson et al., 1996 ; Dimmeler et al., 1999). L'activation de la eNOS *via* la phosphorylation de ce même résidu serine par le *shear stress*, est également rapporté comme pouvant être lié à d'autres kinases telles que l'AMPK (senseur métabolique) et la PKA (senseur du stress adrénérgique) (Boo et al., 2003 ; Fulton et al., 1999).

- **Le *shear stress* stimule l'expression de la eNOS**

Le *shear stress* au niveau de la paroi vasculaire résultant de l'augmentation de débit cardiaque et vasculaire pendant l'activité physique, peut aussi être à l'origine d'une régulation transcriptionnelle de la eNOS. En effet, Davis et al. identifient la tyrosine kinase c-Src comme un acteur clé de l'augmentation du niveau d'ARNm de la eNOS au sein de cellules endothéliales en réponse au *shear stress* laminaire. La stimulation de c-Src entraîne l'activation de la voie Ras/Raf/MEK1/2 et ERK1/2, qui aboutit à l'augmentation de la transcription de la eNOS (Davis et al., 2003). Cette protéine kinase permet également de stabiliser ces ARNm afin de favoriser une production prolongée de eNOS en réponse au *shear stress* (Davis et al., 2001 et 2003). Ces mécanismes indépendants et complémentaires permettent de réguler à court- comme à long-terme l'expression de la eNOS au sein de l'endothélium pendant la période d'entraînement.

Le peroxyde d'hydrogène serait également un candidat capable de réguler l'expression de la eNOS ainsi que la stabilité de ses ARNm (Drummond et al., 2000), et ce mécanisme a été observé *in vivo* chez des rats entraînés (Lauer et al., 2005).

L'exercice favorise également l'activation de la eNOS *via* son cofacteur essentiel le BH₄. En effet il a été montré sur des cellules endothéliales en culture, qu'un *shear stress* laminaire active la GTPCH, protéine déterminante dans la régulation de production du BH₄, grâce à la phosphorylation de la serine 81 par une caséine kinase 2 (Widder et al. 2007). Sindler et ses collaborateurs, ont par la suite démontrés *in vivo* l'augmentation de BH₄ au sein de la paroi artérielle de rats entraînés (Sindler et al., 2009).

1.2. Amélioration des défenses antioxydantes par l'exercice : une autre manière d'augmenter la bio-disponibilité du NO.

La pratique régulière d'exercice physique est à l'origine d'une diminution du stress oxydant vasculaire. En effet, de nombreuses études rapportent que non seulement l'entraînement réduit la production d'EOR, mais il augmente également les capacités antioxydantes de l'organisme, et notamment au niveau de l'endothélium vasculaire (Miyazaki et al., 2001, Ristow et al., 2009, Oztasan et al., 2003, Navarro et al., 2004). Fukai et al. ont montré que l'exercice augmente l'expression des trois isoformes de SOD (CuZn-SOD, ec-SOD et Mn-SOD)(Fukai et al., 2000), permettant ainsi la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène. Ceci permet notamment de prévenir la réaction de l'O₂^{•-} avec le NO et ainsi d'augmenter la bio-disponibilité du NO (Bivalacqua et al., 2003).

L'activité physique répétée, permet également de limiter la production d'EOR, notamment, en réduisant l'expression des sous-unités de la NADPH oxydase, limitant ainsi son activité (Duerschmidt et al., 2006). De plus, chez des patients atteints de maladies coronaires ayant suivi un protocole d'entraînement curatif, il a été observé une réduction de l'expression des récepteurs à l'Ang II, AT-1, au niveau des cellules musculaires lisses des artères mammaires internes (Adams et al., 2005). Or la fixation de l'Ang II sur ses récepteurs au niveau de la paroi artérielle, active la production d'EOR *via* la NADPH oxydase (Tetsuro et al., 2011). L'exercice physique permet donc de limiter la production d'EOR, en augmentant les défenses antioxydantes vasculaires, et en réduisant l'activité de certaines protéines pro-oxydantes.

L'exercice physique améliore la fonction endothéliale de sujet sains en potentialisant la voie du NO et les défenses antioxydantes vasculaires. Il semble donc intéressant d'étudier comment l'exercice physique peut moduler les dysfonctions endothéliales induites par des troubles métaboliques aigus ou chroniques.

2. L'EXERCICE PHYSIQUE ET LES DÉSORDRES MÉTABOLIQUES

2.1. Exercice physique et Syndrome métabolique

L'exercice physique permet d'atténuer individuellement la plupart des troubles métaboliques qui caractérisent le SMet. En effet, l'exercice physique pratiqué de manière régulière, réduit les phénomènes inflammatoires, la pression artérielle, restaure la tolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline, et améliore le métabolisme musculaire (Golbidi et al., 2012 ; Roque et al., 2013). De plus, un protocole d'entraînement chez des sujets atteints de SMet permet d'améliorer la fonction endothéliale au niveau d'artères de conduit (Seligman et al., 2011 ; Da Silva et al., 2012 ; Lavrencic et al., 2000). Des études expérimentales permettent de confirmer ces résultats sur des artères de résistance (Arvola et al., 1999 ; Xiang et al., 2005 ; Sebai et al., 2011).

Ainsi, l'exercice physique est une bonne stratégie pour traiter et/ou prévenir les désordres métaboliques impliqués dans l'installation de maladies cardiovasculaires (Hamer et al., 2012) (**Figure 20**). Dans la suite de notre exposé, nous verrons plus en détail comment l'exercice permet d'impacter certains éléments caractéristiques du SMet, tels que l'hyperglycémie, l'hypertension artérielle, et l'obésité.

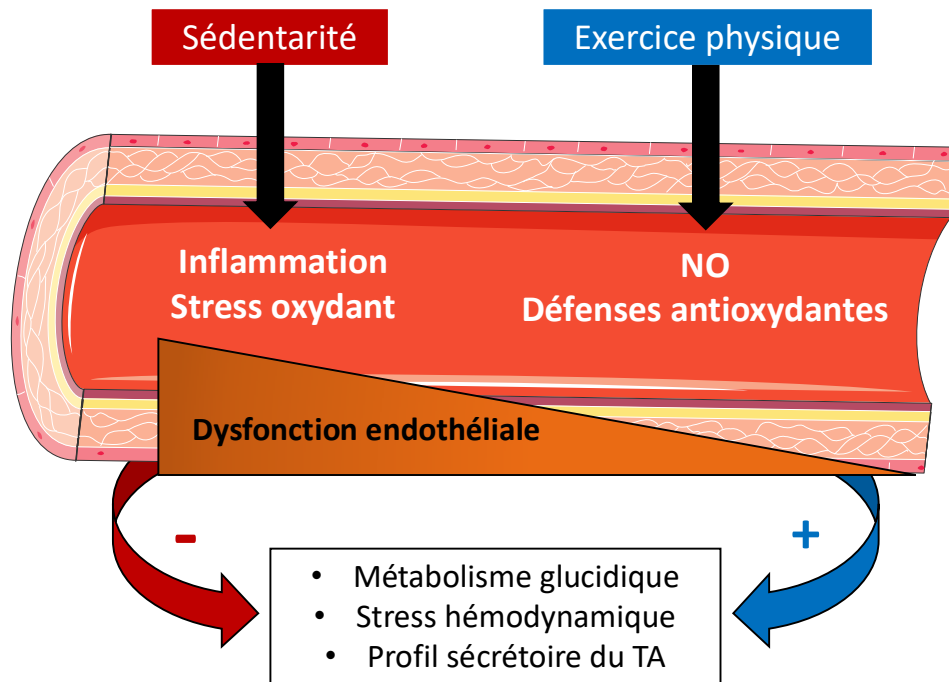


Figure 20 : Impact de l'exercice physique sur la fonction endothéliale en condition de SMet.

2.2. Exercice physique et régulation de la glycémie

L'exercice physique régulier a des conséquences bénéfiques sur le métabolisme glucidique. En effet, une méta-analyse réalisée sur des sujets diabétiques, rapporte que malgré le peu d'effet sur la masse corporelle globale, l'exercice physique régulier améliore le contrôle de la glycémie (Boulé et al., 2001 et 2003). En effet, il stimule l'expression des transporteurs GLUT 4 au niveau de la membrane des cellules musculaires, permettant ainsi d'augmenter la captation du glucose (Christ-Roberts et al., 2004 ; Wang et al., 2009). Ce mécanisme, à l'origine d'une réduction de la glycémie permet de limiter la production d'insuline par le pancréas, ou le besoin à l'apport exogène d'insuline chez des sujets diabétiques insulino-dépendants (Feyter et al., 2007). De plus, l'exercice physique augmente l'expression d'Akt (Christ-Roberts et al., 2004), favorisant ainsi la voie d'activation de la eNOS médiée par l'insuline, *via* IRS1 et PI3K (Sato et al., 2003 ; Sigal et al., 2004). Le senseur métabolique AMPK aurait un rôle non négligeable dans les effets bénéfiques de l'exercice physique (Sigal et al., 2004).

Enfin, deux études (Minato et al., 2000 ; Shima et al., 1997), démontrent que, grâce à la capacité de l'exercice physique à améliorer, d'une part la sensibilité des tissus à l'insuline, et d'autre part la régulation de la glycémie, celui-ci permet de préserver l'état de fonctionnement

des cellules β pancréatiques. Cependant, aucune étude n'a, à ce jour, pu mettre en évidence un effet direct de l'exercice physique sur le pancréas.

2.3. Exercice physique et système nerveux sympathique

Une dérégulation de l'activité du SNS, est un élément clé de l'apparition d'hypertension artérielle (Schlaich et al., 2004 ; Esler et al., 2016), d'infarctus du myocarde (Hogarth et al., 2006) et d'insuffisance cardiaque chronique (Floras et al., 2015 ; Kishi et al., 2011), pathologies responsables d'environ 45% de décès en Europe (Towsen et al., 2015). De nombreux traitements pharmacologiques sont utilisés, afin de limiter l'hyperactivité du SNS chez des patients atteints de pathologies cardiovasculaires (bêta-bloquants, inhibiteurs de l'enzyme de conversion du système rénine angiotensine, statines, inhibiteurs de cholinestérase, notamment)(Triposkiadis et al. 2009 ; Liggett et al., 2008), et également des techniques chirurgicales plus invasives (e.g. dénervation rénale, stimulation vagale, stimulation des barorécepteurs carotidiens)(Singh et al., 2013). Mais l'exercice physique apparaît comme une thérapie non pharmacologique naturelle très efficace, capable d'agir de manière globale sur tous les effets indésirables causés par une hyperactivité sympathique. En effet, il a été montré chez des patients atteints de complications cardiovasculaires, que l'exercice physique diminue la fréquence cardiaque (Myers et al., 2007 ; Pierpont et al., 2000), et également l'activité sympathique au niveau musculaire (Mimura et al., 2005 ; Notarius et al., 2015).

Bien que les mécanismes ne soient pas encore bien clairs, différentes pistes ont été décrites, expliquant comment l'exercice agit sur ce SNS. Notamment la réduction de la concentration plasmatique de noradrénaline, chez des personnes souffrant d'insuffisance cardiaque, après un protocole d'entraînement en endurance de 3 mois (Rengo et al., 2013), démontre l'impact bénéfique de l'exercice physique sur le SNS, chez des personnes souffrant d'hypertension artérielle ou d'insuffisance cardiaque. L'exercice physique semble également stimuler la production et l'activation de la nNOS au niveau du noyau paraventriculaire, responsable d'une diminution de l'activité du SNS (Patel et al., 2012). La diminution de la production de NO par la eNOS au niveau des tissus périphériques (Smith et al., 1996), et par la nNOS au niveau neuronal (Zhang et al., 1998), participent à l'installation de l'hypertension artérielle et donc de l'insuffisance cardiaque (Drexler et al., 1992). L'exercice physique

permet de restaurer le niveau de production de ce neurotransmetteur en stimulant les deux isoformes de l'enzyme, et notamment la nNOS au niveau de la carotide, favorisant ainsi la sensibilité des chémorécepteurs, délétères dans le cas d'insuffisance cardiaque (Li et al., 2008). L'exercice physique limite aussi l'action hypertensive de l'Ang II (Kumagai et al., 1994), en limitant l'expression de ses récepteurs AT1 au niveau du noyau paraventriculaire (Haack et al., 2014 ; Patel et al., 2012). Il permet également de limiter l'activité du RAS (Felix et Michelini, 2007 ; Kar et al., 2010).

La pratique régulière d'exercice physique est recommandée pour des personnes atteintes d'hypertension artérielle (Chobanian et al., 2003 ; Pescatello et al., 2004). Il permet de réduire les RPV (Cornelissen et al., 2005) et donc la PA (Cardoso et al., 2010). Des études cliniques et expérimentales montrent également qu'un entraînement en endurance permet d'améliorer la fonction vasculaire chez des sujets hypertendus (Joyner et al., 2009 ; Roque et al., 2013), notamment au niveau des petites artères. En effet l'exercice semble augmenter la capacité de relaxation endothéliale dépendante d'artères de sujets ou d'animaux hypertendus. (Higashi et al., 1999 ; Gunduz et al., 2011 ; Yang et al., 2011). Ce phénomène serait lié à une amélioration fonctionnelle de la voie eNOS/NO (Graham et al., 2004 ; Chen Hi et al., 1996).

L'effet bénéfique de l'exercice physique sur l'activité du SNS est également intéressant au niveau du tissu adipeux. En effet, ce tissu possède des récepteurs α et β -adrénergiques, dont la proportion régule l'activité lipolytique des adipocytes (Lafontan et al., 2003 et 2009). La stimulation des récepteurs α inhibe la lipolyse à l'inverse des récepteurs β qui l'active. (Mauriège et al., 1991 ; De Glisezinski et al., 1998). Il a été observé une augmentation de la proportion des récepteurs α -adrénergiques sur le tissu adipeux d'individus obèses, favorisant ainsi le stockage énergétique et la prise de masse adipeuse (Zouhal et al., 2013). L'exercice physique, en plus de favoriser la perte de masse grasse, modifie la sensibilité et l'expression des récepteurs adrénergiques au niveau du tissu adipeux, en favorisant la lipolyse. Ce phénomène a été observé après un protocole d'entraînement en endurance (Glisezinski et al., 2003 ; Richterova et al., 2004) et dynamique à haute intensité (Polak et al., 2005). Ces résultats démontrent l'importance de coupler un régime alimentaire et un protocole d'entraînement pour favoriser la perte de masse grasse chez des personnes obèses. En effet, sans effet de l'exercice physique, le tissu adipeux conserve ses propriétés anti-lipolytique, ce

qui favorise le reprise de masse adipeuse rapide après l'arrêt du régime alimentaire (Nicklas et al., 1997).

2.4. Exercice physique et Obésité

2.4.1. Quel est l'impact de l'exercice physique sur la masse du TA ?

L'exercice physique est reconnu comme une stratégie très intéressante pour lutter contre l'obésité (**Figure 21**). En effet, il influence la balance énergétique en faveur d'un déficit calorique, grâce à l'utilisation des différents substrats, glucidiques et lipidiques, pour le fonctionnement musculaire, et également grâce à la thermogénèse. Pourtant, un protocole d'entraînement régulier effectué par des personnes souffrant d'obésité ne permet pas une importante réduction de la masse corporelle. En effet, on observe chez des personnes en surpoids, une diminution de la masse grasse, compensée par une augmentation de la masse musculaire. Ainsi l'exercice physique chronique entraîne une modification de la répartition des masses, à l'origine d'une amélioration du métabolisme général (Boulé et al., 2001 ; Mourrier et al., 1997, Tuomilehto et al., 2001).

L'obésité se caractérise par une accumulation de TA de manière globale au sein de l'organisme. Cependant, en fonction de la localisation, ce tissu n'a pas le même impact biologique. En effet les dépôts adipeux dans la partie basse du corps (obésité glutéo-fémorale) sont peu néfastes pour l'organisme, alors que ceux situés dans le haut du corps (obésité abdominale ou viscérale) sont particulièrement délétères à cause de leur proximité avec les viscères. Et de manière intéressante, le TA viscéral, serait particulièrement impacté par l'exercice physique (Thomas et al., 2000 ; Schwartz et al., 1991).

La diminution de la masse adipeuse par l'exercice, s'apparente à une diminution de la taille des adipocytes, plutôt qu'à une diminution de leur nombre (You et al., 2006). En effet la régénération des adipocytes est assez longue, et requiert donc un protocole d'entraînement important dans la durée, comme ceux pratiqués par les sportifs de haut niveau.

Ainsi malgré une faible diminution du poids corporel total, l'exercice physique permet d'améliorer le métabolisme général, en diminuant la quantité de TA néfaste à l'organisme, et en augmentant la masse musculaire active métaboliquement et bénéfique à l'homéostasie vasculaire notamment.



2.4.2. Effets bénéfiques de l'exercice physique sur la dyslipidémie.

L'exercice chronique est bénéfique pour le métabolisme lipidique, il est même considéré comme étant l'une des meilleures stratégies non-pharmacologique de prévention ou d'atténuation de la dyslipidémie liée au diabète de type 2 (Gaede et al., 2003 ; Teixeira de lemos et al., 2009 ; Berg et al., 1994).

L'étude de Teixera-Lemos et al. montre chez des rats Zucker, privés génétiquement de récepteur à la leptine, qu'un entraînement chronique induit une diminution du cholestérol total et des triglycérides circulants (Teixeira de lemos et al., 2009). En effet, l'exercice semble notamment via une stimulation de la lipolyse, et une augmentation de la β -oxydation, diminuer la concentration de triglycérides dans le plasma, augmenter l'utilisation des acides gras libres circulants par les tissus, et améliorer le profil du cholestérol en réduisant la concentration de LDL et en augmentant celle des HDL (*high density lipoprotein*) (Goldhammer et al., 2007). Les muscles squelettiques sont touchés en priorité par un exercice chronique qui, en plus d'augmenter leur force et leur résistance, améliore leur métabolisme et notamment leur métabolisme lipidique. En effet, on observe une augmentation de la capacité oxydative musculaire, associée à une augmentation du nombre de capillaires et du nombre de fibres oxydatives. Toutes ces adaptations permettent aux muscles de mieux capter les acides gras libres circulants afin de les utiliser comme source énergétique, favorisant ainsi le profil lipidique sanguin (Luquet et al., 2005).

2.4.3. Influence de l'exercice physique sur le phénotype adipocytaire

L'un des aspects bénéfiques de l'exercice sur le métabolisme cellulaire est qu'il est notamment capable d'impacter le phénotype de certains adipocytes blancs en les rendant métaboliquement plus actif. Le tissu adipeux blanc sous-cutané (TAsc) est le TA le plus touché par ce phénomène appelé « beigisation » (« browning » pour les anglophones) (Enerback et al., 2009). Certains adipocytes de ce TAsc ont la capacité de se transformer en adipocytes bruns en réponse à différents stimuli, tels qu'une forte exposition au froid (Petrovic et al., 2009), une activation β adrénergique (Ishibashi et al., 2010) ou bien suite à un protocole d'entraînement physique en endurance (Stanford et al., 2015 ; Sutherland et al., 2009 ; Trevellin et al., 2014 ; Bostrom et al., 2012 ; Cao et al., 2011). Ces adipocytes dits adaptatifs, possèdent une signature moléculaire particulière (Wu et al., 2012), ils expriment d'avantage l'enzyme thermo-productrice UCP-1, et sont multiloculaires, à l'inverse des adipocytes blancs constitutifs du TA blanc (Enerback et al., 2009 ; Ishibashi et al., 2010).



Les adipocytes bruns ont tout d'abord été observés en grande quantité chez les animaux hibernant pour les protéger du froid pendant leur longue période de sommeil. Chez les humains, on retrouve des reliquats de ce tissu adipeux bruns, dispersés au niveau du tronc, à proximité des os (TA brun intrascapulaire, intercostal, cervical, et paravertébral principalement). Le rôle de ces adipocytes bruns est de produire de la chaleur grâce à la combustion d'AGL. La β -oxydation de ces AGL au sein des mitochondries permet d'augmenter le pouvoir réducteur de l'espace inter-membranaire mitochondrial, induisant la formation de molécule d'ATP et d'énergie sous forme de chaleur par l'enzyme UCP-1 (Villaroya et al., 2016). Les adipocytes bruns sont composés d'un grand nombre de mitochondries, caractérisées par une expression importante d'UCP-1, ce qui en fait un marqueur spécifiques de ces adipocytes.

Ainsi, certains stimuli sont capables d'induire un changement phénotypique des adipocytes. Un protocole d'entraînement de onze jours suffirait à induire une augmentation de l'expression d'UCP-1, ainsi qu'une amélioration de la vascularisation du TAsc (Stanford et al., 2015). Les mécanismes par lesquels l'exercice physique favorise ce phénomène de beigisation sont encore mal compris. Une hypothèse serait liée à la diminution de la taille des adipocytes et à leur contenu lipidique, qui a pour conséquence de réduire l'isolation thermique de l'organisme, qui pousse donc le TA à se métamorphoser pour produire d'avantage de chaleur (Nedergaard et al., 2014 ; Hirata et al., 2011). Des études ont également fait le rapprochement, entre l'augmentation de la stimulation adrénergique du TAsc sur des sujets entraînés, et l'augmentation de la beigisation de ce même tissu (Ranallo et Rhodes, 1998 ; Nedergaard et al., 2014). Un facteur neurotrophique dérivé de l'hypothalamus serait capable de stimuler les adipocytes adaptatifs, et quelques myokines, l'irisin (Bostrom et al., 2012), la meteorinlike (Feldman et al., 2006), et la β acide aminobutyrique (Ranallo et al., 1998) sont aussi proposées pour expliquer ce phénomène.

Au-delà d'une augmentation des protéines spécifiques du TA brun, au sein des adipocytes influencés par un exercice physique répété, certains auteurs rapportent une augmentation de l'activité mitochondriale. En effet, il a été rapporté au bout de huit semaines d'entraînement, une élévation de l'activité du cytochrome C de la CTM, associée à celle de l'acide tricarboxyle malate deshydrogénase, enzymes clés de l'activité mitochondriale (Stallknecht et al., 1991). Après onze jours d'entraînement, il a été observé une augmentation significative du taux d'O₂ consommé au niveau du TAsc, confirmant l'augmentation de l'activité mitochondriale (Stanford et al., 2015 ; Vernochet et al., 2012) ainsi qu'une

augmentation de la production d'ARNm de PGC1 α , marqueur de la biogénèse mitochondriale (Sutherland et al., 2009). Ceci suggère que la répétition d'exercice physique participe à un accroissement de la production de mitochondries au sein du TA.

La eNOS, une enzyme particulièrement impactée par l'exercice physique, serait également impliquée dans la biogénèse mitochondriale au sein du TA. En effet, sur des souris ayant nagé pendant trente jours, une augmentation de la production de PGC1 α , et d'autres marqueurs de la biogénèse et de l'activité mitochondriale (NrF1, TFAM, Cox4, ADN mitochondrial) sont observés, alors que ce phénomène est totalement abolit chez leurs homologues délété pour le gène de la eNOS (eNOS^{-/-}). Le même résultat est observé concernant la beigeisation du TA blanc sous-cutané (Trevellin et al., 2014).

Ainsi le TAsc possède une grande plasticité lui permettant de s'adapter rapidement à certains stimuli ou stress, dont l'exercice physique.

2.4.4. Comment l'exercice physique influence la sécrétion d'adipokines ?

La leptine est une hormone satiétante sécrétée par le tissu adipeux, capable de se fixer sur des récepteurs hypothalamiques afin de réduire la sensation de faim et d'augmenter la dépense énergétique. (Halaas et al., 1995; Oswai et al., 2010). Chez des individus en état d'obésité, la concentration circulante de cette hormone est accrue, ce qui entraîne une résistance à la leptine (Lonngvist et al., 1995; Morris et al., 2009). De plus cette cytokine influence l'inflammation tissulaire, puisqu'elle stimule la production de TNF α (Tilg et Moschen, 2006). Quatre (Gollisch et al., 2009) et sept (Sakurai et al., 2009) semaines d'exercice physique entraînent une diminution du niveau de leptine dans le tissu adipeux blanc viscéral et sous cutané de souris. Bien qu'on ne retrouve pas les mêmes résultats chez des patients atteints d'obésité, de nombreuses études montrent un effet bénéfique de l'exercice physique sur la leptinémie (Ishii et al., 2001 ; Polak et al., 2006). Cet effet semble fortement corrélé à la masse de TA viscéral, cependant les effets de l'exercice physique serait indépendant de la diminution de la masse du TA (Reseland et al., 2001 ; Berggren et al., 2005).

La concentration de TNF α est fortement élevé au sein du TA blanc de personnes atteintes d'obésité (Qi et Pekala, 2000 ; Cawthorn et Sethi, 2008). La concentration de cette cytokines au sein du TA blanc viscéral est fortement corrélé avec l'indice de masse corporel et l'insulinémie (Hotamisligil et al., 1995). En effet le TNF α inhiberait le substrat du

récepteur à l'insuline IRS-1 au niveau des cellules musculaires et adipocytaires, ce qui aurait pour conséquences de réduire l'expression des transporteurs de glucose et de limiter la production d'adiponectine, l'un comme l'autre participant à l'installation d'une insulino-résistance (Hotamisligil et al., 1994 ; Maeda et al., 2001). On a observé chez des souris rendues obèses par un régime riche en lipides pendant six mois, une diminution de l'expression de TNF α au sein du TA blanc viscéral, suite à un protocole d'entraînement de 6 semaines (Bradley et al., 2008 ; Vieira et al., 2009). Cet effet est retrouvé dans d'autres études expérimentales (Sakurai et al., 2009 et 2005), cependant il existe des résultats contradictoires sur l'impact de l'exercice physique sur l'expression de TNF α . En effet certains travaux expérimentaux (Nara et al., 1999 ; Lira et al., 2009) ou cliniques (Bruun et al., 2005 ; Christiansen et al., 2009) rapportent une augmentation ou aucune modification du niveau de TNF α dans le TA blanc à la suite d'un protocole d'entraînement.

Il est classiquement établi que la concentration en **MCP-1** (monocyte chemotactic factor 1) est anormalement élevée chez des personnes atteintes d'obésité. Ces cytokines participent à l'installation d'une inflammation chronique en favorisant l'infiltration des macrophages au sein du TA. L'exercice physique répété semble avoir un effet bénéfique sur l'expression de cette cytokine dans le TA blanc sur des modèles murins obèses (Bradley et al., 2008 ; Vieira et al., 2009), mais ces résultats ne sont pas retrouvés lors d'explorations cliniques (Gollisch et al., 2008 ; Christiansen et al., 2010). Il est toutefois bien établi que le taux de MCP-1 circulant chez des individus obèses est diminué après un protocole d'entraînement régulier (Bruun et al., 2006 ; Berggren et al., 2005).

L'adiponectine est capable de stimuler l'oxydation des acides gras libres au sein du tissu adipeux, elle favorise l'absorption du glucose au niveau des muscles squelettiques, et elle inhibe la néoglucogenèse hépatique (Kadowaki et al., 2006). Elle possède également une capacité anti-inflammatoire, grâce à son effet inhibiteur sur l'expression de TNF α au sein des macrophages, et en augmentant la concentration de protéine anti-inflammatoire telle que l'interleukine 10 (Wolf et al., 2004). En condition d'obésité, l'expression d'adiponectine au sein du TA blanc, ainsi que sa concentration sanguine sont réduites, et ceci serait étroitement lié à l'installation d'une insulino-résistance (Kadowaki et al., 2006). Quinze semaines d'entraînement, associées à un régime hypocalorique, augmente l'expression d'adiponectine au sein du TA blanc sous cutané d'individu obèses (Bruun et al., 2006 ; Berggren et al.,



2005). On retrouve des résultats similaires chez des rats obèses entraînés sur tapis roulant durant neuf semaines (Miyazaki et al., 2010). Cependant, différentes études ne montrent pas d'effet de l'exercice physique sur la concentration plasmatique d'adiponectine chez des personnes en surpoids ou obèses, malgré une amélioration de l'insulino-résistance (Nassi et al., 2005 ; Hulver et al., 2002 ; Marcel et al., 2005). La concentration d'adiponectine plasmatique serait d'avantage impactée par la perte masse grasse que par l'exercice physique (Hulvert et al., 2002).

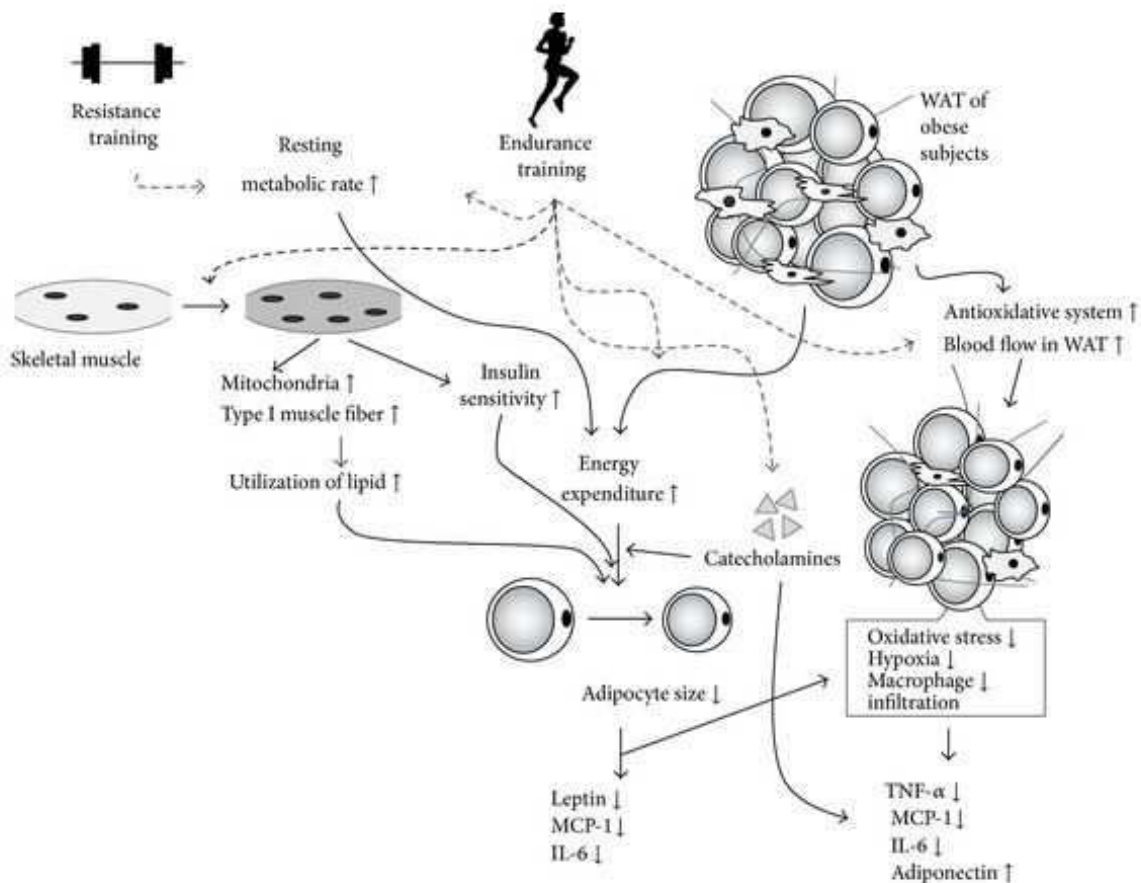


Figure 21 : Effets de l'exercice physique sur le métabolisme lipidique.

Adapté de Sakurai et al., 2013

MCP-1 : monocyte chemotactic factor-1 ; IL-6 : interleukine 6 ; IL-8 : interleukine 8 ; WAT : Tissu adipeux blanc ; TNF α : tumor necrosis factor alpha.

Ainsi, l'exercice physique améliore, de manière non négligeable le profil biologique du TA, et son impact métabolique sur la physiologie de l'organisme. À notre connaissance, une seule équipe s'est intéressée aux effets de l'exercice physique sur le PVAT d'artères coronaires de porcs dyslipidémiques, et celle-ci ne montre pas d'impact bénéfique de



l'exercice physique sur la bio-communication entre la fonction vasculaire et le PVAT (Reifenberger et al., 2007 ; Bunker et Laughlin, 2010). **Dans l'étude n°3 de ce travail de doctorat, en utilisant le même modèle de rat que dans l'étude n°2, nous nous sommes intéressés aux effets d'un protocole d'entraînement en endurance sur le PVAT et son impact potentiel sur la fonction vasculaire.**

Partie III- Ce qu'il faut retenir :

- ✓ L'exercice physique pratiqué régulièrement à intensité modérée permet de préserver et/ou de potentialiser la fonction vasculaire.
- ✓ Dans le cadre de pathologies cardiométaboliques, l'exercice physique améliore le métabolisme glucidique par la voie de l'insuline. Il favorise également le métabolisme lipidique.
- ✓ **L'exercice physique est une stratégie de prévention naturelle efficace contre les altérations vasculaires transitoires ou installées.**

OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THESE

L'ensemble des travaux réalisés dans ce travail de doctorat ont eu comme objectif d'évaluer **comment certains stress alimentaires, aigus ou chroniques, pouvaient impacter la fonction vasculaire, via notamment leurs actions sur la voie métabolique du monoxyde d'azote (NO)**. Afin de limiter ou de prévenir ces effets délétères, l'**exercice physique** a été utilisé comme stratégie thérapeutique non-pharmacologique dans l'ETUDE 1 et 3. Le tableau 1, résume brièvement les objectifs et la méthodologie utilisée au cours des trois études de ce travail.

Au cours de notre première étude, nous nous sommes intéressés aux effets d'une **boisson sucrée** sur la fonction vasculaire par une **approche translationnelle** allant d'un modèle d'observation clinique chez l'homme à un modèle expérimental de rongeur, permettant de mieux appréhender les mécanismes sous-jacents aux effets de l'hyperglycémie sur la fonction vasculaire (**ETUDE 1**).

La récurrence des hyperglycémies aiguës associée à une alimentation trop riche en gras, aboutit au développement de désordres métaboliques chroniques. Ceux-ci sont à l'origine de dysfonctions du système cardiovasculaire, aboutissant à une augmentation marquée du risque cardiovasculaire. Il nous a donc semblé, dans un deuxième temps, important d'étudier les effets d'un **régime riche en lipides et en glucides**, conduisant à l'installation d'un **syndrome métabolique (SMet)**, sur les désordres de la fonction vasculaire. Dans un premier temps, nous avons étudié les effets de ce régime sur la balance complexe entre l'hyperactivité du système nerveux sympathique, et l'installation d'une hypertension artérielle systémique (**ETUDE 2**).

Le **tissu adipeux périvasculaire (PVAT)** est apparu récemment comme un nouvel acteur potentiel de la dysfonction vasculaire, notamment dans le cadre de maladie métabolique. Néanmoins, l'impact de l'exercice sur le phénotype de ce PVAT et sur son impact fonctionnel sur la fonction vasculaire, demeure aujourd'hui non-élucidé. C'est pourquoi, dans une troisième étude de ce travail de doctorat, nous nous sommes intéressés à la **bio-communication** existante entre ces tissus en condition pathologique (SMet), et à l'impact de l'**exercice physique**, comme stratégie « naturelle » de protection du système vasculaire (**ETUDE 3**) (voir Tableau 1).

	ETUDE 1		ETUDE 2	ETUDE 3
Objectifs	Etude des effets d'une hyperglycémie aiguë sur la fonction vasculaire: approche translationnelle.		Etude des effets vasopresseurs liés à l'hyperactivité sympathique compensés par l'activité vasodilatatrice endothéliale, chez le rat SMet.	Etude de la biocommunication entre le PVAT et le tissu artériel, en condition de SMet.
	L'exercice physique a été utilisé comme stratégie thérapeutique naturelle contre les altérations induites par un stress alimentaire aigu (Hyperglycémie aiguë), ou chronique (SMet).			
Population	Etude clinique: 12 hommes (18-55 ans)	Etude expérimentale: Rats Wistars mâles ↓ SED EX	Rats Wistars mâles 6 sem 9 sem CTRL HFS HFS Ex SMet Prévention par l'exercice physique	
Protocoles	Evaluation in vivo du flux microcirculatoire cutané par LD/LSCI couplé à l'iontophorèse de drogues vasoactives Evaluation in vivo chez l'homme de la macrocirculation par test FMD/NMD Evaluation ex vivo: Etude de la vasoréactivité aortique + analyses biochimiques		Evaluation ex vivo de la réactivité vasculaire Etude de l'activité du SNS Analyses biochimiques	Evaluation ex vivo de la réactivité vasculaire +/- PVAT Analyses biochimiques

Tableau 1 : Résumé des différentes études réalisées au cours de ce travail.

SED : sédentaire ; EX : entraînés ; CTRL : contrôle ; HFS : High fat high sucrose ; PVAT : Tissu adipeux périvasculaire ; SMet : Syndrome Métabolique ; LD : Laser Doppler ; LSCI : Laser Speckle Contrast Imaging ; FMD : Flow-mediated dilation ; NMD : Nitrate-mediated dilation ; SNS : Système nerveux sympathique.

MATERIELS ET METHODES



I. POPULATIONS

Protocole Clinique de l'ETUDE 1:

Tous les participants ont signé un consentement écrit avant d'être inclus dans l'étude. Le protocole a été approuvé par le comité d'éthique de la recherche humaine de l'Université Catholique d'Australie de Melbourne. Cette étude est enregistrée dans les archives cliniques d'Australie et de Nouvelle-Zélande : #ACTRN12614000614695.

Protocoles Expérimentaux des ETUDES 1, 2 et 3 :

Tous les protocoles expérimentaux sont conformes aux Directives Parlementaires Européennes 2010/63/EU (N°CEEA-00322.03), et ont été approuvées par le comité d'éthique local (n° APAFIS#3487-2016010813443457).

Tous les animaux utilisés lors de ce travail ont été élevés dans des conditions constantes de température ($21^{\circ}\text{C}\pm 1$) et d'humidité ($60\%\pm 10$) avec des cycles de 12 heures de jour et 12 heures de nuit.

1.1. ETUDE N°1

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés aux effets de l'hyperglycémie aiguë sur la réactivité vasculaire. Nous avons pour cela réalisé une étude translationnelle avec une première étude clinique conduite en collaboration avec l'Université Catholique d'Australie à Melbourne, qui nous a permis d'évaluer les effets de la consommation de boissons sucrées sur la fonction vasculaire des lits macro- et microcirculatoire, chez des jeunes hommes en bonne santé. Par la suite, nous avons conduit au sein de l'université d'Avignon, une étude qui nous a permis d'explorer les mécanismes sous-jacents explicatifs de nos résultats cliniques, par l'utilisation de modèles expérimentaux animaux *in vivo* et *ex vivo*.

- Protocole clinique :

Ce protocole a été mené par Jordan Loader (Doctorant) et Guillaume Walther à l'Université Catholique Australienne (ACU) de Melbourne.

Douze hommes, âgés entre 18 et 55 ans, ne pratiquant pas plus de 2h/semaine d'activité physique et non-fumeurs, ont été recrutés au sein de l'université ACU. Le risque de



maladies cardiovasculaires, la prise ou la perte de poids de plus de 5% dans les 6 mois précédents, ainsi que l'utilisation de médicaments vasoactifs, était des critères d'exclusion de l'étude.

Les participants à jeun (depuis 20h la veille) se sont présentés au laboratoire d'exploration fonctionnelle cardiovasculaire à deux reprises à 8h, afin de réaliser deux tests randomisés (Visite A et B) en simple-aveugle, grâce à l'utilisation d'un générateur de séquence en ligne. Afin de standardiser les conditions d'expérimentations, chaque participant devait maintenir son niveau d'activité physique au cours de la période d'inclusion dans le protocole mais s'abstenir de réaliser un effort intense 48h avant les tests. Les volontaires ne devaient pas consommer d'alcool ou de caféine 12 heures avant chaque expérimentation. Lors du premier jour de test, les données anthropométriques et hémodynamiques ont été mesurées.

Une des deux boissons tests de 600mL (volume standard en Australie) était administrée aux participants, dans un contenant opaque afin d'éviter l'identification de la boisson. Lors de la visite A, les participants consommaient 600mL d'eau, et lors de la visite B, ils consommaient une boisson sucrée commerciale (cf. ETUDE 1). Les participants avaient cinq minutes pour consommer chaque boisson. Des mesures de glycémie ont été prises à différents temps au cours du protocole (**Figure 22**), afin de s'assurer que les mesures vasculaires étaient bien réalisées en condition d'hyperglycémie. La pression artérielle et la fréquence cardiaque ont également été mesurées durant chaque visite (**Figure 22**).

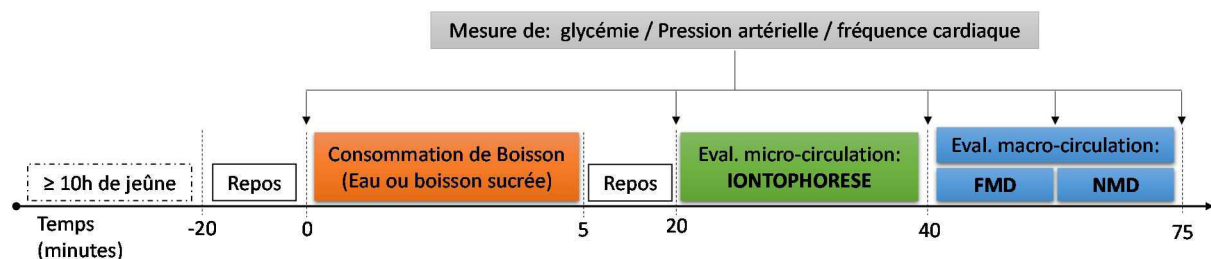


Figure 22 : Protocole clinique de l'ETUDE N°1.

- Protocole expérimental :

Pour cette étude, des rats Wistar mâles adultes âgés de 12 semaines (300 ± 50 g) (Laboratoire Janvier, France) ont été répartis aléatoirement en deux groupes pour l'évaluation *in vivo* de la fonction microvasculaire cutanée : un groupe de rats sédentaires (SED) et un groupe de rats entraînés (EX). Toutes ces manipulations ont été réalisées sur des animaux



anesthésiés (Pentobarbital sodique, 60mg.kg^{-1}), à jeun depuis la veille et placés dans une couveuse afin de maintenir leur température corporelle pendant les mesures.

Les animaux du groupe SED (N=23) ont été testés suivant quatre conditions différentes (**Figure 23**) :

- **NG : rats testés en condition normoglycémique**

Dans ce groupe, les animaux étaient traités avec une solution de NaCl à 0.9% (solvant de toutes les solutions utilisées au cours de ce protocole) par injection intra-péritonéale juste avant l'anesthésie, afin de standardiser le stress des animaux avant les expérimentations *in vivo*.

- **HG : rats testés en condition d'hyperglycémie aigue.**

Afin d'induire une hyperglycémie aigue, les rats HG ont reçu une injection intra-péritonéale de 40% de glucose (2g/kg de rat) juste avant l'anesthésie

- **HG- BH₄: rats traités avec le co-facteur essentiel de la eNOS, la tétrahydrobioptérine (BH₄), et testés en condition d'hyperglycémie aigue.**

Ce groupe a été conduit afin de mettre en évidence la responsabilité potentielle du découplage de la eNOS dans la dysfonction endothéliale causée par une hyperglycémie aigue. Pour cela les animaux ont été traités avec une solution de BH₄ (3.6mg.kg^{-1} , bolus de 1.5ml, i.p.), une heure avant l'hyperglycémie provoquée.

- **HG-NAC : rats supplémentés en N-Acétylcystéine (NAC), un antioxydant non spécifique, et testés en condition d'hyperglycémie aigue.**

Ce groupe nous a permis d'identifier le rôle du stress oxydant dans les dysfonctions endothéliales induites par une hyperglycémie aigue. Les animaux de ce groupe étaient donc traités avec une solution de NAC (50mg/kg , bolus de 1.5ml, i.p.), 48 heures et 1 heure avant l'induction d'hyperglycémie aigue. Ce traitement à préalablement était décrit au sein du laboratoire comme permettant de diminuer le stress oxydant en modulant notamment le niveau total de Glutathion.

Et dans le but d'évaluer les effets bénéfiques de l'exercice physique sur la fonction vasculaire en condition d'hyperglycémie aigue, nous avons conduit un groupe de rat entraîné (N=17), que nous avons testés en condition NG (**EX-NG**) et HG (**EX-HG**) uniquement (**Figure 23** conditions NG et HG). L'entraînement des rats a été réalisé sur un tapis roulant motorisé, 5 jours par semaine, pendant 5 semaines, à raison de 45 minutes par jour, à une



intensité de 70% de la vitesse maximale aérobie (25m.mn^{-1}). Les premiers tests *in vivo* étaient réalisés durant la quatrième et la dernière semaine d'entraînement.

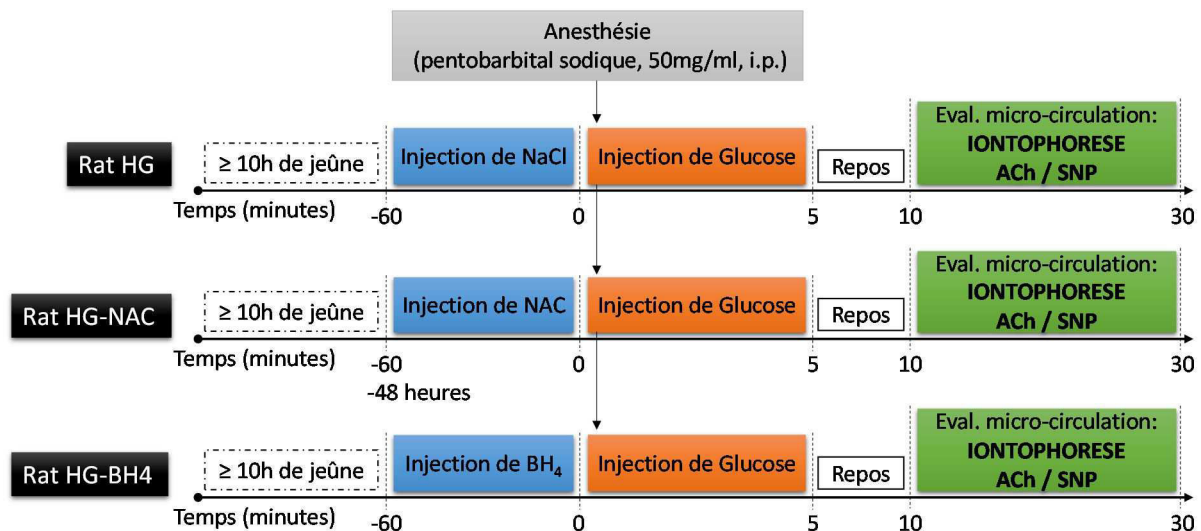


Figure 23 : Protocole expérimental de l'ETUDE N°1.

Au terme des tests *in vivo*, et en respectant un délai d'une semaine pour effacer de potentiels effets des différents traitements, les animaux étaient anesthésiés avec une injection de pentobarbital sodique (120mg/kg , i.p.), et recevaient une injection d'héparine (1000UI/kg , i.v.) afin d'éviter qu'un caillot sanguin ne se forme. Après une thoracotomie, le bloc cardio-respiratoire était prélevé et placé dans une solution de de Krebs-Henseleit (concentration en mM: 118 NaCl ; $4,7\text{ KCl}$; $1,2\text{ MgSO}_4$; $1,2\text{ KH}_2\text{PO}_4$; 25 NaHCO_3 ; 11 Glucose ; $2,5\text{ CaCl}_2$) froid. L'aorte des animaux a été prélevée et utilisée pour des tests de vasoréactivité dans des cuves à organe isolé (cf. Etude de la réactivité vasculaire aortique *ex vivo*, ETUDE N°1, p 96), ou congelées dans de l'azote liquide avant d'être conservées à -80°C pour des analyses biochimiques ultérieures (cf. Analyses Histologiques et Biochimiques, p 101).

1.2. ETUDE N°2

Un déséquilibre énergétique nutritionnel chronique est largement décrit comme étant à l'origine de trouble fonctionnel du système cardiovasculaire. L'objectif de l'ETUDE 2 était donc à partir d'un modèle de rats nourrit avec un régime riche en graisse et en sucre, de tenter de mieux appréhender l'origine et les conséquences de ces dysfonctions vasculaires. Ce régime est utilisé afin de tenter de mimer l'apparition d'un syndrome métabolique chez le rat.



Une semaine après leur arrivée au laboratoire, les animaux étaient aléatoirement répartis en 2 groupes :

- **Groupe contrôle (Ctrl)** : nourris avec un régime standard (A04, SAFE, France)
- **Groupe HFS (*High Fat High Sucrose*)** : nourris avec un régime enrichi en gras et sucre (230 HF, SAFE, France, complété avec de l'eau à 10% de sucrose à disposition) (**Tableau 2**).

Ces animaux ont été soumis à ce régime pendant 15 semaines. La nourriture et la boisson sucrée était changée trois fois par semaine.

-	Composition	Ctrl	HFS
Régime	Lipides (%)	3.1	35.8
	Protéines (%)	16.1	17.4
	Carbohydrates (%)	3.37	35
	Fibres (%)	3.9	0
	Minéraux (%)	4.5	5.8
	NFE (%)	59.9	33.3
	Vitamine A (UI/kg)	6600	20000
	Vitamine D3 (UI/kg)	900	2500
	Vitamine E (UI/kg)	30	175
Boisson	Saccharose (%)	-	10

Tableau 2: Composition nutritionnelle du régime HFS.

NFE: Nitrogen free extract = $100 - (\text{H}_2\text{O}) - (\text{Protéines}) - (\text{Lipides}) - (\text{Minéraux}) - (\text{Fibres})$.

Pendant les 15 semaines du protocole nutritionnel, un suivi de la masse corporelle, de la consommation de nourriture et de boisson a été réalisé. Le sang des animaux était prélevé et compartimenté dans des tubes secs ou héparinés pour la réalisation de bilan lipidique, d'analyse du taux circulant de catécholamines et d'insuline. Enfin, les tissus adipeux épидидymal et dorsal étaient prélevés et pesés afin de quantifier le degré d'obésité viscérale.

1.3. ETUDE N°3

Après avoir caractérisé l'impact métabolique et vasculaire d'un SMet induit chez le rat par un régime HFS, nous nous sommes intéressés à l'évolution du PVAT dans ce contexte pathologique. Par ailleurs, comment l'exercice peut constituer une stratégie efficace de protection a fait l'objet d'une attention toute particulière.



Ainsi, comme pour l'ETUDE N°2, nous avons utilisé une population de rats Wistar, que nous avons divisé en deux groupes : **Ctrl** et **HFS**, qui ont été soumis à leur régime respectifs pendant 15 semaines. Après six semaines de régime, les rats HFS ont été aléatoirement distribués en 2 groupes :

- Groupe HFS : rats HFS sédentaires
- **Groupe HFS-Ex** : rats HFS entraînés

Les animaux ont été soumis à un entraînement progressif permettant aux animaux d'évoluer plus facilement sur le tapis roulant, tout au long des 9 semaines d'entraînement.

Semaines	Echauffement		Exercice	
	Vitesse (m/mn)	Temps (mn)	Vitesse (m/mn)	Temps (mn)
1	10	5	15-18	30-40
2	10	5	18	40-50
3	10	5	18	50-60
4	15	5	18	60
5	15	5	20	60
6	15	5	20	60
7	15	5	22	60
8	15	5	22	60
9	15	5	22	60

Tableau 3: Protocole d'entraînement utilisé au cours de l'ETUDE N°3.

2. PARAMETRES PHYSIOLOGIQUES ET BIOLOGIQUES

2.1. Mesure de la pression artérielle

2.1.1. Protocole clinique de l'ETUDE N°1 :

Les pressions artérielles (PA) systoliques et diastoliques ont été mesurées à l'aide d'un sphygmomanomètre digital (Dinamap, GE Medical Systems, Milwaukee, USA). Les valeurs de pressions ont été exprimées en PA moyenne (en mmHg), calculée selon l'équation :

$$PA\ moyenne = \frac{(2 \times PA\ diastolique) + PA\ systolique}{3}$$



2.1.2. Protocole expérimental de l'ETUDE N°2 :

- **Principe de la mesure de pression artérielle « Tailcuff » :**

La pression artérielle était mesurée à l'aide du système CODA-2, selon une méthode non-invasive dite « Tailcuff » (Kent Scientific) (**Figure 24**). Deux brassards sont nécessaires, un premier brassard d'occlusion placé à la base de la queue, et un second placé de manière plus distale. Le premier brassard se gonfle à une pression supra-systolique (250 mmHg) afin de stopper la circulation sanguine au niveau de l'artère caudale, puis se dégonfle progressivement. Le second brassard capte les variations de flux sanguin en fonction du volume de la queue du rat. La pression systolique est automatiquement détectée lorsque la pression appliquée par le brassard d'occlusion ne suffit plus à bloquer la circulation sanguine au niveau de la queue. La pression diastolique est déterminée lorsque le volume sanguin n'augmente plus au niveau de l'artère caudale.

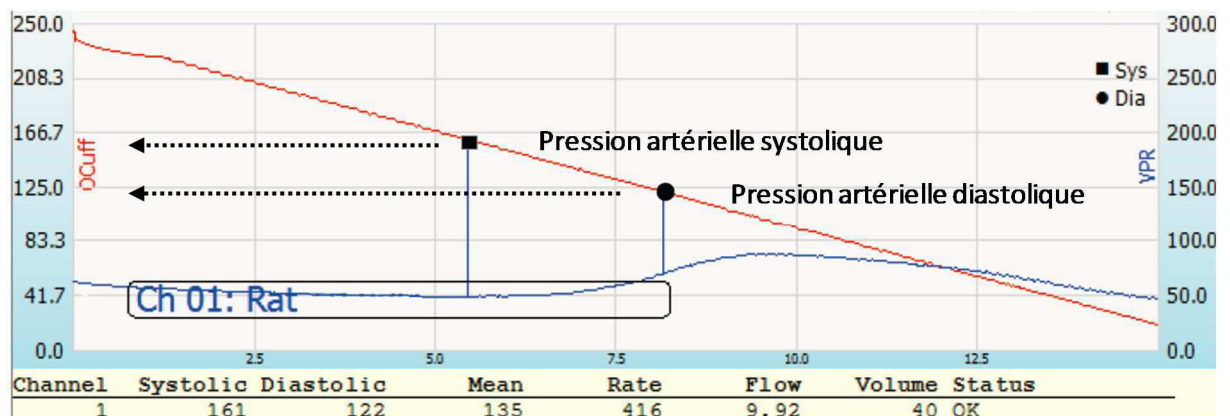


Figure 24. Exemple de rendu graphique affiché par le logiciel du système CODA lors d'une mesure de pression artérielle

- **Protocole utilisé :**

Quinze minutes avant chaque série de mesure, les rats ont été placés en couveuse à 37°C afin d'induire une vasodilatation périphérique, facilitant la mesure de la pression artérielle. Les rats étaient maintenus dans un tube de contention positionnés sur une plaque chauffante afin de conserver une température corporelle stable. Vingt-cinq cycles de mesures étaient réalisés sur chaque animal, les dix premières n'étaient cependant pas comptabilisées car elles étaient considérées comme une phase d'adaptation pour le rat. Les valeurs de pression systolique et diastolique obtenues étaient le résultat d'une moyenne d'au moins cinq valeurs de pressions.



Ces mesures ont été réalisées au cours de l'ETUDE N°2, pendant les semaines 13 et 14 du régime. Afin d'évaluer l'importance des NOS dans la régulation de la pression artérielle chez les animaux présentant un syndrome métabolique et chez des animaux sains, une dose de L-nitro-arginine méthyl-ester (L-NAME) (20mg.kg^{-1}) a été injectée par voie intra-péritonéale avant la réalisation d'une deuxième série de mesure.

2.2.Evaluation du contrôle de la glycémie.

2.2.1. Régulation de la glycémie chez l'homme

Au cours du protocole clinique de l'ETUDE 1, nous avons réalisé des mesures de glycémie grâce au système Freestyle Optium (Abbott Diabetes Care Ltd, UK). Les mesures ont été réalisées au temps 0, 20, 40, 60 et 75 mn (**Figure 22**).

2.2.2. Régulation de la glycémie chez le rat

- **Principe du test de tolérance au glucose.**

Ce test consiste à administrer une importante concentration de glucose à un individu et d'observer la capacité de l'organisme à réguler cette hyperglycémie. Cette régulation s'opère grâce à la fonction endocrine du pancréas capable de produire et de sécréter de l'insuline, et également grâce l'utilisation du glucose circulant par les organes périphériques, tels que les muscles squelettiques. Ainsi lorsque l'individu possède une bonne tolérance au glucose, la glycémie est rapidement contrôlée, tandis que chez un individu intolérant au glucose, le pic de glycémie est plus élevé et l'hyperglycémie est persistante.

- **Protocole**

Un jeûne de 18 heures était imposé aux animaux avant le test (19h00 à 13h00). Les prélèvements sanguins étaient réalisés sur la veine caudale, à l'aide d'une incision à l'extrémité de la queue. Un lecteur de glycémie (Caresens N ; I sens) a permis la mesure de la concentration de glucose circulant, tout d'abord à jeun, puis aux temps $t = 10, 20, 30, 60, 120$ minutes après l'hyperglycémie (2g/kg) induite par une injection intra-péritonéale.

2.2.3. Evaluation de l'insulino-résistance.

- **Principe du test de tolérance à l'insuline**

Le test de tolérance à l'insuline permet d'évaluer la capacité de l'insuline à stimuler la captation de glucose par les différents tissus insulino-sensibles, reflétant ainsi la sensibilité



tissulaire à cette hormone. En pratique, l'insuline est injectée par voie intra-péritonéale puis la glycémie est mesurée régulièrement afin de suivre son évolution. Chez un individu insulino-sensible, la glycémie est rapidement diminuée et mettra un certain temps à revenir à la normale, alors que chez un individu insulino-résistant la glycémie n'est que très faiblement diminuée, traduisant ainsi l'inefficacité de l'insuline.

- **Protocole expérimental**

Après une période de jeûne de 6 heures (8h00-14h00), une première prise de glycémie était réalisée sur la veine caudale grâce à une incision au niveau de l'extrémité de la queue. Ensuite les animaux recevaient une dose d'insuline correspondant à 2UI/kg (i.p.), puis la glycémie était mesurée toutes les 30 minutes pendant 210 minutes.

2.3.Evaluation de l'activité du système nerveux sympathique.

2.3.1. Enregistrement ECG et analyse de la variabilité de la fréquence cardiaque

Ce travail a été réalisé par le Dr Jérôme Thireau au sein de l'unité INSERM U1046.

- **Principe de l'analyse HRV**

Le rythme cardiaque n'est pas constant mais présente des fluctuations des intervalles (R-R) séparant deux battements autour d'une valeur moyenne, c'est ce que l'on appelle la variabilité de la fréquence cardiaque (HRV : *Heart Rate Variability*). Cette variabilité est expliquée par l'influence hormonale et celle du système nerveux autonome sur la fréquence cardiaque. En effet la fréquence cardiaque est la résultante de l'antagonisme des systèmes nerveux sympathique - cardio-accélérateur, et para-sympathique – cardio-décélérateur. La variabilité de la fréquence cardiaque diminue face à un stress physique par exemple et augmente en situation de repos.

Cette variabilité de la fréquence cardiaque est étudiée par deux méthodes, une basée sur le temps et l'autre sur la fréquence :

- La mesure basée sur le temps utilise une méthode géométrique ou statistique pour étudier la fluctuation cyclique des intervalles R-R et la déviation standard des intervalles R-R normalisés successifs (SDNN). C'est une méthode qui permet un calcul facile de la variabilité mais fournit des informations moins détaillées que l'analyse spectrale.



- La mesure basée sur la fréquence s'intéresse à la fluctuation cyclique des intervalles R-R en effectuant une analyse spectrale par transformée de Fourier. Cette analyse mathématique permet de discriminer, en fonction de leur fréquence, les différentes ondes qui composent le signal de variabilité de la fréquence cardiaque. Cette méthode d'analyse quantifie l'énergie spectrale en déterminant l'aire sous la courbe, mesurée en ms^2 , pour une fréquence donnée. Elle permet de distinguer la bande des basses fréquences (LF : *low frequencies*) qui est principalement le reflet de l'activité sympathique, et la bande des hautes fréquences (HF : *high frequencies*) qui témoigne de l'activité parasympathique.

Le rapport LF/HF peut être utilisé pour évaluer la balance sympatho-vagale du cœur.

• Protocole expérimental

Sous anesthésie générale, deux groupes de rats CTRL et HFS ont été équipés d'un transmetteur télémétrique ECG CA F40 (DSI, St Paul, USA). Ces rats ont ensuite suivis une période de repos de 8 jours. Le suivi ECG était réalisé grâce à un récepteur RCP-1 connecté à un système d'acquisition (Pnemah Physiology Platform, DSI). A l'aide de la plateforme Ponemah Physiology, les séries d'intervalles R-R étaient obtenues par un enregistrement simultané sur tous les animaux pendant une durée de 4 heures (8h-12h). Enfin, l'activité du système nerveux autonome exercée sur le cœur était évaluée grâce à la variabilité de séries d'intervalles R-R de l'ECG dans le domaine fréquentiel à l'aide du logiciel Kubios HRV.

2.3.2. Mesure de la concentration plasmatique des catécholamines.

Ces dosages ont été réalisés par Christian Legros et Frédéric de Nardi de l'unité CNRS UMR 6214/Inserm U1083.

La noradrénaline et l'adrénaline sont deux hormones sécrétées par les glandes médullosurrénales sous l'influence des fibres du système nerveux sympathique. La noradrénaline est également libérée par l'extrémité des terminaisons nerveuses des fibres post-ganglionnaires sympathiques et peut diffuser dans le compartiment sanguin. Les taux circulants de noradrénaline et d'adrénaline sont donc représentatifs de l'activité du système nerveux sympathique.

Afin de doser les catécholamines circulantes par HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), des prélèvements sanguins ont été fait sur des rats à jeûn ($\leq 6\text{h}$) lors du sacrifice des animaux. Le sang était alors centrifugé afin de récupérer uniquement le plasma, qui était stocké à -80°C jusqu'à la réalisation des analyses.



3. EXPLORATION *IN VIVO* DE LA MICROCIRCULATION CUTANÉE.

Cette technique indolore et non-invasive a été utilisée au cours des ETUDES 1 et 2, afin d'évaluer la fonction vasculaire microcirculatoire dans des conditions physiologiques. Les techniques de laser Doppler (LDF) et Laser Speckle Contrast Imaging (LSCI), ont respectivement été utilisées pour les études expérimentale et clinique. Lors des deux protocoles, cette mesure de variation du flux cutanée était couplée à une technique de diffusion transdermique de drogues vasoactives par iontophorèse.

3.1. Techniques d'exploration

Le Laser Doppler (Periflux PF5000, Perimed, Suède) permet l'étude de la microcirculation cutanée, grâce à l'émission d'un faisceau lumineux monochromatique qui traverse la peau sur un à trois millimètres de profondeur, jusqu'aux micro-vaisseaux. Les cellules en mouvements diffusent le faisceau incident avec une fréquence différente de celles des cellules immobiles, c'est l'effet Doppler (la différence de fréquence étant proportionnelle à la vitesse de déplacement des diffuseurs). Le laser Doppler permet donc l'enregistrement en continu de « l'hémodynamisme du territoire microcirculatoire exploré » (Nilsson et al, 1980).

Le Laser Speckle Contrast Imaging (PeriCam PSI System[®], Perimed, Järfälla, Suède) fonctionne sur le même principe, mais contrairement au LDF qui est déposé au contact de la peau et possède donc un espace de mesure très réduit (« single point », $\leq 1\text{mm}^3$, sur une profondeur comprise entre 1 et 1.5mm) associé à une fréquence d'acquisition importante (32 Hz), le LSCI est positionné à 15-20 cm du bras, et couvre une surface plus importante (plusieurs centimètres, sur une profondeur d'environ 300 μm) associée à une fréquence d'acquisition d'environ 18Hz. . Le flux sanguin cutané est mesuré en unité arbitraire (PU), grâce à une sonde thermostatique. En effet, la microcirculation telle qu'elle peut être observée à partir du spectre de fréquences de la lumière diffusée provient d'un ensemble de vaisseaux d'orientations très diverses, de sorte que la puissance du signal Doppler est globalement proportionnelle à la perfusion par unité de masse tissulaire, sans que l'on puisse en revanche déterminer avec précision la vitesse d'écoulement du sang dans un vaisseau donné.

Cette technique peut être couplée à plusieurs tests de vasoréactivité dont l'**iontophorèse de drogues vasoactives** (PeriIont, Perimed, Järfälla, Suède), permettant une évaluation globale des fonctions microvasculaires (Roustit et al., 2010). Le principe de l'iontophorèse consiste à faire passer des molécules ionisées à travers la peau grâce à une charge électrique locale



appliquée par des électrodes (**Figure 25**). La quantité de produit délivrée est proportionnelle à la charge du courant appliquée, correspondant à l'intensité du courant (en mA) multipliée par la durée d'application (en seconde). Les molécules infusées passent à travers la peau jusqu'aux micro-vaisseaux par diverses voies, comme les pores annexes, les follicules pileux, les canaux de transpiration et par des voies intercellulaires (Henricson et al., 2007).

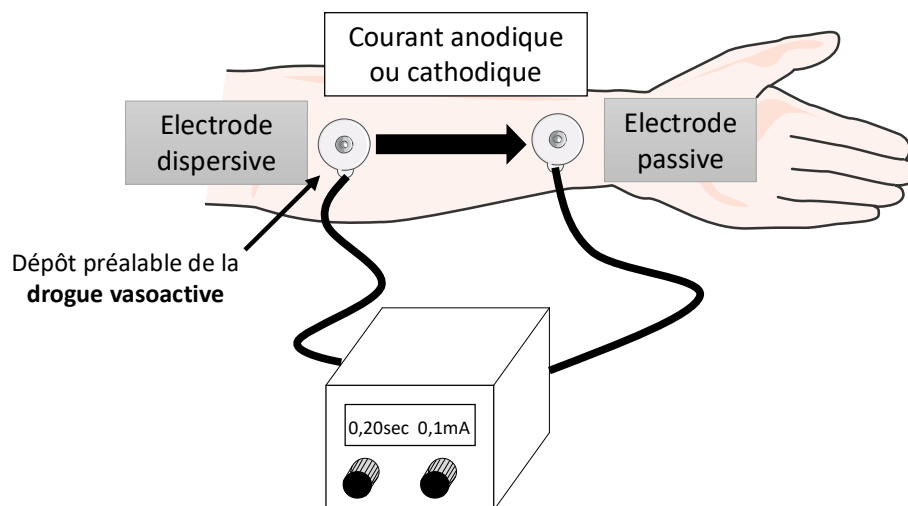


Figure 25 : Schéma du principe de la iontophorèse de drogues vasoactives.

Le courant appliqué diffère en fonction de la charge de la substance vasoactive testée, ainsi pour l'ACh chargée négativement, un courant anodique est appliqué, tandis que pour le SNP chargé positivement, un courant cathodique est alors utilisé.

3.2. Protocoles utilisés lors de l'ETUDE N°1 :

- **Protocole clinique :**

Les mesures microvasculaires ont été réalisées dans une pièce à température contrôlée (22-24°C), 15 minutes après la consommation des 600mL de boissons (eau ou boisson sucrée), permettant de mesurer la fonction vasculaire pendant le pic de glycémie. Excepté lors de la consommation de la boisson, les participants étaient allongés sur le dos durant toute la période des manipulations. La fonction microvasculaire a été évaluée sur la surface ventrale de l'avant-bras droit, grâce à l'utilisation d'un LSCI conjugué avec deux électrodes d'iontophorèse (**Figure 26A**). L'emplacement des électrodes devait être glabre et ne comporter aucune veine apparente ni être trop pigmentée. Une électrode dispersive était positionnée approximativement à 15 cm de l'électrode contenant les drogues à délivrer, permettant de former un courant électrique fermé facilitant la diffusion des molécules



vasoactives à travers la peau. Le bras était complètement immobilisé pendant la manipulation à l'aide d'un coussin à vide.

Après deux minutes d'enregistrement du flux sanguin à l'état basal, la mesure de la fonction endothélium-dépendante et -indépendante a été réalisée grâce à la diffusion en iontophorèse d'acétylcholine (2%), et de nitroprussiate de sodium (1%) respectivement. Des courants anodique de 0,02 mA pendant 200 secondes et cathodique de 0,02 mA pendant 400 secondes, respectivement ont permis de faire diffuser l'ACh et le SNP au niveau de l'avant-bras. Durant la période de repos et jusqu'à 20 minutes après le début de la iontophorèse, le flux microcirculatoire cutané a été enregistré (**Figure 26B**).

Les valeurs de flux sanguin sont des moyennes de données obtenues sur 30 secondes d'enregistrement pendant la phase de repos précédant l'iontophorèse, et pendant 5 sec pendant la phase de plateau maximale. Les données ont ensuite été exportées de manière anonyme vers Microsoft Excel et analysées a posteriori. Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'augmentation : $\text{Pourcentage d'augmentation} = \frac{(\text{flux maximal} - \text{flux basal})}{\text{flux basal}} \times 100$, mais également en conductance vasculaire, représentée par le flux en PU divisé par la pression artérielle moyenne (mmHg), permettant d'évaluer l'impact de la pression sanguine sur la mesure vasculaire entre les différents tests.

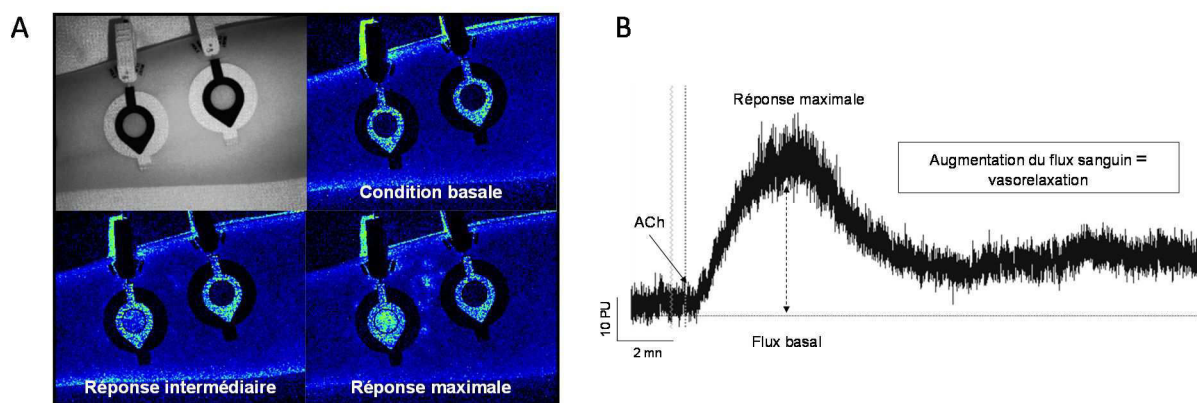


Figure 26 : Technique du LSCI couplé à l'iontophorèse de drogues vasoactives.

A : Positionnement des électrodes sur l'avant-bras avec réactions progressives à la substance vasoactive testée ;
B : Tracé représentatif du flux sanguin pendant l'administration d'ACh.

- **Protocole expérimental :**

L'évaluation de la fonction vasculaire microcirculatoire in vivo sur les animaux a été effectuée en condition de normoglycémie (NG) ou d'hyperglycémie aigue (HG).



Des tests préalables de tolérance au glucose nous ont permis d'identifier l'intervalle de temps nécessaire pour l'exploration *in vivo*, lorsque la glycémie était la plus élevée (voir p... Test de tolérance au glucose). Vingt-quatre heures avant l'expérimentation, les rats étaient dépilés avec une tondeuse puis une crème dépilatoire Veet® au niveau de la face inféro-postérieure sur environ six centimètres en partant de la base de la queue, correspondant au site de disposition des électrodes.

Une fois le rat anesthésié (pentobarbital sodique, 50mg.kg^{-1}), l'électrode dispersive couplée à la sonde thermostatique du LDF était placée sur la zone dépilée de l'animal. L'électrode passive quant à elle, était collée sous la patte avant, du même côté que l'électrode dispersive (droite ou gauche). La répartition des substances vasoactives sur un côté ou l'autre de l'animal étaient réalisées de manière aléatoire. Une stimulation électrique d'une intensité de $0,1\text{mA}$ pendant 20 secondes était appliquée pour les deux substances (Pelletier et al., 2011). Afin d'évaluer les fonctions endothélium-dépendante et -indépendantes, une électrode dispersive permettait la diffusion d'ACh (2%, 2g/100ml, $180\mu\text{l}$), pendant qu'une autre sur l'autre patte arrière de l'animal, diffusait du SNP (2%, 2g/100ml, $180\mu\text{l}$), respectivement. Durant toute cette période, le flux sanguin a été mesuré par la sonde thermostatique du LDF. (Figure 27).

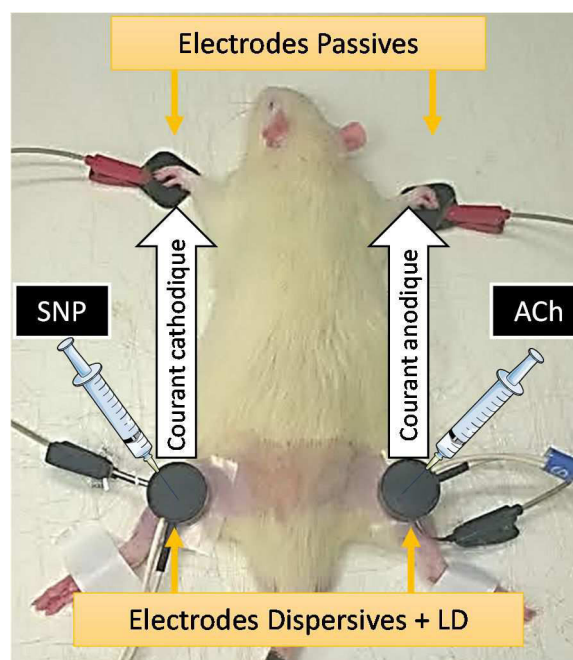


Figure 27: Positionnement des sondes Doppler et électrodes d'iontophorese sur un rat anesthésié. ACh : Acétylcholine, SNP : Sodium Nitroprussiate ; LD : Laser Doppler.



3.3. Protocole utilisé au cours de l'ETUDE N°2 :

Comme pour l'ETUDE N°1, nous avons évalué la microcirculation cutanée par LDF couplé à la iontophorèse. Ces mesures ont été réalisées à T0, 3, 6 et 15 semaines sur les rats Ctrl / HFS / HFS-Ex, afin de réaliser un suivi longitudinal des adaptations vasculaires au régime alimentaire.

Contrairement à l'étude 1, l'anesthésie des animaux a été effectuée par inhalation d'isoflurane (Anestéo, GE Healthcare, France). Pour cela, les animaux étaient placés dans une boîte permettant une induction à l'isoflurane à 4 ou 5%, puis l'anesthésie était maintenu grâce à un masque diffusant de l'isoflurane à 1.5 ou 2% (en fonction de la sensibilité et du poids de l'animal).

4. EVALUATION IN VIVO DE LA FONCTION MACROCIRCULATOIRE

Toutes les mesures macrocirculatoires ont été réalisées à l'aide d'un échographe à haute résolution (Vivid I, GE Medical Systems, Milwaukee, USA), associé à une sonde à fréquence multiple (10MHz), au cours de l'ETUDE N°1 (**Figure 22**). Toutes les mesures ont été réalisées par le même opérateur (GW).

- **Principe de la technique :**

Les images en 2 dimensions (B-mode) et le signal Doppler ont été simultanément enregistrés avec une mesure d'électrocardiogramme. Le diamètre artériel a été mesuré sur des images B-mode où le faisceau de la sonde était perpendiculaire à l'artère. L'opérateur a fait en sorte de trouver le plus gros diamètre afin d'obtenir un signal important, ainsi qu'une section longitudinale de l'artère pour chaque image. La vitesse moyenne (cm.s^{-1}) a été enregistrée au même niveau, grâce aux ondes pulsées du Doppler (angle 45-55°). Les mesures ont été corrigées par l'inclinaison de l'angle, et l'échantillon volumique évalué par le Doppler a été ajusté pour couvrir l'ensemble de la largeur du vaisseau. Un filtre de haute fréquence a été utilisé pour éliminer les éventuels artefacts non représentatifs de la fonction artérielle, avec une valeur limite de 100Hz.



- **Protocole utilisé :**

Afin d'évaluer la fonction endothéliale macrocirculatoire, un test FMD (Flow-Mediated Dilation) a été réalisé (International Brachial Reactivity Task Force Guidelines). Un brassard était placé autour de l'avant-bras droit de chaque individu, et la sonde à ultrasons était positionnée de manière proximale à celui-ci. Le diamètre artériel était mesuré juste avant d'évaluer l'état basal du flux sanguin. Le brassard était alors gonflé à 250mmHg pendant 5 minutes. Le dégonflement du brassard provoquait ensuite une hyperémie réactive, mesurée au niveau de l'artère brachiale.

Quinze minutes plus tard, le diamètre basal de l'artère était à nouveau mesuré, avant d'évaluer la fonction du muscle lisse grâce à un test NMD (Nitrate-Mediated Dilation). Cette procédure implique l'administration sublinguale de glyceryl trinitrate (0.4mg, Nitrolingual® Pumpspray, G. Pohl-Boskamp GmbH & Co, KG, Germany).

Les données ont été analysées en moyennant les valeurs de 5 mesures successives, en utilisant un logiciel adapté ((EchoPac 6.0, GE Healthcare, Horten, Norway). Le volume du flux sanguin ($\text{ml} \cdot \text{mn}^{-1}$) a été mesuré sur la moyenne de 5 cycles cardiaques suivant le dégonflement du brassard, comportant des vitesses systoliques importantes, qui ont été reportées à l'état basal et au pic d'hyperémie réactive. Ces mesures ont été exprimées en pourcentage d'augmentation par rapport aux valeurs basales. La vitesse de cisaillement a été calculée selon : $\text{vitesse de cisaillement} = \frac{(4 \times \text{vitesse systolique moyenne})}{\text{diamètre moyen}}$, permettant

d'estimer le shear stress induit par hyperémie, et a été exprimé en fonction des valeurs basales. Les tests FMD et NMD en réponse à un test hyperémique post-occlusif ou à une administration de nitrate respectivement, ont été exprimées en pourcentage d'augmentation du diamètre artériel par rapport aux valeurs de base. Le « **shear rate** » (s^{-1}) obtenu suite au relâchement du brassard a également été mesuré. Il donne une estimation indirecte des contraintes de cisaillement (i.e., shear stress), grâce à l'équation suivante (Wray et al., 2005) :

$\text{Shear rate} = \frac{4 \times V_{\text{moy}}}{D_{\text{moy}}}$. Enfin le FMD a été indexé sur le shear rate.



5. ETUDE DE LA REACTIVITE VASCULAIRE AORTIQUE EX VIVO.

Au terme des 15 semaines de régime, les rats ont été anesthésiés avec une injection de Pentobarbital Sodique® (120 mg.kg⁻¹ i.p.), et ont reçu une injection d'héparine (1000 UI/kg, i.v.) afin d'éviter la formation de caillot sanguin au moment du prélèvement. Après une thoracotomie, le bloc coeur-aorte a été prélevé et immergé rapidement dans une solution de Krebs-Henseleit (KH)(concentration en mM: 118 NaCl ; 4,7 KCl; 1,2 MgSO₄; 1,2 KH₂PO₄; 25 NaHCO₃ ; 11 Glucose ; 2,5 CaCl₂) froid. L'aorte a ensuite été isolée, nettoyée ou non du PVAT en fonction des expérimentations, et découpée en anneaux d'environ 2mm de longueur. Ces derniers ont été installés dans des cuves à organes contenant une solution de KH montés entre deux crochets métalliques, l'un fixe et l'autre relié à un capteur de force isométrique EMKA® (**Figure 28**). Le signal était transmis à un amplificateur puis traité informatiquement par le logiciel d'acquisition IOX®. Le liquide de KH était chauffé à 37°C, et du carbogène (95% O₂, 5% CO₂) était apporté par bullage, assurant un pH de 7.4 stable et une oxygénation suffisante. Les anneaux d'aorte ont ensuite été équilibrés pendant 45 minutes à une tension de 2g.

Après la période de stabilisation des anneaux, un test d'intégrité était réalisé, nous permettant de vérifier que l'endothélium n'ait pas été trop lésé durant le montage. Pour cela une dose d'acétylcholine (1,10⁻⁵M) était injectée sur les anneaux d'aorte pré-contractés à la phényléphrine (1,10⁻⁶ M). Seuls les anneaux capables de se relâcher d'au moins 60% de la contraction maximale atteinte avec la PE étaient inclus dans l'analyse statistique.

Une fois ce pré-test effectué, les différents protocoles ont été réalisés.

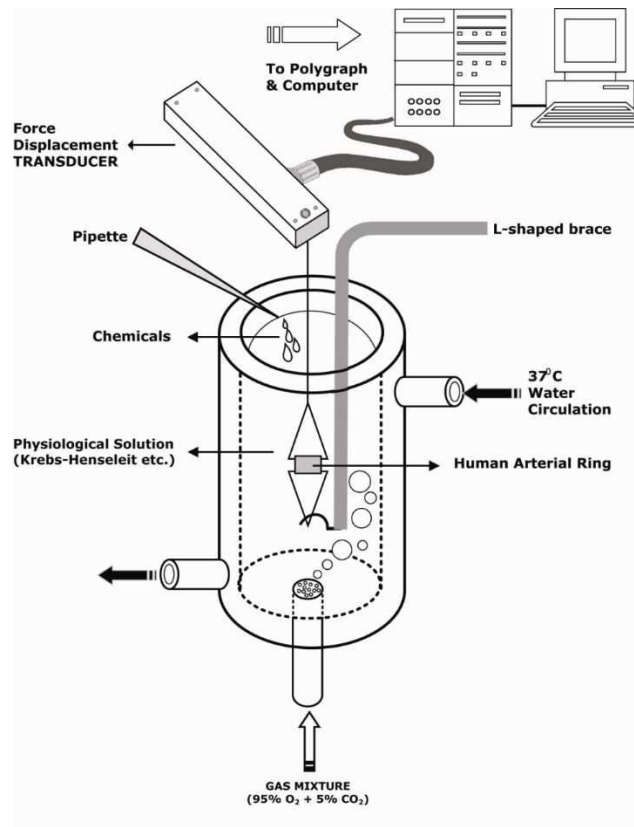


Figure 28 : Représentation d'une cuve à organe isolé et de son fonctionnement.

Reproduit de (Yildiz, Seyrek et Gul 2013).

5.1. Protocole utilisé au cours de l'ETUDE N°1

L'objectif de ce protocole a été d'évaluer l'influence d'une hyperglycémie aiguë et du stress oxydant sur la réponse vasculaire.

Une fois le test d'intégrité effectué, deux doses réponses relaxantes à l'ACh (1.10^{-9} M à 1.10^{-5} M), sur des anneaux pré-contractionnés à la PE, ont été réalisées successivement. La première dose-réponse a été réalisée en condition NG, et la seconde en condition HG, afin que chaque anneau soit son propre contrôle. En condition HG, la solution de Krebs contenant les anneaux a été remplacée par une solution identique avec différentes concentrations de glucose (30, 100 et 200mM). La relaxation maximale (R_{max}) des anneaux d'aorte a été évaluée, ainsi que la sensibilité du vaisseau à l'ACh ($DE50_{ACh}$).

Afin de mettre en évidence l'impact potentiel du stress oxydant sur la réponse vasculaire en condition d'hyperglycémie aiguë, certains anneaux ont été traités avec un agent antioxydant non spécifique, le N-acétylcysteine (NAC). Pour cela, après une première dose réponse en NG, les anneaux ont été rincés puis stabilisés pendant une période de 20 minutes



durant laquelle du NAC était ajouté ($10\mu\text{M}$) afin d'agir en amont de la phase d'HG. Après cette période d'incubation, les anneaux ont été plongés dans un Krebs HG, en présence de NAC et une seconde dose réponse relaxante à l'ACh (1.10^{-9}M à 1.10^{-5}M) a été réalisée en condition HG (**Figure 29**).

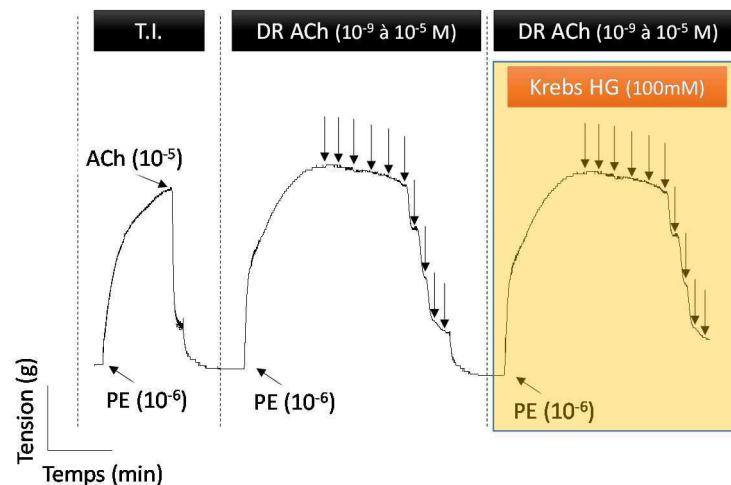


Figure 29: Représentation schématique du protocole utilisé au cours de l'ETUDE N°1

T.I. : test d'intégrité ; ACh : acétylcholine ; HG : hyperglycémie ; PE : phényléphrine.

5.2. Protocole utilisé au cours de l'ETUDE N°2 :

L'objectif de ce protocole de réactivité vasculaire a été d'évaluer comment la fonction endothéliale et plus particulièrement la voie de synthèse du NO était capable de limiter les effets vasoconstricteurs de l'hyperactivité sympathique caractéristique du SMet.

Pour cela, nous avons testé la réponse contractile à un agoniste α -adrénergique, sur des anneaux d'aortes dont, pour certains, l'endothélium avait été préalablement endommagés par lésion mécanique (utilisation d'une pince crantée).

Après la période de stabilisation, les anneaux ont été contractés au chlorure de potassium (KCl) (60mM), capable d'induire une dépolarisation de la membrane des CML, et donc une contraction dite « maximale ». Celle-ci a été utilisée comme référence permettant de normaliser les contractions induites par d'autres agonistes vasoconstricteurs. Une fois les cuves rincées, une dose-réponse contractile à la PE (1.10^{-10} à 3.10^{-5}M) a été réalisée, afin de tester la capacité de contraction à un agoniste α -adrénergique des anneaux d'aorte. Après cette dose réponse et lorsque que les anneaux avaient récupérés une tension stable aux environs de 2g, ils ont été incubés avec un inhibiteur spécifique des NOS, la L-NAME (3.10^{-4}M) pendant



30 minutes, afin de mettre en évidence l'effet anti-contractile du NO. Ensuite une seconde et identique dose-réponse contractile à la PE a été réalisée (**Figure 30**).

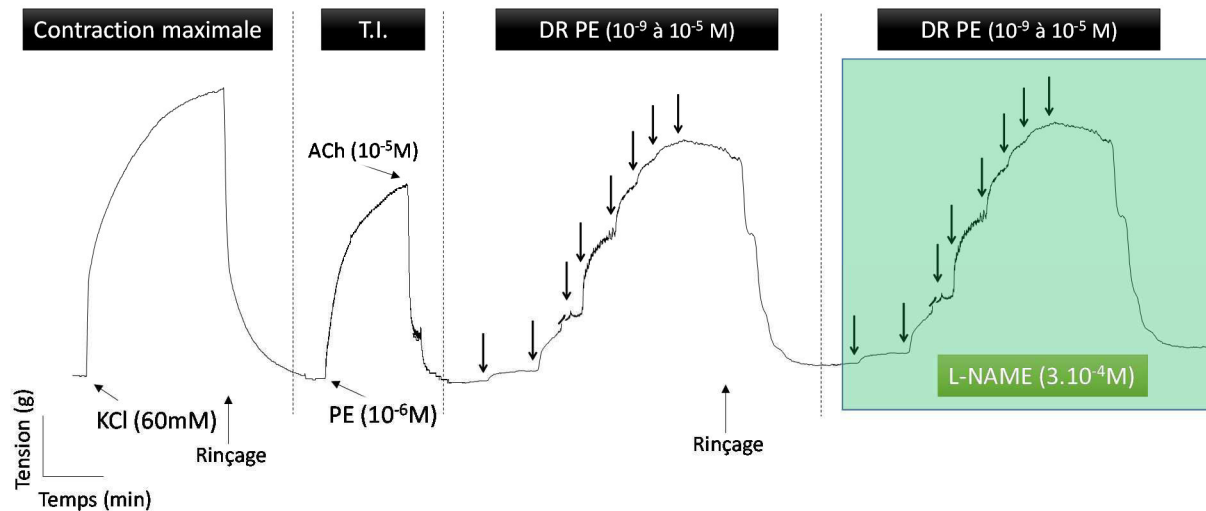


Figure 30 : Représentation schématique du protocole utilisé lors de l'ETUDE N°2.

T.I. : test d'intégrité ; DR : Dose réponse ; ACh : acétylcholine ; PE : phényléphrine ; KCl : chlorure de potassium.

5.3. Protocoles utilisés au cours de l'ETUDE N°3 :

L'objectif de cette étude a été de démontrer comment l'exercice affecte le PVAT et sa fonction vasomotrice, dans le cadre du SMet. Pour cela, une fois le test d'intégrité effectué, différents protocoles ont été réalisés :

- **Protocole 1 : Impact du PVAT sur la fonction vasculaire.**

Afin d'évaluer les capacités vasorégulatrices du PVAT, les anneaux d'aortes ont été montés dans les cuves à organes isolés avec ou sans tissu adipeux périvasculaire intact. A la fin de la période de stabilisation, une première dose-réponse relaxante à l'ACh ($1.10^{-9}M$ à $1.10^{-5}M$) a été réalisée sur des anneaux pré-contractés à la PE ($1.10^{-6}M$), afin d'évaluer l'influence du PVAT sur la capacité de relaxation endothélium-dépendante des anneaux. Ensuite les anneaux ont été rincés puis à nouveau pré-contractés à la PE ($1.10^{-6}M$) afin de réaliser une seconde dose-réponse relaxante au SNP ($1.10^{-9}M$ à $1.10^{-5}M$), permettant de visualiser l'impact du PVAT sur la sensibilité des cellules musculaires lisses au NO (**Figure 31**).

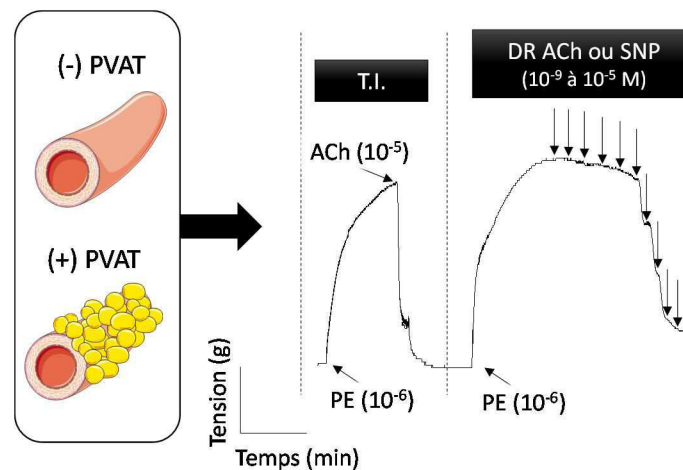


Figure 31: Représentation schématique du protocole 1 de l'ETUDE N°3.

T.I. : test d'intégrité ; DR : Dose réponse ; ACh : acétylcholine ; PE : phényléphrine ; SNP : nitroprussiate de sodium ; PVAT : tissu adipeux périvasculaire.

- **Protocole 2 : Impact du secretome de PVAT sur la fonction vasculaire.**

Afin de mieux comprendre les effets propres du PVAT et de ses sécrétions sur la réponse vasculaire, nous avons mis le secretome du PVAT des différents groupes de rats au contact d'aortes saines.

Pour cela, toutes les aortes étaient au préalable « nettoyées » du PVAT. Celui-ci était conservé à 4°C pendant le montage des anneaux d'aorte dans les cuves à organes. 250mg du PVAT prélevé était ensuite incubé à 37°C pendant 30 minutes dans un volume de 3ml de KH. Le sécrétome, c'est-à-dire le surnageant du PVAT incubé, était ensuite transféré à raison de 1,5mL dans des cuves à organes isolés de volume total 5ml. (**Figure 32A**). Cette procédure a été réalisée afin de tester les effets du secretome de PVAT provenant d'animaux des différents groupes expérimentaux sur des aortes saines. Ceci permet notamment de s'affranchir des effets confondants de l'impact de nos conditions expérimentales directement sur le tissu vasculaire.

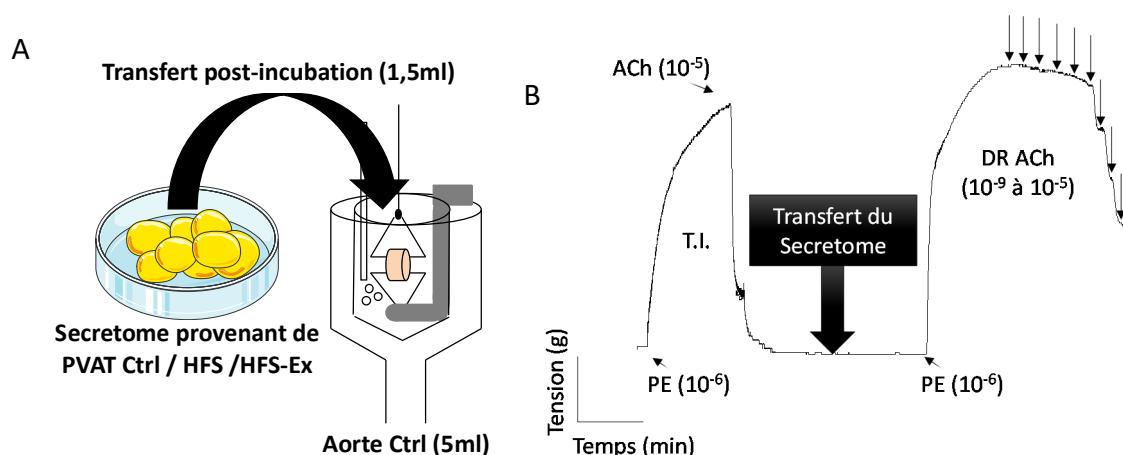


Figure 32 : Représentation schématique du protocole 2 de l'ETUDE N°3.

L'incubation était réalisée dans une solution de Krebs HS à 37°C pendant 30mn. T.I. : test d'intégrité ; DR : Dose réponse ; ACh : acétylcholine ; PE : phényléphrine ; PVAT : tissu adipeux périvasculaire ; Ctrl : groupe de rat contrôle ; HFS : groupe de rat syndrome métabolique ; HFS-Ex : groupe de rat HFS entraînés.

Afin d'évaluer les effets du secretome du PVAT sur la fonction endothélium-dépendante et indépendante, nous avons réalisés des doses réponses à l'ACh et au SNP (1.10^{-9} à 1.10^{-5} M), respectivement, après le transfert du secretome dans la cuve (**Figure 32B**).

Afin de mettre en évidence le rôle du stress oxydant dans les altérations de la réponse vasculaire induites par le PVAT de rats HFS, certains anneaux d'aorte du groupe Ctrl ont été traités avec un agent antioxydant non-spécifique, la N-Acétylecystéine (NAC).

Comme pour l'ETUDE 1, le NAC ($10\mu\text{M}$) était incubé pendant 20mn avant de réaliser une dose réponse relaxante à l'ACh (1.10^{-9} M à 1.10^{-5} M) sur des anneaux pré-contractés à la PE (1.10^{-6} M).

- **Protocole 3 : Evaluation du rôle vasorelaxant de la eNOS exprimée par le PVAT**

Dans un dernier protocole nous avons tenté d'évaluer le rôle potentiellement vasomoteur de la eNOS exprimée au sein du PVAT aortique.

Pour cela, nous avons supprimé par lésion mécanique l'endothélium des anneaux d'aorte sur lesquelles le PVAT était préservé. Après une contraction de référence au KCl (60mM), les anneaux ont été rincés, puis deux doses réponses contractiles à la noradrénaline (1.10^{-9} à 1.10^{-5} M) en présence ou non de la L-NAME (3.10^{-4} M) afin d'inhiber la eNOS du PVAT (**Figure 33**).

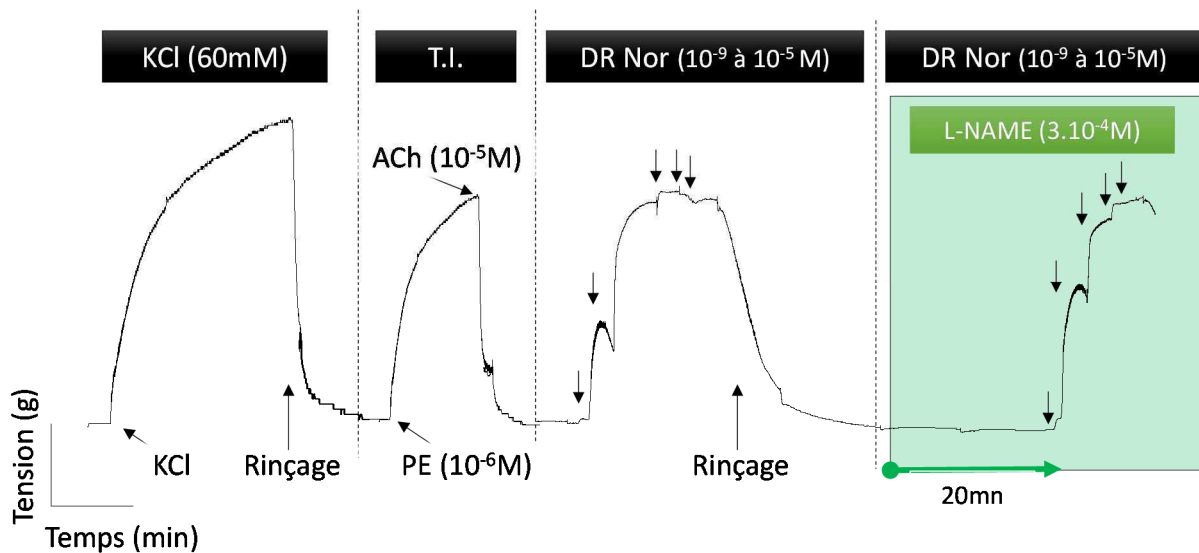


Figure 33 : Représentation schématique du protocole 3 de l'ETUDE N°3.

KCl : chlorure de potassium ; T.I. : test d'intégrité ; DR : Dose réponse ; Nor : noradrénaline ; ACh : acétylcholine ; PE : phényléphrine ; L-NAME : L nitro-arginine méthyl ester.

6. ANALYSES HISTOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES

6.1. Observation de coupes histologiques

Sur certaines aortes fraîchement prélevées, de petits segments ont été placés dans de la formaline, puis fixés quelques jour après dans de la paraffine, permettant de réaliser ultérieurement des coupes fines ($5\mu\text{m}$) au microtome (Leica Biosystems RM2235). Les coupes obtenues sous forme de ruban ont été placées dans de l'eau distillée à 37°C afin de délier les coupes, puis elles ont été positionnées sur une lame (Superfrost Ultra Plus, Thermo Scientific). Après avoir été égouttées, les lames ont été placées dans un incubateur à 37°C toute une nuit afin d'être totalement sèches. Le lendemain, les lames ont été déparaffinées grâce à deux bains successifs d'Histoclear (Fisher Scientific) de 10 minutes, puis réhydratés dans des bains d'alcool à des degrés décroissants (100, 95, 90 puis 75%) de 5 minutes chacun, et pour finir les lames ont été plongées dans de l'eau distillée pendant 5 minutes. Afin de pouvoir observer au microscope la structure morphologique de nos échantillons « aortes + PVAT », les lames ont été colorées à l'hématoxyline-éosine, permettant de faire apparaître les noyaux et le cytoplasme des cellules.



6.2. Western Blots

6.2.1. Extraction et préparation des échantillons

Lors des sacrifices de rats, certains tissus, aortes et PVAT, ont été rapidement plongés dans de l'azote liquide puis conservés à -80°C afin de figer toute réactions enzymatiques.

Les échantillons d'aorte ont été broyés à l'aide d'un potter verre dans un tampon d'extraction SB à 4°C (50mM de Tris-HCl, pH=6.7, 1%SDS, 10% de glycérol), contenant notamment un inhibiteur de protéases (Protease inhibitor cocktail ; Sigma Aldrich) et un inhibiteur de phosphatase (NaOV ; Fisher Scientific). L'homogénat obtenu était ensuite centrifugé à 17 000 g pendant 15 minutes à 4°C , permettant d'obtenir un surnageant ne contenant que des éléments cytosoliques, répartis ensuite en plusieurs aliquots et conservés à -80°C .

Les échantillons de PVAT ont été broyés à l'aide d'un Ultra-Turax (IKA, T10Basic) dans le même tampon d'extraction. L'homogénat obtenu a ensuite été centrifugé à 12 000g pendant 20 minutes à 4°C , permettant de récupérer l'ensemble des protéines cytosoliques contenues dans le surnageant, et de les conserver en plusieurs aliquots à -80°C .

6.2.2. Dosage des protéines

L'évaluation de la concentration en protéine des échantillons était réalisées avec un kit de dosage BCA (Bicinchonidic acid)(Pierce® BCA Protein Assay Kit ; Thermo Scientific). Le principe de ce dosage repose sur l'association du BCA aux ions Cu^{+} , obtenus par la réduction d'ion Cu^{2+} par les protéines présentes dans l'échantillon. Le complexe BCA- Cu^{+} présente une forte absorbance à 562nm, proportionnelle à la concentration protéique de l'échantillon. Ainsi, grâce à une gamme étalon BSA (Bovine Serum Albumin) de concentration protéique connue (de 0 à 2g/ml), la concentration en protéine de chaque échantillon a été mesurée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 562nm.

6.2.3. Western Immunoblotting

La technique du Western Blot permet de mesurer le niveau d'expression d'une protéine d'intérêt dans un échantillon donné. Grâce à l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide, les protéines sont séparées en fonction de leur poids moléculaire, leur différence de charge ayant été annihilée par le dodécylsulfate de sodium (SDS) présent dans le tampon SB décrit plus haut. A chaque échantillon était ajouté une solution de β -



mercaptoéthanol (5%) permettant de dénaturer les protéines, ainsi que du bleu de Bromophénol (0.2%) apportant une certaine densité à l'échantillon nécessaire à sa migration le long du gel. Les échantillons étaient ensuite placés au bain-marie à 95°C afin de dénaturer complètement les complexes protéiques. Finalement, les échantillons étaient déposés sur le gel, en prenant soin de normaliser la quantité de protéine présente dans chacun d'eux. Un marqueur de poids moléculaire était également déposé sur le gel (EZ-Run™ Pre-Stained Rec Protein Ladder ; Fisher Scientific). Une fois la migration terminée, les protéines sont transférées sur une membrane de Polyfluorure de vinylidène (PVDF) à l'aide d'un appareil de transblot (Bio-Ras transfert apparatus ; Bio-Rad Laboratories, Richmond, Ca).

Les membranes étaient incubées sous-agitation, à température ambiante pendant 1 heure, dans une solution de blocage (lait 10% ou BSA 3%) préparée avec du TBS-T (Tris-Buffered saline, 0.05% Tween 20, pH=7.5), afin de saturer les sites non spécifiques. Une fois cette étape terminée, les membranes étaient rincées avec du TBS-T, puis incubées toute une nuit sous-agitation et à 4°C, avec l'anticorps spécifique de la protéine d'intérêt (anticorps primaire) (**Tableau 4**).

Protéine cible	Origine	Référence	Concentration utilisée
eNOS	Souris	BD Transduction laboratory	1/1000
eNOS P Ser 1177	Souris	BD Transduction laboratory	1/500
Adiponectine	lapin	Cell Signaling	1/1000
UCP-1	chèvre	Santa Cruz	1/300
Tubuline	lapin	BD Bioscience	1/1000
GAPDH	lapin	Santa Cruz	1/5000

Tableau 4 : Liste des anticorps utilisés en Western Blot au cours de ce travail.

Au terme de l'incubation avec l'anticorps primaire, les membranes étaient rincées avec du TBS-T, puis incubées pendant 1 heure avec un anticorps secondaire, à température ambiante. Les membranes étaient à nouveau rincées puis immergées dans un réactif luminescent ECL (enhanced chemiluminescent) ou ECL+ (SuperSignal® West Pico Chemiluminescence Substrate), qui au contact de l'enzyme HRP, contenu dans l'anticorps secondaire, produit une émission photonique. L'intensité de la réaction de chimiluminescence est alors détectée sur un film radiographique, qui sera scanné et permettra de quantifier l'intensité du signal grâce au logiciel Image J (ImageJ, NIH, USA). Le niveau d'expression des protéines étudiées a été normalisé par le niveau d'expression de la GAPDH ou de la Tubuline, utilisés comme



protéines de référence puisque leur expression n'était pas altérée par les différentes conditions (régime enrichi ou protocole d'entraînement). Pour certaines expérimentations, le rouge ponceau a été utilisé comme contrôle de charge protéique.

6.3. Evaluation du profil des adipokines sécrétées par le tissu adipeux périvasculaire (Proteome ProfilerTM, RnDSystems)

Ce kit a été utilisé afin d'évaluer l'impact de nos conditions expérimentales sur le profil des adipokines sécrétées par le PVAT. Cette technique permet de mesurer l'expression protéique de différentes cytokines sélectionnées, grâce à une membrane en nitrocellulose (Rat Adipokine Array, RnDSystems, 893907) où ont été préalablement positionnés des anticorps spécifiques de ces cytokines (anticorps primaires). Un cocktail d'anticorps secondaires (RnDSystems, 893908) est prévu pour être mélangé aux échantillons testés. Les membranes doivent être immergées dans une solution de blocage (Array Buffer 6, RnDSystems, 893573), avant d'être placées dans une cassette avec le complexe échantillon/cocktail d'anticorps secondaires. Grâce à une incubation d'1 nuit sous agitation, les cytokines présentes dans l'échantillon vont balayer la membrane et se fixer sur leur anticorps spécifiques. Les membranes sont ensuite rincées puis incubées avec une solution de Streptavidin-HRP (RnDSystems, 893019) pendant 30 minutes. A la fin de l'incubation les membranes sont à nouveau rincées puis elles sont immergées dans une solution de révélation (Chemi Reagent 1 et 2, RnDSystems, 894287, 894288) avant d'être placées sous un film plastique et mise au contact d'un film radiographique.

Afin de normaliser un minimum la quantification protéique de nos échantillons, des échantillons de deux individus de chaque groupe ont été mélangés puis incubés avec les membranes. Les mesures ont été réalisées deux fois.

6.4. Évaluation du stress oxydant aortique

6.4.1. Résonnance Paramagnétique Électronique (RPE).

- **Principe de RPE et de spin trapping.**

La mesure par spectroscopie par RPE, couplée à une technique de « spin-trapping » est une technique de référence pour l'évaluation du stress oxydant dans les tissus biologiques. La présence d'un ou plusieurs électrons non-appariés sur les molécules radicalaires confère à ces



dernières une propriété paramagnétique lorsqu'elles sont placées dans un champ magnétique. La soumission de ces espèces radicalaires à un champ magnétique oscillant provoque une transition des spins entre les différents niveaux électroniques permettant l'enregistrement de spectres RPE. Un spectre RPE est caractérisé par le champ auquel résonne l'échantillon (déterminé par le facteur g), le nombre et la position de raies. Ainsi, selon ces caractéristiques, le spectre enregistré est spécifique du composé évalué et son amplitude est proportionnelle à la concentration du radical évalué dans le milieu expérimental. Cependant, dans les tissus biologiques, la demi-vie extrêmement brève des radicaux libres rend leur détection difficilement visualisable par RPE. Leur détection requiert alors une stabilisation préalable. Ceci est permis par l'emploi de piègeurs de radicaux libres : les « spins-trap ». La réaction du piégeage du radical libre, produit un nouveau composé paramagnétique plus stable et d'une durée de vie considérablement augmentée. Ce composé, lui aussi radicalaire, appelé spin-adduct, est détectable par spectroscopie RPE. L'amplitude des raies du spectre enregistré est alors proportionnelle à la quantité de « spin adduct » formés et, de ce fait, à la concentration du radical évalué dans le milieu biologique. Le « spin trap » spécifique de l'O₂ utilisé au cours de ce travail est le CMH (1-hydroxy-3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine).

- **Protocole expérimental**

Une solution de 1mM de CMH a été préparée dans un tampon de Krebs-Hepes (pH=7.4) contenant 25μM de sel de chélation deferroxamine méthane-sulfonate (DF) et 5μM de la solution de CMH (500μM)(1 :1) et 50μl de ce mélange réactionnel a été prélevé dans le tube capillaire EPR (Noxygen Science Transfer & Diagnostics, Germany). Ce dernier a ensuite été placé à l'intérieur de la cavité du spectrophotomètre (e-scan spectrometre ; Bruker Germany) pour l'acquisition des données.

6.4.2. Dihydroéthidium (DHE)

Lors du prélèvement d'organes sur les animaux, de petits segments d'aortes avec leur PVAT ont été placés dans un moule en aluminium et recouvert d'O.C.T. (Optimal Cutting Temperature), puis congelés à l'azote liquide et conservés à -80°C. Lors de la coupe, les échantillons ont été placés sur le Cryostat en prenant soin de présenter l'échantillon de manière à réaliser des coupes transversales. Des coupes de 14μm ont été réalisées et déposées sur des lames. Les échantillons ont ensuite été immergés dans une solution de DHE (10μM)



pendant 5 minutes, sur une plaque dans un bain-marie à 37°C, afin de protéger l'échantillon de la lumière et d'éviter une évaporation de la solution. Après deux rinçages au PBS, les échantillons ont été recouverts d'une lamelle puis conservés à 4°C dans l'obscurité jusqu'à l'observation. Celle-ci a été effectuée à l'aide d'un microscope à fluorescence (OLYMPUS BX60, excitation : 488nm, émission : 610nm), associé à une caméra (Prog Res CF, Jenoptik). Les images obtenues ont ensuite été traitées avec le logiciel Image J (ImageJ, NIH, USA).

7. ANALYSES STATISTIQUES

Tous les résultats sont présentés sous formes de moyennes $\pm$ l'erreur standard à la moyenne (SEM). L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel MedCalc (bvba, Mariakerke, Belgique) pour l'étude 1, et à l'aide du logiciel Graph Pad Prism 6.0 (La Jolla Californie, USA) pour les études 2 et 3. Les effets des différentes conditions expérimentales et leurs interactions ont été évalués par une analyse de la variance (ANOVA) à un ou plusieurs facteurs. En cas d'interaction entre différents facteurs, un test post-hoc était réalisé (Turkey ou Bonferroni). Lors de comparaison entre deux moyennes, le test T de Student pour des valeurs appariées ou non appariées a été appliqué lorsque les conditions d'application de ces tests étaient respectées. Pour l'ensemble des tests statistiques réalisés lors de ce travail, le seuil de significativité retenu était $p \leq 0.05$.

RÉSULTATS

ETUDE N°1

Effet de la consommation de boissons sucrées sur la fonction vasculaire micro- et macrocirculatoire, chez des populations saines.

~ · ~

Effects of sugar-sweetened beverage consumption on micro- and macrovascular function in a healthy population

Cindy Meziat*, Jordan Loader*, Rani Watts, Christian Lorenzen, Dominique Sigaudou-Roussel, Simon Stewart, Cyril Reboul, Gregory Meyer, Guillaume Walther

En révision dans *Atherosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*.

RESUME D'ARTICLE

Contexte Scientifique

Récemment, de larges études s'intéressant aux modifications du régime alimentaire ont montré chez l'enfant et l'adulte un lien fort entre la consommation de boissons sucrées, qui engendre des épisodes d'hyperglycémie (HG) aiguë, et le risque de développer un diabète de type 2 (Malik et al., 2010 ; O'Connor et al., 2015 Fagherazzi et al., 2013). De plus, il est également démontré qu'une consommation excessive de ces boissons cause une augmentation de l'incidence des maladies cardiovasculaires (Xi et al., 2015 Tominaga et al., 1999). Puisque la dysfonction vasculaire est un marqueur précoce du risque cardiovasculaire, nous avons conduit récemment une méta-analyse qui a démontré qu'une HG provoquée par voie orale causait une dysfonction endothéliale transitoire chez les patients atteints de pathologies cardiométabolique, mais aussi chez des sujets sains (Loader et al., 2015). Néanmoins, les mécanismes sous-jacents impliqués restent peu décrits, même si le stress oxydant semble jouer un rôle primordial dans ces dysfonctions. (Skalicky et al., 2008 ; Demircan et al., 2008). De plus, selon les lits vasculaires considérés, les résultats disponibles à ce jour sont contradictoires ou peu robustes, notamment au niveau des adaptations microcirculatoires, réseau difficilement accessible en condition physiologique.

Ainsi, l'objectif de cette étude a été d'évaluer les effets d'une boisson sucrée sur la fonction vasculaire macro- et microcirculatoire chez des sujets sains, par une approche translationnelle allant de la clinique humaine à un modèle expérimental de rongeur. Nous avons également utilisé l'exercice physique comme une stratégie préventive des effets délétères causés par une HG aiguë sur la fonction endothéliale.

Méthodologie

L'évaluation de la fonction vasculaire en condition d'HG aiguë a été réalisée sur 12 hommes sains, sans contre-indications cardiovasculaires. L'HG a été induite par la consommation d'une boisson sucrée (600ml) de type soda. L'impact de cette HG a été mesuré sur la fonction endothéliale et sur la fonction du muscle lisse, au niveau de la microcirculation par Laser Speckle Contrast Imaging couplé à l'iontophorèse de drogues vasoactives (acétylcholine et nitroprussiate de sodium), et de la macrocirculation par une stimulation hyperémique (Flow mediated dilation) et un donneur exogène de monoxyde d'azote (Nitrate mediated dilation). Des mesures de pression artérielle, de glycémie et de fréquence cardiaque

ont également été effectuées tout au long du protocole pour évaluer l'impact de l'HG sur ces paramètres.

Afin de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents des effets délétères de l'hyperglycémie aiguë sur la fonction vasculaire, deux groupes de rats ont été conduits : un groupe de rats sédentaires (SED) et un groupe de rats entraînés (EX) (5sem, 5j/sem, 45mn/j, 70%VMA). Sur ces animaux, l'évaluation de la fonction vasculaire microcirculatoire a été effectuée grâce à un Laser Doppler couplé à l'iontophorèse de drogues vasoactives (acétylcholine, et nitroprussiate de sodium). Les animaux des deux groupes ont été testés en normo- et en hyperglycémie (NG et HG) (2g/kg de glucose, i.p.). Enfin, dans le but de mettre en évidence l'influence du stress oxydant et du découplage de la eNOS, les animaux du groupe SED ont été traités avec un agent antioxydant non spécifique le N-acétylcystéine (NAC, 50mg/kg, i.p.), ou bien avec le co-facteur essentiel de la eNOS le tétrahydrobioptérine (BH₄, 10mg/kg, i.p.). Au terme des expérimentations in vivo l'aorte des animaux a été prélevée afin de tester la capacité de relaxation endothéliale en réponse à différentes concentrations de glucose. Ces artères ont également été incubées avec du NAC (20mM) afin d'évaluer le rôle du stress oxydant dans de potentiels dysfonctions liées à l'hyperglycémie. La production totale d'espèces réactives de l'oxygène a été évaluée par méthode de résonance paramagnétique électronique.

Résultats majeurs

Cette étude est la première à démontrer l'effet délétère causée par une HG aiguë, induite par la consommation d'une boisson sucrée commerciale, sur la fonction endothéliale de sujets sains. Ce résultat est d'autant plus intéressant, qu'il a été démontré au niveau des territoires macro- et microcirculatoires. Nos explorations sur un modèle animal nous ont permis de confirmer l'altération de la fonction endothéliale en réponse à un stress HG aiguë au niveau microcirculatoire, mais également lors de manipulations sur des anneaux d'aortes isolées (Krebs hyperglycémique, [Glc] : 100 et 200 mM). De plus, le stress oxydant et le mécanisme de découplage de la eNOS semblent être fortement impliqués dans la baisse de la fonction endothéliale en situation hyperglycémique. L'exercice physique permet de maintenir une capacité de relaxation endothélium-dépendante comparable à celle observée en normoglycémie.

Ces résultats démontrent qu'une consommation de boisson sucrée de type soda altère significativement la fonction endothéliale de sujets sains, quel que soit le lit vasculaire considéré. Cette dysfonction endothéliale semble fortement liée à une augmentation du stress oxydant vasculaire, qui altère la voie du NO, via un potentiel découplage de la eNOS. Enfin, une stratégie thérapeutique comme l'exercice physique semble efficace pour limiter les effets délétères d'une HG aigue sur la fonction vasculaire.

Effects of sugar-sweetened beverage consumption on micro- and macrovascular function in a healthy population

Jordan Loader ^{1,2,3*}, Cindy Meziat ^{1*}, Rani Watts ³, Christian Lorenzen ³, Dominique Sigaudou-Roussel ⁴, Simon Stewart ⁵, Cyril Reboul ¹, Gregory Meyer ¹, Guillaume Walther ^{1,3}

1. Avignon University, LAPEC EA4278, F-84000, Avignon, France
2. Centre of Research Excellence to Reduce Inequality in Heart Disease, Mary MacKillop Institute for Health Research, Australian Catholic University, Melbourne, Australia.
3. School of Exercise Science, Australian Catholic University, Melbourne, Australia
4. Laboratory of Tissue Biology and Therapeutic Engineering UMR5305 University of Lyon1
5. The Mary MacKillop Institute for Health Research, Australian Catholic University, Melbourne, Australia.

* Both authors contributed equally to this work.

Running title: Sugary drinks impair endothelial function

Corresponding author:

Guillaume WALTHER
Avignon University, Faculty of Sciences
LAPEC EA4278
74 rue Louis Pasteur
84000 AVIGNON, France
Telephone: +334 90 16 29 45
Fax: + 334 90 16 29 01
Email: guillaume.walther@univ-avignon.fr

Keywords: sugar-sweetened beverages · hyperglycemia · vascular dysfunction · microcirculation · macrocirculation

Subject codes: [95]

Word count (Abstract): 232

Word count (Excluding materials and methods): 5513

Number of tables: 2

Number of figures: 6

TOC category: Translational

TOC subcategory: Vascular Biology

The study protocol was registered with the Australian New Zealand Clinical Trial Registry (<https://www.anzctr.org.au/Trial/Registration/TrialReview.aspx?id=366442&isReview=true>): #ACTRN12614000614695.

ABSTRACT

Objective To assess vascular function during acute hyperglycemia induced by commercial sugar-sweetened beverage (SSB) consumption and its effect on the underlying mechanisms of the nitric oxide pathway.

Approach and results In a randomized, single-blind, crossover trial, twelve healthy male participants consumed 600 mL of a water beverage or a commercial SSB across two visits. Endothelial and vascular smooth muscle (VSM) function were assessed in the microcirculation using laser speckle contrast imaging incorporating transdermal iontophoresis and in the macrocirculation using brachial artery ultrasound with flow- and nitrate-mediated dilation. Compared to water, SSB consumption impaired micro- and macrovascular endothelial function as indicated by a decreased vascular response to acetylcholine iontophoresis (208.3 ± 24.3 vs. 144.2 ± 15.7 %, $P < 0.01$) and reduced flow-mediated dilation (0.019 ± 0.002 vs. 0.014 ± 0.002 %/s⁻¹, $P < 0.01$), respectively. Systemic VSM remained preserved. Similar decreases in endothelial function were observed during acute hyperglycemia in an *in vivo* rat model. However, function was fully restored by treatment with the antioxidant, N-acetylcysteine. Additionally, *ex vivo* experiments revealed that reactive oxygen species production was elevated during acute hyperglycemia, while endothelial nitric oxide synthase activation by phosphorylation at serine 1177 was decreased.

Conclusion To our knowledge, this is the first study to assess the vascular effects of acute hyperglycemia induced by commercial SSB consumption alone. These findings suggest that SSB-mediated endothelial dysfunction is partly due to increased oxidative stress that disrupts nitric oxide synthesis.

ABBREVIATIONS

SSB	sugar-sweetened beverages
CVD	cardiovascular disease
VSM	vascular smooth muscle
NO	nitric oxide
eNOS	endothelial nitric oxide synthase

INTRODUCTION

Commercial sugar-sweetened beverages (SSB) are one of the most frequently consumed beverages worldwide.^{1, 2} As such they represent a major source of added sugar in the modern diet. Habitual consumption of SSB induces frequent episodes of acute hyperglycemia and is linked to an increased risk of developing obesity, metabolic syndrome, and type 2 diabetes.²⁻⁴ Furthermore, excessive SSB consumption is also associated with a higher incidence of advanced forms of cardiovascular disease (CVD),² which remains the single leading cause of death representing 31 % of the global mortality rate.⁵ Impaired vascular function is considered to be a main precursor to the pathogenesis of CVD and may be present long before atherosclerotic vascular changes occur.⁶

Normal vascular function involves a continuous interaction between the endothelium and vascular smooth muscle (VSM) that is regulated by numerous vasodilators and vasoconstrictors such as the highly characterized, nitric oxide (NO).^{7, 8} In a recent systematic review and meta-analysis, our research group provided evidence that acute hyperglycemia induced by an oral sugar load transiently impairs endothelial function in not only patients with cardiometabolic disease, but also in those considered to be healthy.⁹ It has been suggested that such endothelial dysfunction may be attributed to increased oxidative stress mediated by acute hyperglycemia.^{10, 11} Indeed, NO bioavailability in the vascular wall is highly sensitive to redox modulation of the cellular environment.^{12, 13} However, due to a limited availability of microcirculatory data and discrepant reporting of macrovascular data, the impact of acute hyperglycemia on vascular function remains inconclusive and the underlying mechanisms not fully understood.

In this context and considering the surge in commercial SSB consumption, as well as its potential link to a sustained epidemic of CVD, this present study aimed to provide a comprehensive assessment of the effect of SSB-mediated acute hyperglycemia on micro- and macrovascular function in a healthy population. Additionally, considering that experimental exploration of healthy vascular tissue in humans is difficult to perform, due to ethical barriers, this study also aimed to further investigate the underlying mechanisms of the interaction between acute hyperglycemia and endothelial function via an *in vivo* and *ex vivo* rat model.

MATERIALS AND METHODS

This study was comprised of two separate protocols in order to comprehensively investigate the effect of acute hyperglycemia induced by sugar-sweetened beverage (SSB) consumption on vascular function. Protocol one was a clinical study conducted at the Australian Catholic University, Melbourne, to assess the effect of SSB consumption on micro- and macrovascular function in healthy humans. Protocol two was conducted at Avignon University, France, to provide deeper exploration into the effect of acute hyperglycemia on the underlying mechanisms of vascular function through an *in vivo* and *ex vivo* experimental rat model.

Protocol One - Clinical Study

Participants and screening

Healthy non-smoking, sedentary (<2 hours/week of exercise) males ($n = 12$) aged 18-55 years were recruited. Participants were excluded if they had any history of cardiovascular disease; a 5 % weight gain or loss in the 6 months prior to beginning the protocol; or if they were currently using or being treated with any vasoactive medications. All participants provided informed written consent. The Human Research Ethics Committee at the Australian Catholic University, Australia, approved this protocol. This study was registered with the Australian New Zealand Clinical Trial Registry: #ACTRN12614000614695.

Study design

Following overnight fasting (≥ 10 hours), participants presented to the cardiovascular laboratory on two occasions to perform this randomized, single-blind, crossover trial (Figure 1). To standardize responses between trials, participants were instructed to maintain their current level of physical activity and to abstain from strenuous exercise for 48 hours, alcohol consumption for 24 hours, and caffeine consumption in the 12 hours prior to each trial. Clinical measurements were performed at the beginning of the first trial to collect anthropometric and hemodynamic data; and assess fasting blood glucose concentrations. Participants were then administered one of two 600 mL test beverages from an opaque container. Visit A assessed vascular function in response to consumption of 600 mL of water and visit B measured the vascular response to 600 mL of a commercial SSB. Visits A and B were randomized for each participant using an online sequence generator by a researcher not

involved in data collection or analyses (JL).¹ Participants were allowed five minutes to consume each beverage, of which the nutritional content is presented in Table 1. Blood glucose concentrations, blood pressure and heart rate were assessed throughout each visit. A 600 mL volume of each beverage was administered, as it represents the common volume of SSB commercially available for purchase by the public.

Clinical measurements

Height and mass were measured using a stadiometer and a calibrated scale, respectively. Body mass index was calculated as mass (kg) divided by height² (m). Blood glucose concentrations were assessed with a handheld blood glucose monitoring system (Freestyle Optium, Abbott Diabetes Care Ltd, UK). Systolic and diastolic blood pressure, and heart rate were measured using a digital sphygmomanometer (Dinamap, GE Medical Systems, Milwaukee, USA). Blood pressure variables were expressed as mean arterial pressure (mmHg) calculated by $[(2 \times \text{diastolic blood pressure}) + \text{systolic blood pressure}]/3$.

Vascular function

Micro- and macrovascular measurements were conducted in a temperature-controlled room maintained at 22-24°C and proceeded 15 minutes following the consumption of the 600 mL of water beverage or the 600 mL commercial SSB, during the measured time period of acute hyperglycemia. Each participant remained in a supine position from the moment they finished consuming the 600 mL test beverage until measurements of vascular function were complete. Microvascular function was assessed on the ventral surface of the right forearm using transdermal iontophoresis in conjunction with laser speckle contrast imaging. Assessment of macrovascular function commenced next on the upper right arm using brachial artery ultrasound coupled with flow-mediated dilation and nitrate-mediated dilation. Blood glucose concentrations and hemodynamic changes were monitored throughout.

Assessment of cutaneous microvascular function

Transdermal iontophoresis delivers a pharmacologically charged solution to the skin allowing for non-invasive assessment of cutaneous microvascular endothelium and vascular smooth muscle (VSM) function.² The vascular response to transdermal iontophoresis was quantified by laser speckle contrast imaging using a 70mW system (PeriCam PSI System®, Perimed, Järfälla, Sweden) with a laser wavelength of 785 nm and laser head working distance set at 15

cm. The laser speckle contrast imaging head unit emits and detects light scattered in the tissue that is partially backscattered by moving blood cells, causing a change in frequency.³ Microvascular blood flux is then calculated using the Doppler principle.³ Laser Doppler measurements were recorded continuously at a frequency of 18 Hz using an interfaced computer with data acquisition software (PimSoft 1.2.2.0[®], Perimed, Järfälla, Sweden). Two adhesive drug delivery electrodes (LI 611, Perimed, Järfälla, Sweden) were installed on the ventral surface of right forearm, avoiding any hair, broken skin, areas of increased skin pigmentation, and visible veins. A dispersive electrode (PF 384, Perimed, Järfälla, Sweden) was positioned approximately 15 cm from each drug delivery electrode to complete the electrical current circuit. The arm was then immobilized with a vacuum cushion prior to commencing the protocol to ensure the participant was positioned as recommended. Following two minutes baseline measurement of basal blood flux, transdermal iontophoresis of acetylcholine 2 % dissolved in sodium chloride 0.9 % and sodium nitroprusside 1 % dissolved in sodium chloride 0.9 % were performed to assess cutaneous microvascular endothelial and VSM function, respectively. An anodal current of 0.02 mA for acetylcholine and a cathodal current of 0.02 mA for sodium nitroprusside were administered simultaneously for 200 and 400 seconds, respectively, using a Micropharmacology system (PF 751 PeriIont USB Power Supply, Perimed, Järfälla, Sweden), avoiding nonspecific vasodilation observed with higher cathodal electrical charges.⁴ Laser speckle contrast imaging was performed throughout. The manufacture's software was used to set regions of interest at 30 mm² that were adjusted retrospectively to find the area of max blood flux during transdermal iontophoresis. Data were exported to Microsoft Excel and analysed off-line. Cutaneous blood flux values were averaged for the 30 seconds immediately prior to the beginning of transdermal iontophoresis for baseline and for the five seconds at the maximal blood flux plateau. Data were reported as blood flux at rest, peak blood flux in response to transdermal iontophoresis, and the relative percentage increase in cutaneous blood flux from baseline measurements; and expressed as perfusion units and cutaneous vascular conductance, which is the flux in perfusion units divided by the mean arterial pressure (mmHg), to account for differences in blood pressure between tests.⁵

Assessment of macrovascular function

All macrovascular measurements were performed as previously described using high-resolution vascular ultrasonography (Vivid I, GE Medical Systems, Milwaukee, USA), with a

10-MHz multi-frequency probe.⁶ Briefly, B-mode images and Doppler signals were simultaneously recorded with ECG data. Arterial diameter was measured on B-mode images in the region of the artery running perpendicular to the ultrasound beam. The operator searched for the largest diameter, strong wall signals, and the longitudinal section of the artery in each image. Time-averaged mean velocity (cm.s^{-1}) was recorded, at the same level, by pulsed wave Doppler with a 45-60° insonation angle. Measurements were corrected for the insonation angle, and the pulsed Doppler sample volume was adjusted to cover the entire width of the vessel. The high-pass Doppler frequency filter was kept at the lower value ensuring rejection of arterial wall motion artefacts, with a cut-off value usually below 100 Hz. The same, well-trained operator (GW) performed all measurements. To assess macrovascular endothelial function, brachial flow-mediated dilation was performed according to the International Brachial Reactivity Task Force Guidelines.⁷ A pneumatic cuff was placed around the right forearm distal to the elbow and the ultrasound probe was positioned approximately midway between the antecubital and axillary regions before baseline measurements of basal brachial artery diameter were performed. The cuff was then inflated to 250 mmHg for five minutes before sudden cuff deflation induced reactive hyperemia and measurements of brachial artery diameter were performed again. Fifteen minutes later, baseline measurements of basal brachial artery diameter were repeated before nitrate-mediated dilation was performed to assess macro-VSM function. As described previously, this procedure involves sublingual delivery of 0.4 mg of glyceryl trinitrate (Nitrolingual® Pumpspray, G. Pohl-Boskamp GmbH & Co, KG, Germany).^{8,9} Data were analysed off-line as the mean of five consecutive measurements using dedicated software (EchoPac 6.0, GE Healthcare, Horten, Norway). Volume blood flow (mL.min^{-1}) was measured as the mean of the five cardiac cycles with the highest systolic velocity following cuff release and reported for the basal state and during peak reactive hyperemia; and expressed as the percentage change from basal measurements. Shear rate (s^{-1}) was calculated as $(4 \times \text{mean systolic velocity})/\text{mean diameter}$ to estimate the shear stress induced by hyperemia; and was expressed as the change from basal measurements (Peak shear rate minus basal shear rate).¹⁰ Flow-mediated dilation and nitrate-mediated dilation in response to post-occlusive reactive hyperemia and nitrate administration, respectively, were expressed as the percentage change in brachial artery diameter from baseline measurements, with and without respect to the change in shear rate.

Protocol Two - Experimental exploration

Animals

Twenty-three male Wistar rats (12 weeks old, 300 ± 50 g; Laboratoire Janvier, France) were housed in controlled conditions at 23-24°C with a normal 12 hours light/dark cycle and free access to water and a commercial standard diet conforming to current French legislation. The local Research Ethics Committee at Avignon University approved this protocol (84004).

Study design

Each rat was randomized into one of three treatment groups using an online sequence generator prior to the *in vivo* assessment of cutaneous microvascular function (Suppl Material Figure I).¹ Rats designated as normoglycemic controls received an intra-peritoneal injection of a 1.5 mL bolus of sodium chloride 0.9 % one hour prior to vascular assessment; while rats designated to perform a glucose tolerance test were treated with either a intra-peritoneal injection of a 1.5 mL bolus of sodium chloride 0.9% one hour prior to vascular assessment or a 1.5 mL bolus of the antioxidant, N-acetylcysteine, at 50 mg.kg⁻¹ body weight 48 hours and one hour prior to vascular assessment. These treatments prior to the glucose tolerance test allowed for assessment of the vascular effect of acute hyperglycemia alone, as well as the interaction between oxidative stress and microvascular function during acute hyperglycemia. Following overnight fasting (12-16 hours) and the designated treatment preparations, each rat was inspected to ensure that the skin on the back was hairless and the hind legs were intact. Experiments were performed in a temperature-controlled enclosure set at 34°C to maintain the skin temperature of each rat at 36-37°C. The rats were anesthetized with an intra-peritoneal injection of sodium pentobarbital at 60 mg.kg⁻¹ and were maintained in a prone position for the duration of the experiment.

Glucose tolerance test

Rats designated to receive the glucose tolerance test were administered an intra-peritoneal injection of a 1.5 mL bolus of 40 % glucose solution at 2g.kg⁻¹ body weight. Rats designated as normoglycemic controls received a second intra-peritoneal injection of sodium chloride in lieu of the glucose tolerance test. Blood samples were collected from the tail for measurement of blood glucose concentrations at 0, 10, 15, 20, 30, 60, 120 minutes following the induction of acute hyperglycemia or administration of the control (sodium chloride) solution.

***In vivo* vascular exploration**

Assessment of cutaneous microvascular function was assessed 10 minutes following the induction of acute hyperglycemia or administration of the control (sodium chloride) treatment using a laser Doppler flowmetry system (Periflux PF5000; Perimed, Järfälla, Sweden) and a thermostatic laser Doppler flowmetry probe (PF 481; Perimed) with an effective surface area of 0.95 cm²; in conjunction with transdermal iontophoresis. Two adhesive drug delivery electrodes containing acetylcholine 2 % dissolved in sodium chloride 0.9 % and sodium nitroprusside 2 % dissolved in sodium chloride 0.9 % were positioned on the inferior-posterior surface of the right and left leg of each rat. Each adhesive drug delivery electrode was inserted with a laser Doppler flowmetry probe. Dispersive electrodes were placed on front paws to complete the electrical current circuit and were connected to a battery powered iontophoresis device (Perilont, Perimed, Järfälla, Sweden). For 60 seconds prior to the commencement of transdermal iontophoresis, baseline cutaneous blood flux of the leg was measured using laser Doppler flowmetry. A single pulse of a 0.1 mA anodal and cathodal current was administered for 20 seconds for acetylcholine and sodium nitroprusside, respectively,¹¹ followed by a further 20 minutes of laser Doppler flowmetry measurements. Data was exported to Microsoft Excel and analysed off-line. Cutaneous blood flux values were averaged for the 10 seconds immediately prior to the beginning of transdermal iontophoresis for baseline measurements and for the period at the maximal blood flux plateau. Data were reported as perfusion units and expressed as the percentage increase in cutaneous blood flux relative to baseline measurements.

***Ex vivo* vascular exploration**

Following *in vivo* assessment, rats were anesthetized using an intra-peritoneal injection of sodium pentobarbital at 120 mg.kg⁻¹ and the intact thoracic aorta was quickly removed and placed in cold Krebs-Henseleit bicarbonate buffer (composition in mM: NaCl 118; NaHCO₃ 25; Glucose 11; KCl 4.8; KH₂PO₄ 1.2; MgSO₄·7H₂O 1.1; CaCl₂ 1.25). Following removal of adherent tissue, the thoracic aorta was cut into 2-3 mm rings and suspended between two wire hooks. The suspended rings were then mounted in an organ chamber with 5 mL Krebs's solution with a pH level of 7.4 at 37°C and continuously gassed with 95 % oxygen and 5 % carbon dioxide, under a resting tension of 2 g. The rings were connected to an isometric force transducer (EMKA technologies, EMKA Paris, France) and linked to an amplifier (EMKA technologies, EMKA Paris, France), as well as a computer acquisition system to record

changes in isometric force. The rings were then allowed to equilibrate for 45 minutes. During this period the tension was verified every 15 minutes and washed with Kreb's solution. Following the equilibration period, the rings were pre-contracted with phenylephrine (10^{-6} M), and relaxed with acetylcholine (10^{-5} M) to functionally confirm the muscular and endothelium integrity. Each ring was then pre-contracted with phenylephrine (10^{-6} M). When a plateau in the effect of pre-contraction was reached, endothelium function was examined by challenging the aortic rings with two cumulative concentration-response curves to administration of acetylcholine (10^{-10} to 10^{-5} M), firstly in the normoglycemic state and then during acute hyperglycemia. Acute hyperglycemia was induced by two hours of hyperglycemic Kreb's solution incubation at glucose concentrations of 30 mM, 100 mM and 200 mM. The interaction between acute microvascular function and oxidative stress was further examined during acute hyperglycemia induced by hyperglycemic Kreb's solution incubation (100 mM) in aortic rings that were pre-treated with N-acetylcysteine (20 mM) for 30 minutes. Data acquisition was performed using IOX (EMKA technologies, EMKA Paris, France). The relaxation response was expressed as a percentage of the pre-contraction induced by phenylephrine.

Western blotting analysis

Proteins from aorta homogenates were separated on polyacrylamide-sodium dodecyl sulphate gels and transferred onto polyvinylidene difluoride membranes. The membranes were incubated overnight with primary antibodies, anti-endothelial nitric oxide synthase (eNOS) III and anti-eNOS-P^{Ser1177} (1:1000 and 1:500, respectively; BD Transduction Laboratory), at 4°C in 10 % milk with Tris-buffered saline containing 0.05 % Tween 20. The eNOS and eNOS-P^{Ser1177} protein contents were expressed relative to the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) content (anti-GAPDH antibody 1: 5000; incubated in 3 % bovine serum albumin, Santa Cruz Biotechnology). Immunodetection was performed using an ECL or ECL Plus System (Supersignal West Pico Chemiluminescence Substrate, Thermo Scientific); and the membranes were exposed to X-ray films for visualization.

Measurement of reactive oxygen species

Production of reactive oxygen species in both normoglycemic and hyperglycemic aortic ring preparations were evaluated by electron paramagnetic resonance in fresh frozen aortic homogenates as previously described.^{12, 13} Aortic ring preparations were then treated with 1

mM CMH (1-hydroxy-3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethyl-pyrrolidine solution) (1:1 v/v), put in the electron paramagnetic resonance glass capillary tube (Noxygen Science Transfer and Diagnostics, Germany) and placed inside the e-scan spectrometer (Bruker, Germany) for data acquisition. Production of reactive oxygen species was normalized to the protein content of each sample and then expressed in $\mu\text{mol}/\text{mn}/\text{mg}$.

Statistical analyses

Sample size was calculated using the results of a similar intervention, which demonstrated that flow-mediated dilation decreased from $6.96 \pm 1.56 \%$ to $4.0 \pm 2.6 \%$ during acute hyperglycemia when compared to the normoglycemic state.¹⁴ Considering this, it was estimated that a total of six participants would be needed to detect a difference between trials, with a one-tailed α of 0.05 and a $1-\beta$ of 0.80. All clinical microvascular and macrovascular data were exported and coded by a researcher (JL) not involved in data collection and analyses in order to blind the investigator. Following checks of distribution, clinical data was then analysed using repeated measures analysis of variance (ANOVA) with a post-hoc Tukey's multiple comparison test to assess differences over time in vascular, hemodynamic, and blood glucose responses to water or SSB consumption. A one-way ANOVA with Fisher post hoc tests was performed to determine differences in the cutaneous microvascular blood flow response to the induction of acute hyperglycemia in rats designated with normoglycemic, acute hyperglycemic only, or acute hyperglycemic-N-acetylcysteine treatments. Differences in *ex vivo* vascular reactivity between the hyperglycemic and normoglycemic conditions were determined using a two-way ANOVA with Bonferroni post hoc tests. All statistical analyses were performed using MedCalc software (bvba, Mariakerke, Belgium) and significance was accepted at $P < 0.05$. All values are reported as mean $\pm$ SEM.

RESULTS

Twelve healthy male participants were recruited and completed this randomized, single-blind, crossover trial between June 9th and July 4th, 2014 (Figure 1). To examine the acute vascular effects of commercial SSB consumption in humans, variables of blood glucose concentration, heart rate, arterial pressure and vascular function were assessed after the ingestion of a commercial SSB and compared to values measured following water consumption (Figure 2). Nutritional information for each beverage is presented in Table 1.

Participant characteristics

Participants included in the study were aged 31 ± 1.9 years with a body mass index of 24.68 ± 0.71 kg/m². At each visit, prior to the consumption of the test beverage, baseline measurements of fasting blood glucose (4.95 ± 0.15 vs. 4.78 ± 0.16 mmol/L, $P>0.05$), heart rate (64.08 ± 3.1 vs. 62.25 ± 3.2 beats.min⁻¹, $P>0.05$), and mean arterial pressure (80.50 ± 1.66 vs. 79.86 ± 1.48 mmHg, $P>0.05$) were found to be similar (Figure 3).

Sugar-sweetened beverage consumption increased blood glucose concentration with no major effect on heart rate or blood pressure.

Ingestion of the SSB significantly elevated blood glucose concentrations 20 minutes (109 ± 6 %) following the beginning of consumption, with peak hyperglycemia (127 ± 3 %) recorded at 40 minutes (Figure 3A). A progressive decrease in blood glucose concentrations was observed between 40 and 75 minutes thereafter. However, blood glucose concentrations at 75 minutes were still significantly greater than baseline blood glucose values (91 ± 7 %) and all blood glucose values measured over time following water consumption. Blood glucose concentrations did not deviate from baseline measurements following water consumption. The SSB-mediated acute hyperglycemia had no major effect on mean arterial pressure. However, a slight but significant reduction in mean arterial pressure was observed during peak hyperglycemia when compared to that at the baseline measurement ($P<0.05$) (Figure 3B). No variations in heart rate were observed during acute hyperglycemia (Figure 3C).

Sugar-sweetened beverage consumption decreased micro- and macrovascular endothelial function

All assessments of micro- and macrovascular function were completed between 20 and 75 minutes following the beginning of SSB consumption, during acute hyperglycemia. Vascular function was assessed in the same time period following water consumption to allow for comparison between the two test beverages.

Assessment of cutaneous microvascular function

Cutaneous microvascular endothelial and VSM function were assessed using laser speckle contrast imaging in conjunction with transdermal iontophoresis of acetylcholine and sodium nitroprusside, respectively. Prior to the beginning of transdermal iontophoresis, there were no differences in baseline measurements of basal cutaneous blood flux between each visit (23.6 ± 1.8 vs. 26.4 ± 1.6 perfusion units, $P=0.23$) (Table 2). An increase in cutaneous blood flux was observed following transdermal iontophoresis of acetylcholine and sodium nitroprusside (Figure 4A). However, the relative percentage increase in cutaneous blood flux in response to acetylcholine iontophoresis was significantly lower during SSB-mediated acute hyperglycemia when compared to that during normoglycemia following water consumption (129.76 ± 11.18 vs. 196.78 ± 20.61 %, respectively, $P<0.01$) (Figure 4B). Even after accounting for differences in blood pressure between visits by converting cutaneous blood flux from perfusion units to cutaneous vascular conductance, the relative increase in cutaneous blood flux mediated by acetylcholine iontophoresis was still lower following ingestion of the SSB than that measured after water consumption (144.2 ± 15.7 vs. 208.3 ± 24.3 %, respectively, $P<0.01$). In contrast, the vascular responses to transdermal iontophoresis of sodium nitroprusside were similar following the consumption of each beverage.

Macrovascular measurements

Endothelial and VSM function were then assessed in the macrocirculation using ultrasound of the brachial artery in conjunction with flow-mediated dilation and nitrate-mediated dilation, respectively. Following the consumption of each test beverage, there were no differences in basal brachial artery diameter or blood flow between visits (4.7 ± 0.1 vs. 4.7 ± 0.1 mm, $P=0.68$; and 48.0 ± 5.7 vs. 53.0 ± 6.5 ml.min⁻¹, $P=0.67$, respectively) (Table 2). Increases in brachial blood flow and the Δ shear rate induced during hyperemia were also similar between each visit (408.3 ± 27.6 vs. 445.1 ± 34.5 ml.min⁻¹, $p=0.19$; and 484.3 ± 32.8 vs. 501.6 ± 37.1 %/s⁻¹, $P=0.51$, respectively). However, flow-mediated dilation was significantly reduced (-23.86 ± 5.33 %) during SSB-mediated acute hyperglycemia when compared to that during

normoglycemia following water consumption; when expressed solely as the percentage change in diameter (6.53 ± 0.61 vs. 8.56 ± 0.54 %, respectively, $P < 0.01$) (Figure 5) and as the percentage change in diameter with respect to the change in shear rate (0.014 ± 0.002 vs. 0.019 ± 0.002 %/ s^{-1} , respectively, $P < 0.01$). In contrast, there were no differences in the responses to nitrate-mediated dilation between each visit.

Endothelial dysfunction following SSB consumption may be associated with an acute hyperglycemic-mediated increase in oxidative stress that decreases NO bioavailability

Given that both flow-mediated dilation and the vascular response to acetylcholine iontophoresis were reduced during SSB-mediated acute hyperglycemia, whilst the vascular responses to nitrate administration were preserved, clinical findings clearly suggest that acute hyperglycemia impairs micro- and macrovascular function via an endothelium-dependent pathway. However, considering that further experimental exploration within vascular tissues of healthy humans is, for ethical reasons, very difficult to perform, the underlying mechanisms by which acute hyperglycemia mediates endothelial dysfunction were evaluated further, both *in vivo* and *ex vivo*, using an experimental rat model (Suppl Material Figure I).

In vivo experimental exploration

Acute hyperglycemia was induced in each rat using an intra-peritoneal injection of glucose that mediated a hyperglycemic plateau between 10 and 20 minutes following administration, with peak hyperglycemia occurring at 15 minutes (Suppl Material Figure IIA). To allow for comparisons between the acute hyperglycemic and normoglycemic conditions, a group of control rats received a placebo injection of sodium chloride. During the acute hyperglycemic plateau, iontophoresis of acetylcholine and sodium nitroprusside were performed inducing a significant increase in cutaneous microvascular blood flux (Figure 6A). However, similar to the findings obtained in human trials, the relative increase in cutaneous blood flux in response to transdermal iontophoresis of acetylcholine was decreased during acute hyperglycemia when compared to the normoglycemic controls, whilst the vascular response to sodium nitroprusside iontophoresis remained preserved (Figure 6B). Such endothelial dysfunction may be primarily caused by an acute hyperglycemic-mediated increase in oxidative stress.¹⁴ Considering this, a third group of rats were treated with a dosage of the antioxidant, N-acetylcysteine, prior to the induction of acute hyperglycemia. Although there was no difference in the acute hyperglycemic response to the intra-peritoneal injection of glucose

between N-acetylcysteine-treated and untreated rats (Suppl Material Figure IIB), the increase in cutaneous blood flux in response to acetylcholine iontophoresis was fully restored in rats treated with the antioxidant (Figure 6B); supporting the implication of increased oxidative stress in acute hyperglycemia-mediated endothelial dysfunction.

Ex vivo experimental exploration

Given that endothelial function is highly dependent on NO bioavailability, which itself is dependent on endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and its activation by phosphorylation at serine 1177 (eNOS^{ser1177}), *ex vivo* experiments were then performed on rat aortic tissue to investigate the interaction between oxidative stress and the NO pathway; and whether this interaction contributes to the endothelial dysfunction observed during acute hyperglycemia. Similar to that observed following SSB consumption in human trials and the intraperitoneal injection of glucose in *in vivo* experimental exploration, acute hyperglycemia induced by the hyperglycemic Kreb's solution decreased the relaxation response to acetylcholine administration in pre-contracted aortic rings in a dose-dependent manner (Suppl Material Figure IIIA and B). However, pre-treatment with N-acetylcysteine restored the relaxation response in aortic rings during acute hyperglycemia (Figure 6C and 6D). Western blotting revealed that acute hyperglycemia tended ($p=0.054$) to mediate a decrease in eNOS^{ser1177} expression in the aortic rings (Figure 6E), while electron paramagnetic resonance measured an elevation in the concentration of reactive oxygen species when compared to the normoglycemic condition (Figure 6F).

DISCUSSION

The present study aimed to assess the effect of acute hyperglycemia induced by the ingestion of a commercial SSB on vascular function in healthy sedentary participants. It was found that SSB consumption decreased both micro- and macrovascular endothelial function, whereas VSM function remained unaffected during acute hyperglycemia. Considering these findings, *in vivo* and *ex vivo* experimental explorations were then performed in an experimental rat model to further investigate the interaction between acute hyperglycemia and vascular function; and examine the underlying mechanisms that may mediate such endothelial dysfunction. Similar to that observed in human trials, acute hyperglycemia mediated a decrease in endothelial function in both *in vivo* and *ex vivo* experimental rat models.

Interestingly, endothelial function was fully restored during acute hyperglycemia in rats and aortic rings that were pre-treated with the antioxidant, N-acetylcysteine. Further to this, it was found that acute hyperglycemia was associated with an increased production in arterial reactive oxygen species and reduced expression of eNOS phosphorylation. Collectively, these findings suggest that acute hyperglycemia induces endothelial dysfunction by mediating an increase in oxidative stress that disrupts normal processes of the eNOS/NO pathway.

It is currently unknown how acute hyperglycemia induced by commercial SSB consumption affects vascular function due to limited and discrepant data. Previous research has most commonly assessed vascular function during acute hyperglycemia induced by a typical oral glucose load using measures of macrovascular reactivity such as brachial artery ultrasound with flow-mediated dilation.⁹ Given that the microcirculation represents most of the arterial vascular network and exerts dominant control over local blood flow,¹⁵ and that emerging evidence suggests that coronary microvascular dysfunction may appear before macrovascular disease, collectively highlights the need to comprehensively assess both micro- and macrovascular function when investigating mechanisms that contribute to the pathogenesis of CVD.¹⁶ The results of this present study are consistent with those of previous research demonstrating that commercial SSB consumption mediates a decrease in macrovascular endothelial function as indicated by reduced flow-mediated dilation during acute hyperglycemia.¹⁷ In contrast, the microcirculatory findings contradict a separate study, which found that consumption of commercial SSB enhances microvascular endothelial function, as indicated by an increased cutaneous blood flux response to transdermal iontophoresis of acetylcholine during acute hyperglycemia.¹⁸ Importantly, it should be noted that the former study of the macrocirculation induced acute hyperglycemia by ingestion of a commercial SSB in conjunction with consumption of a high caloric commercial candy bar. Moreover, the latter study of the microcirculation used a commercial SSB that is defined as an energy drink and contains caffeine, which has been found to enhance microvascular function in healthy subjects.¹⁹ Considering these methods, this present study is, to our knowledge, the first to examine the effects of acute hyperglycemia induced by commercial SSB consumption alone on micro- and macrovascular function. The results of this study also contribute to clarifying the effect of acute hyperglycemia on systemic vascular endothelial function, which in a recent systematic review and meta-analysis was found to be inconclusive due to limited microvascular data and discrepant reporting of shear stress data in studies that used flow-mediated dilation to assess changes in vascular function from normoglycemic to

hyperglycemic states.⁹ Given that this present study found a decrease in flow-mediated dilation during acute hyperglycemia with no reduction in shear stress, a disruption of the NO pathway may be implicated in SSB-mediated endothelial dysfunction.^{20, 21}

Current evidence suggests that acute hyperglycemia induces endothelial dysfunction by mediating an abnormal elevation in oxidative stress that disturbs normal underlying mechanisms of NO synthesis.^{22, 23} In the postprandial state, oxidative metabolism initiates oxidative phosphorylation of adenosine triphosphate at the electron transport chain of the mitochondria, which via the phenomenon of electron leakage causes superoxide generation of reactive oxygen species.²⁴ Moreover, it has been clearly reported that increased glycemia is responsible for the activation of NADPH oxidase, which also contributes to production of the superoxide anion.¹⁰ Although these reactive oxygen species are normally readily detoxified, elevated activity within this mechanism such as that following commercial SSB consumption increases production to a rate beyond suppressive capabilities of the antioxidant systems.²⁵ The implication of oxidative stress in acute hyperglycemia-mediated endothelial dysfunction is further supported by *ex vivo* findings in this present study that demonstrated that acute hyperglycemia increased reactive oxygen species in rat aortic rings. Moreover, treatment with the antioxidant, N-acetylcysteine, was found to attenuate the impaired relaxation response to acetylcholine iontophoresis observed during acute hyperglycemia. Importantly, the applicability of this oxidative stress-dependent mechanism to acute hyperglycemia-mediated endothelial dysfunction in living organisms was also demonstrated in this study, which revealed for the first time in an *in vivo* experimental rat model that antioxidant treatment also fully restores cutaneous microvascular endothelial function during acute hyperglycemia. Given that a decrease in eNOS activation by reduced phosphorylation at serine 1177 was also observed, it is plausible that acute hyperglycemia mediates an increase in oxidative stress that disrupts eNOS phosphorylation, which reduces NO bioavailability and, subsequently, induces endothelial dysfunction. Such mechanisms may also in turn explain the observed protective effect of N-acetylcysteine administration on endothelial function.

Despite not being affected in this present study, previous research has demonstrated decreased VSM function mediated by VSM cell proliferation in as little as 6 hours following the induction of hyperglycemia in animal and *in vitro* studies,²⁶ suggesting a need to extend the typical assessment period of vascular function following SSB consumption in future research. Moreover, considering the global rate of commercial SSB consumption and its role in transient endothelial dysfunction, even in a healthy population, research must also quantify

the relative loading of SSB over time that mediates significant vascular remodelling and contribute to the pathogenesis of CVD in humans.⁹ In addition to examining the underlying mechanisms of NO-mediated microvascular function, future research may also assess the effect of SSB consumption on other main vasoactive mediators such as prostaglandin I₂, endothelium derived hyperpolarizing factor, and endothelin-1, all of which have varying influence between the micro- and macrocirculation.^{7, 11, 27} Finally, these studies need to be conducted across a variety of ethnicities, some of which have previously demonstrated decreased vascular function even at rest and therefore may be more severely impacted by the deleterious vascular-related effects of acute hyperglycemia than that observed in Caucasian populations.^{28, 29}

Several inherent limitations must be considered when interpreting this data. Whereas the main sugar in SSB is sucrose, which is comprised of glucose and fructose, only glucose was used to induce acute hyperglycemia in the experimental rat model used to explain the effects of SSB consumption on underlying mechanisms of vascular function. However, it has previously been suggested that the deleterious cardiovascular effects of sucrose are more related to glucose rather than fructose.^{11, 30} It must also be considered that ingredients other than sucrose that comprise commercial SSB were not evaluated individually in this research and, therefore, it is not known how they may contribute to the observed SSB-mediated endothelial dysfunction. Additionally, it was not possible to blind participants to the intervention by using a sugar-free placebo such as a commercial diet soda due to previous research suggesting that even artificial sweeteners may interact with taste receptors stimulating insulin secretion, which may induce a vascular response.³¹ Given that changes in blood insulin concentration in response to SSB consumption were not monitored in this study, it was not possible to explore what effect SSB consumption may have on mechanisms of insulin-mediated vasodilation. Finally, vascular function was assessed in a focussed sample and, therefore, the effect of SSB consumption may vary across health groups, ethnicities and genders.

In conclusion, this present study is, to our knowledge, the first to assess vascular function during acute hyperglycemia induced by SSB consumption alone. The findings of this study demonstrate that commercial SSB consumption induces micro- and macrovascular endothelial dysfunction in a healthy population. Furthermore, data from the experimental rat model suggest that this commercial SSB-mediated endothelial dysfunction is partly due to increased oxidative stress, which reduces NO bioavailability by disrupting processes crucial

to its synthesis. Ultimately, such results inform international public health policy on the adverse effects of both commercial SSB and general excess sugar consumption; and how they contribute so acutely, even in those considered healthy, to the upregulation of mechanisms that are the primary precursors to the pathogenesis of CVD.³²

ACKNOWLEDGEMENTS

a) Acknowledgements: GW was responsible for the concept and design of the study. CM, GM and GW performed data acquisition. JL exported and blinded the data. CM and GW analysed the data. GW provided statistical expertise. JL, CM, CR and GW interpreted the data. JL, CM and GW performed drafting of the manuscript. JL, CM, RW, CL, DSR, SS, CR, GM and GW provided administrative, technical or material support; and critically revised the manuscript for important intellectual content. All authors approved the final version of the manuscript.

b) Sources of funding: JL is supported by a Postgraduate Scholarship from the National Health and Medical Research Council of Australia. GW is supported by a grant (sabbatical) from the French Ministry of Research for this research. SS is supported by the National Health and Medical Research Council of Australia.

c) Disclosures: The authors have no conflicts to disclose.

REFERENCES

1. Brown C, Dulloo A, Montani J. Sugary drinks in the pathogenesis of obesity and cardiovascular diseases. *International Journal of Obesity*. 2008;32:S28-S34.
2. Huang C, Huang J, Tian Y, Yang X, Gu D. Sugar sweetened beverages consumption and risk of coronary heart disease: A meta-analysis of prospective studies. *Atherosclerosis*. 2014;234:11-16.
3. Hu FB, Malik VS. Sugar-sweetened beverages and risk of obesity and type 2 diabetes: Epidemiologic evidence. *Physiol Behav*. 2010;100:47-54.
4. O'Connor L, Imamura F, Lentjes MA, Khaw KT, Wareham NJ, Forouhi NG. Prospective associations and population impact of sweet beverage intake and type 2 diabetes, and effects of substitutions with alternative beverages. *Diabetologia*. 2015;58:1474-1483.
5. World Health Organisation. Cardiovascular diseases fact sheet.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>. Accessed April 1, 2016.
6. Souza EG, De Lorenzo A, Huguenin G, Oliveira GM, Tibirica E. Impairment of systemic microvascular endothelial and smooth muscle function in individuals with early-onset coronary artery disease: Studies with laser speckle contrast imaging. *Coron Artery Dis*. 2014;25:23-28.
7. Feletou M, Vanhoutte PM. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: Where are we now? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26:1215-1225.
8. Maiorana A, O'Driscoll G, Taylor R, Green D. Exercise and the nitric oxide vasodilator system. *Sports Med*. 2003;33:1013-1035.
9. Loader J, Montero D, Lorenzen C, Watts R, Meziat C, Reboul C, Stewart S, Walther G. Acute hyperglycemia impairs vascular function in healthy and cardiometabolic diseased subjects: Systematic review and meta-analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015;35:2060-2072.
10. Mah E, Bruno RS. Postprandial hyperglycemia on vascular endothelial function: Mechanisms and consequences. *Nutr Res*. 2012;32:727-740.
11. Mah E, Noh SK, Ballard KD, Matos ME, Volek JS, Bruno RS. Postprandial hyperglycemia impairs vascular endothelial function in healthy men by inducing lipid peroxidation and increasing asymmetric dimethylarginine:Arginine. *J Nutr*. 2011;141:1961-1968.

-
12. Forstermann U, Munzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: From marvel to menace. *Circulation*. 2006;113:1708-1714.
 13. Li PL, Zhang Y. Cross talk between ceramide and redox signaling: Implications for endothelial dysfunction and renal disease. *Handb Exp Pharmacol*. 2013:171-197.
 14. Ceriello A, Taboga C, Tonutti L, Quagliario L, Piconi L, Bais B, Da Ros R, Motz E. Evidence for an independent and cumulative effect of postprandial hypertriglyceridemia and hyperglycemia on endothelial dysfunction and oxidative stress generation: Effects of short- and long-term simvastatin treatment. *Circulation*. 2002;106:1211-1218.
 15. Roustit M, Cracowski JL. Assessment of endothelial and neurovascular function in human skin microcirculation. *Trends Pharmacol Sci*. 2013;34:373-384.
 16. Jzerman RG, de Jongh RT, Beijik MA, van Weissenbruch MM, Delemarre-van de Waal HA, Serne EH, Stehouwer CD. Individuals at increased coronary heart disease risk are characterized by an impaired microvascular function in skin. *Eur J Clin Invest*. 2003;33:536-542.
 17. Weiss EP, Arif H, Villareal DT, Marzetti E, Holloszy JO. Endothelial function after high-sugar-food ingestion improves with endurance exercise performed on the previous day. *Am J Clin Nutr*. 2008;88:51-57.
 18. Grasser EK, Yepuri G, Dulloo AG, Montani JP. Cardio- and cerebrovascular responses to the energy drink red bull in young adults: A randomized cross-over study. *Eur J Nutr*. 2014;53:1561-1571.
 19. Noguchi K, Matsuzaki T, Sakanashi M, Hamadate N, Uchida T, Kina-Tanada M, Kubota H, Nakasone J, Sakanashi M, Ueda S, Masuzaki H, Ishiuchi S, Ohya Y, Tsutsui M. Effect of caffeine contained in a cup of coffee on microvascular function in healthy subjects. *J Pharmacol Sci*. 2015;127:217-222.
 20. Mitchell GF, Parise H, Vita JA, Larson MG, Warner E, Keaney JF, Jr., Keyes MJ, Levy D, Vasan RS, Benjamin EJ. Local shear stress and brachial artery flow-mediated dilation: The framingham heart study. *Hypertension*. 2004;44:134-139.
 21. Thijssen DH, Black MA, Pyke KE, Padilla J, Atkinson G, Harris RA, Parker B, Widlansky ME, Tschakovsky ME, Green DJ. Assessment of flow-mediated dilation in humans: A methodological and physiological guideline. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;300:H2-12.

-
22. Monnier L, Mas E, Ginet C, Michel F, Villon L, Cristol JP, Colette C. Activation of oxidative stress by acute glucose fluctuations compared with sustained chronic hyperglycemia in patients with type 2 diabetes. *Jama*. 2006;295:1681-1687.
 23. Zheng F, Lu W, Jia C, Li H, Wang Z, Jia W. Relationships between glucose excursion and the activation of oxidative stress in patients with newly diagnosed type 2 diabetes or impaired glucose regulation. *Endocrine*. 2010;37:201-208.
 24. Cadenas E, Davies KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med*. 2000;29:222-230.
 25. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001;414:813-820.
 26. Sun J, Xu Y, Dai Z, Sun Y. Intermittent high glucose enhances proliferation of vascular smooth muscle cells by upregulating osteopontin. *Mol Cell Endocrinol*. 2009;313:64-69.
 27. Muniyappa R, Sowers JR. Role of insulin resistance in endothelial dysfunction. *Rev Endocr Metab Disord*. 2013;14:5-12.
 28. Ozkor MA, Rahman AM, Murrow JR, Kavtaradze N, Lin J, Manatunga A, Hayek S, Quyyumi AA. Differences in vascular nitric oxide and endothelium-derived hyperpolarizing factor bioavailability in blacks and whites. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34:1320-1327.
 29. Melikian N, Wheatcroft SB, Ogah OS, Murphy C, Chowienczyk PJ, Wierzbicki AS, Sanders TA, Jiang B, Duncan ER, Shah AM, Kearney MT. Asymmetric dimethylarginine and reduced nitric oxide bioavailability in young black african men. *Hypertension*. 2007;49:873-877.
 30. Grasser EK, Dulloo A, Montani JP. Cardiovascular responses to the ingestion of sugary drinks using a randomised cross-over study design: Does glucose attenuate the blood pressure-elevating effect of fructose? *Br J Nutr*. 2014;112:183-192.
 31. Pepino MY. Metabolic effects of non-nutritive sweeteners. *Physiol Behav*. 2015
 32. Sugar intake: Lowering the bar. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2015;3:305.
 33. United States Department of Agriculture. National nutrient database for standard reference release 27. <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/search/list>. Accessed March 11, 2015

Significance

- To our knowledge, this study is the first to examine the effects of acute hyperglycemia induced by consumption of a commercial sugar-sweetened beverage alone on vascular function.
- Consumption of commercial sugar-sweetened beverages induces acute hyperglycemia that mediates a transient endothelial dysfunction in the micro- and macrocirculation, even in those considered to be healthy.
- Findings from an *in vivo* and *ex vivo* experimental rat model suggest that acute hyperglycemia is associated with an increase in oxidative stress that decreases endothelial nitric oxide synthase activation by disrupting phosphorylation at serine 1177, thus reducing nitric oxide bioavailability that subsequently induces endothelial dysfunction.

TABLES

Table 1. Nutrient composition of each test beverage

	WATER	SSB
Volume, <i>mL</i>	600	600
Energy, <i>kJ</i>	0	1200
Protein, <i>g</i>	0	0.30
Fat		
- Total, <i>g</i>	0	0
- Saturated, <i>g</i>	0	0
Carbohydrate, <i>g</i>	0	72.4
- Sugars, <i>g</i>	0	72.4
Calcium, <i>mg</i>	18	N/A
Magnesium, <i>mg</i>	6	N/A
Sodium, <i>mg</i>	24	108
Zinc, <i>mg</i>	0.06	N/A
Ingredients	Tap water	Carbonated water, sugar, reconstituted lemon juice (5 %), food acids (330,331, natural flavor, preservatives (211, 223), natural colour (safflower extract)

Nutrient composition of water was obtained from the United States Department of Agriculture Nutrient Database Standard Reference Release 27.³³ Nutrient composition for the commercial SSB was obtained from the nutrition information label on packaging. Participants consumed 600 mL of water or commercial SSB 15 minutes prior to the beginning of vascular assessment. Participants completed trials on separate days for each test beverage in a randomized order.

Table 2. Microvascular and macrovascular function in response to water and commercial SSB consumption in healthy subjects.

	WATER	SSB	P-value
<i>n</i>	12	12	
Microcirculation			
Basal CBF (PU)	23.6 ± 1.8	26.4 ± 1.6	<i>p</i> =0.231
Peak ACh CBF (PU)	70.9 ± 8.0	63.0 ± 6.4	<i>p</i> =0.346
Peak SNP CBF (PU)	101.2 ± 6.0	101.9 ± 7.4	<i>p</i> =0.934
ACh CVC increase (%)	208.3 ± 24.3	144.2 ± 15.7*	<i>p</i> =0.008
SNP CVC increase (%)	360.3 ± 26.7	355.9 ± 29.3	<i>p</i> =0.926
Skin resistance (Ω)	399.4 ± 41.3	395.6 ± 30.2	<i>p</i> =0.872
Macrocirculation			
Basal brachial artery diameter (mm)	4.7 ± 0.1	4.7 ± 0.1	<i>p</i> =0.684
Basal brachial blood flow (ml.min ⁻¹)	48.0 ± 5.7	53.0 ± 6.5	<i>p</i> =0.673
Peak brachial blood flow (ml.min ⁻¹)	408.3 ± 27.6	445.1 ± 34.5	<i>p</i> =0.194
Δshear rate (%/s ⁻¹)	484.3 ± 32.8	501.6 ± 37.1	<i>p</i> =0.506
FMD/Δshear rate (%/s ⁻¹)	0.019 ± 0.002	0.014 ± 0.002*	<i>p</i> <0.001
Brachial hyperemia (%)	886.4 ±	855.5 ± 107.7	<i>p</i> =0.693

Values are mean ± SEM. SSB indicates sugar-sweetened beverage; CBF, cutaneous blood flux; PU, perfusion units; ACh, acetylcholine; SNP, sodium nitroprusside; CVC, cutaneous vascular conductance; FMD, flow-mediated dilation. Δshear rate means peak brachial shear rate minus resting brachial shear rate. P-value was estimated by repeated measures ANOVA followed by post-hoc Tukey's multiple comparison tests. **P*<0.05 vs. water.

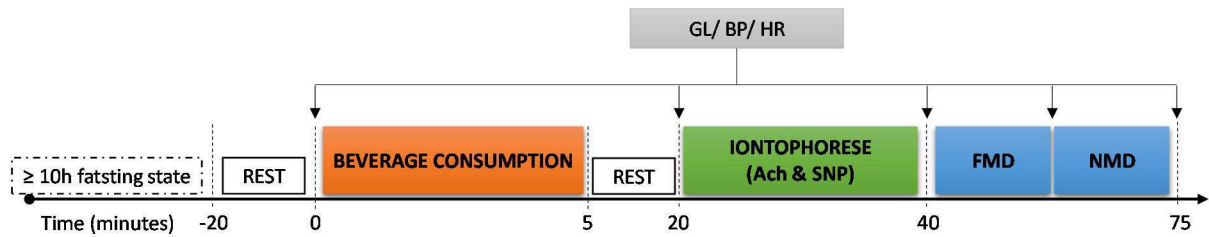


Figure 1. Study design: sequence of testing. In a fasted state (≥ 10 h) participants rested for 20 minutes before consuming 600 mL (20 oz) of water or sugar-sweetened beverage (SSB) within a 5 minute period. Participants then rested for a further 15 mins before iontophoresis of acetylcholine (ACh) and sodium nitroprusside (SNP) were performed. Immediately following the conclusion of iontophoresis, flow-mediated dilation (FMD) and nitrate-mediated dilation (NMD) were also performed. Blood glucose (GL), blood pressure (BP), and heart rate (HR) were measured after the 20 min resting period, 15 minutes after consuming the test beverage, at the end of iontophoresis, at the end of FMD, and at the end of NMD. All 12 participants were administered the water beverage or commercial SSB in a randomized order.

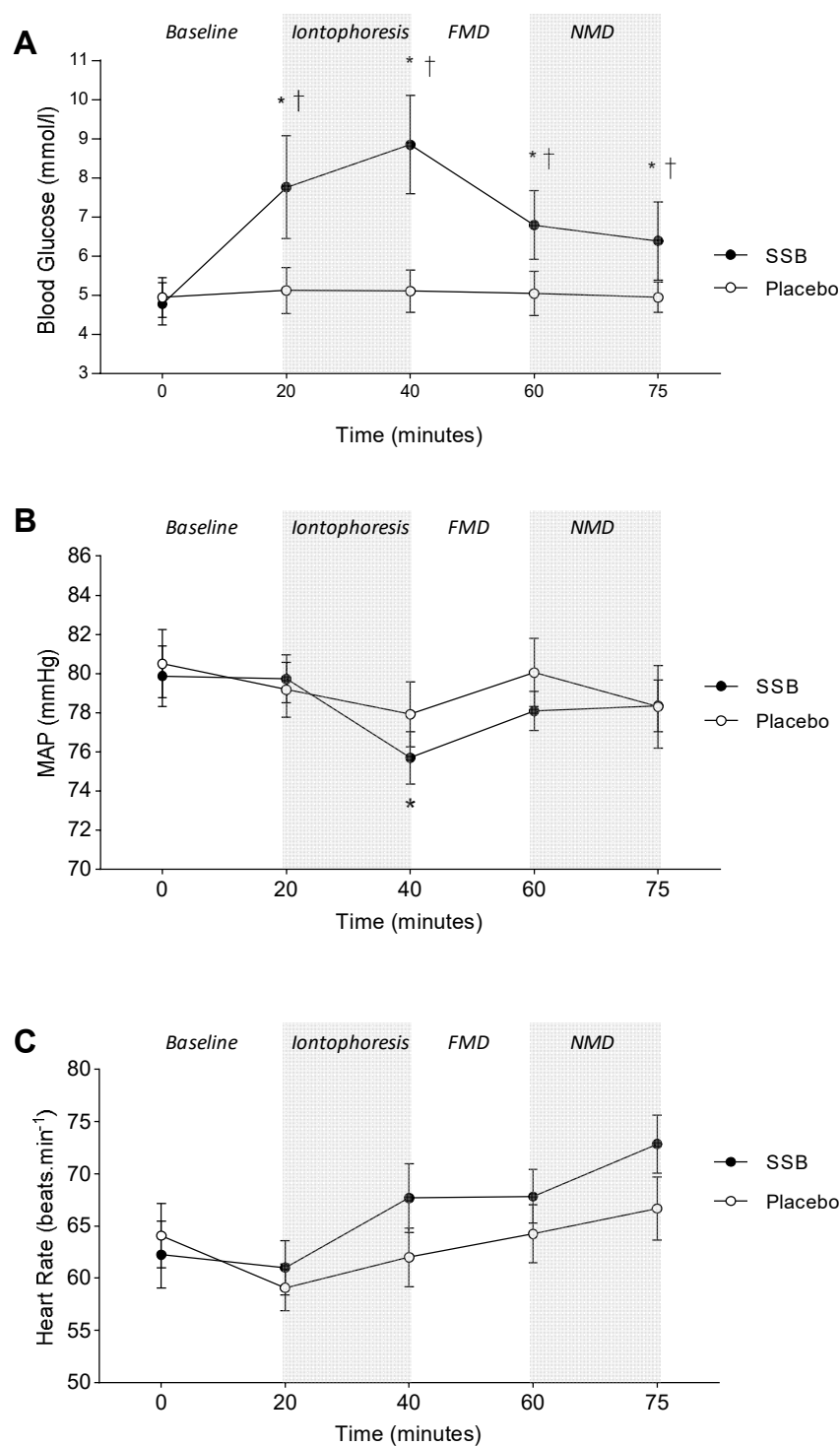


Figure 3. Changes in A) blood glucose concentrations, B) mean arterial pressure (MAP), and C) heart rate over time in response to consumption of 600mL of water or commercial sugar-sweetened beverage (SSB). * $P < 0.05$ vs. baseline; † $P < 0.05$ vs. water.

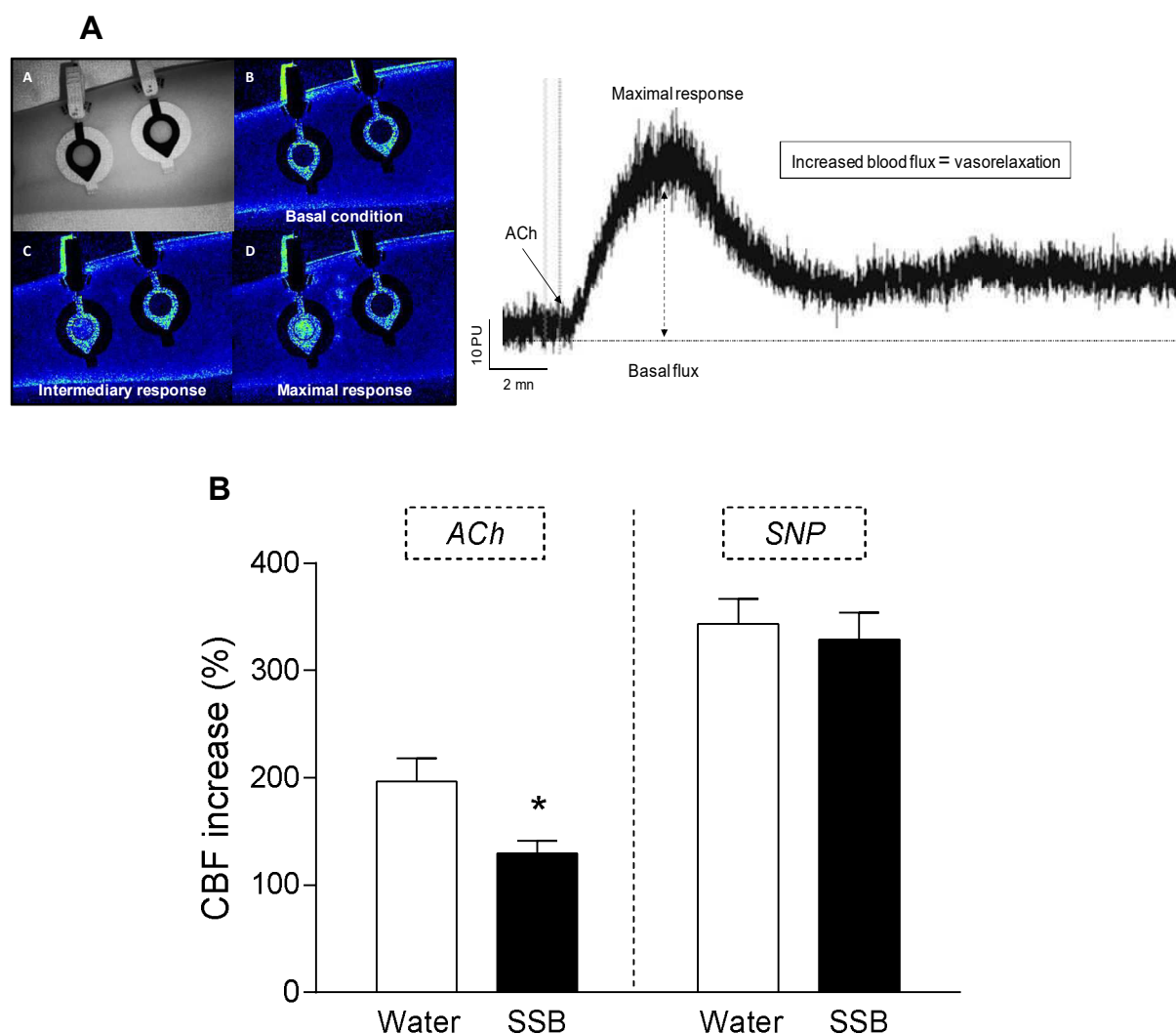


Figure 4. Microvascular function in healthy participants following consumption of 600 mL of water or commercial sugar-sweetened beverage (SSB). (A) Left: Laser speckle contrast imaging electrode position on the right forearm. Right: Representative curve of cutaneous blood flux (CBF) during acetylcholine (ACh) iontophoresis. (B) The percentage increase from baseline in CBF in response to transdermal iontophoresis of acetylcholine (ACh) and sodium nitroprusside (SNP). * $P < 0.01$ vs. water.

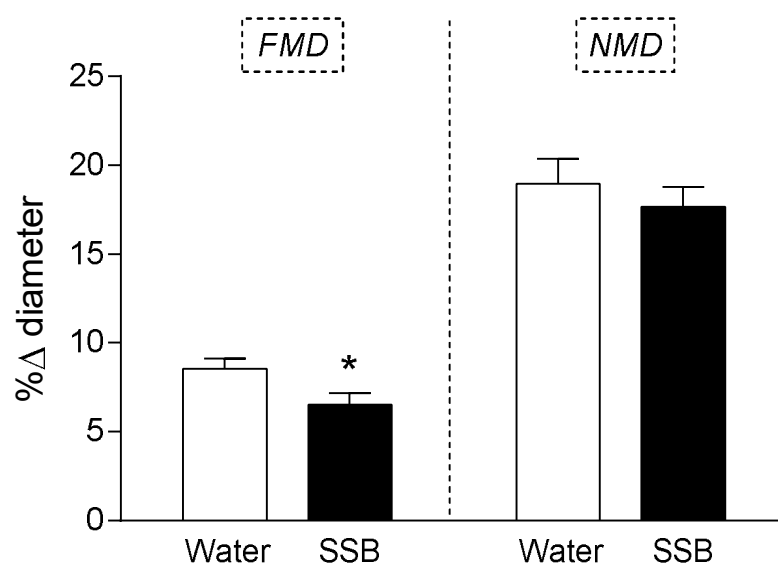


Figure 5. Macrovascular function in healthy participants following consumption of 600 mL of water or commercial sugar-sweetened beverage (SSB). The percentage change from baseline in brachial artery diameter in response to flow-mediated dilation (FMD) and nitrate-mediated dilation (NMD). * $P < 0.01$ vs. water.

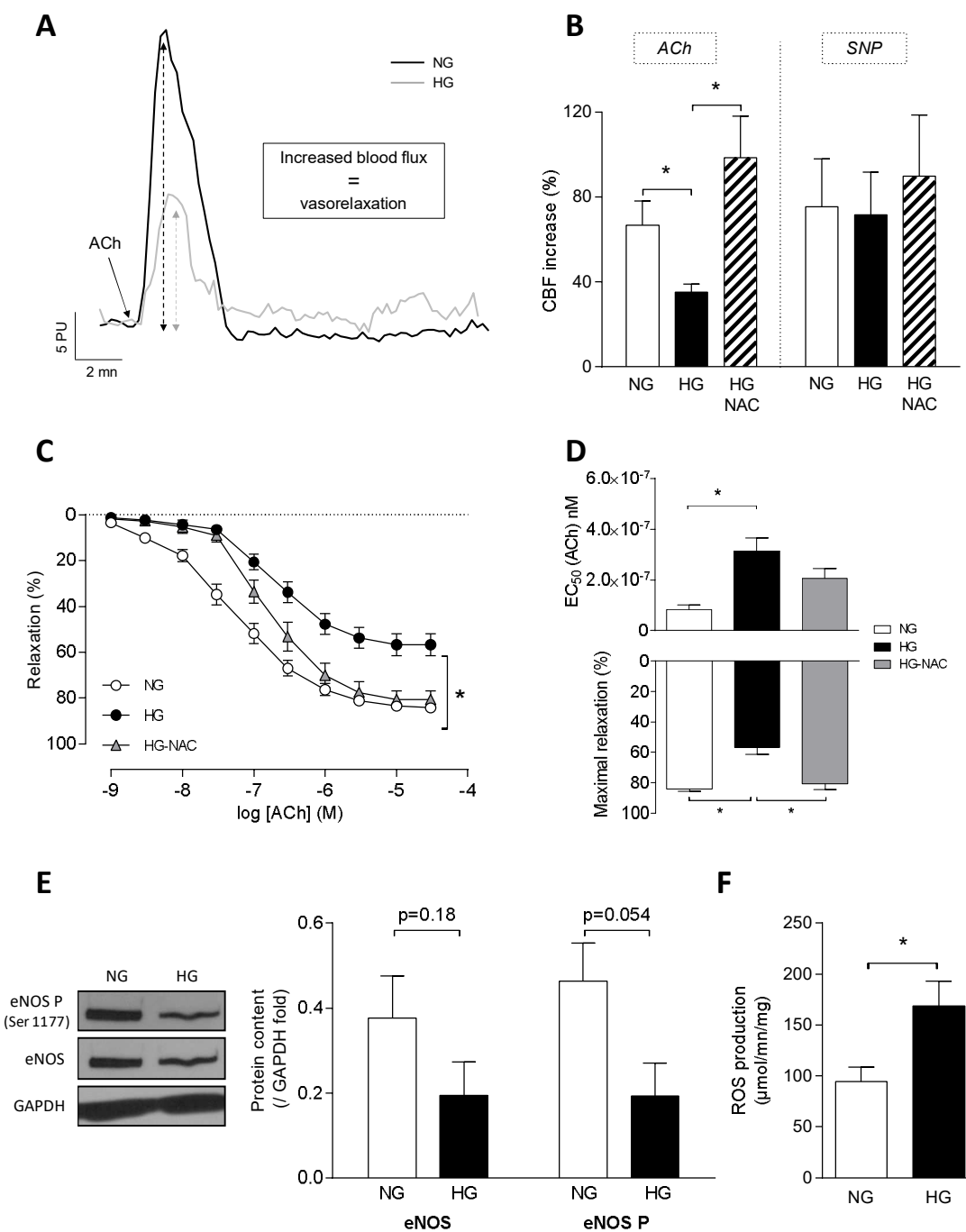
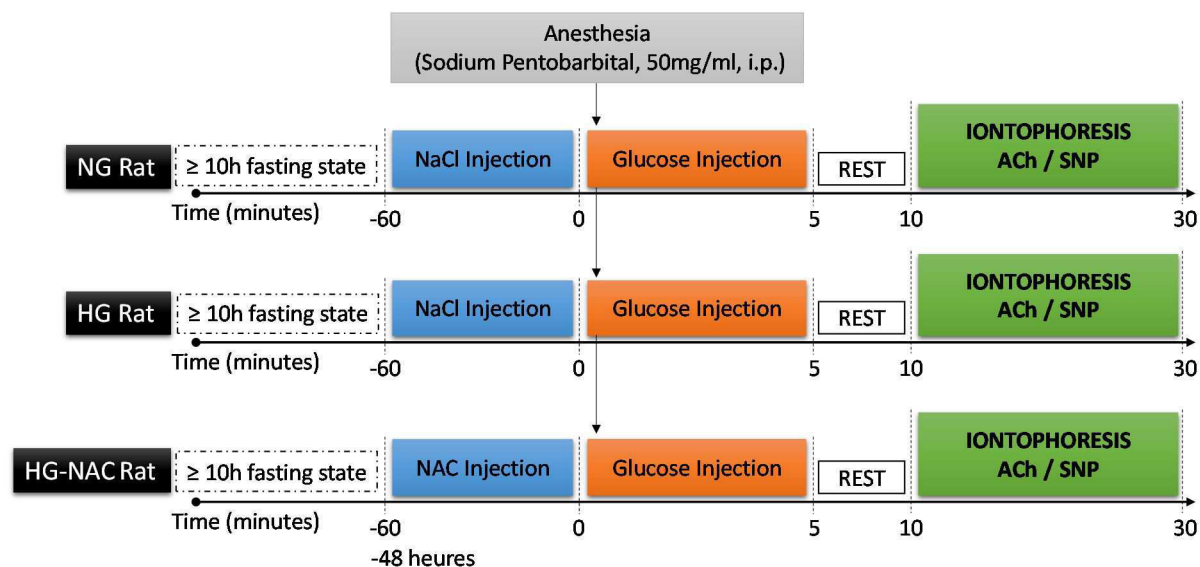
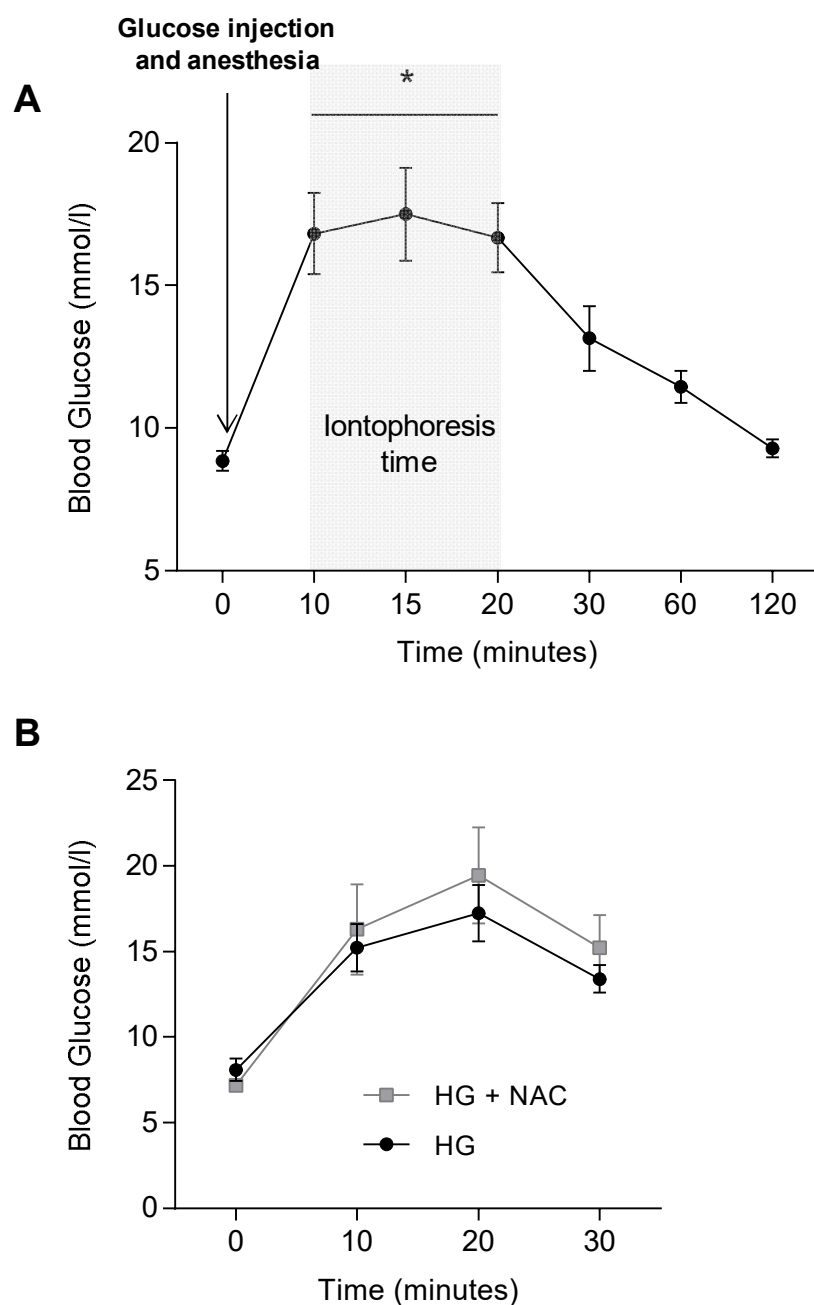


Figure 6. Implication of oxidative stress in endothelial dysfunction during acute hyperglycemia. (A) Representative curve of cutaneous microvascular blood flux (CBF) during normoglycemia (NG) and acute hyperglycemia (HG) in response to acetylcholine (ACh) iontophoresis in rats (B) The percentage increase from baseline in CBF following sodium chloride administration in NG rats; and following induction of HG in rats pre-treated with sodium chloride in order to examine the effect of HG alone, or rats pre-treated with N-acetylcysteine (NAC) to evaluate implication of oxidative stress in endothelial dysfunction. (C) A dose response curve to ACh during NG and HG (100 mM) in pre-contracted aortic rings and during HG (100 mM) in pre-contracted rings pre-incubated in NAC (20 mM) (D) Up: Concentration of ACh administered to induce 50 % of the maximal relaxation response to

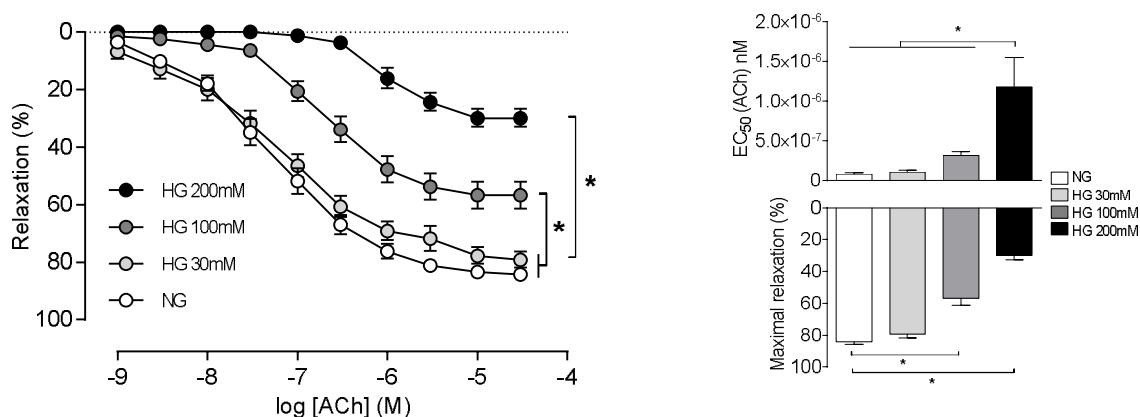
ACh in NG, HG and HG-NAC aortic ring preparations; Down: Maximal relaxation of aortic ring preparations in response to administration of ACh expressed as the percent relaxation relative to the measured pre-contraction with phenylephrine (10^{-6} mM). **(E)** Expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and its activation by phosphorylation (P) at serine 1177 analysed by western blotting in NG aortic preparations; and aortic preparations pre-incubated in HG Kreb's solution (glucose concentration: 100 mM). **(F)** Production of reactive oxygen species (ROS) evaluated by electron paramagnetic resonance in NG aortic preparations; and aortic preparations pre-incubated with HG Kreb's solution (glucose concentration: 30 mM). * $P < 0.05$.



Supplemental Material Figure 1 : Study design of experimental exploration. In a fasted state (≥ 10 hours), following pre-treatments with sodium chloride (NaCl), N-acetylcysteine (NAC), or tetrahydrobiopterin (BH₄), rats were anesthetized using sodium pentobarbital (50mg.kg⁻¹). Rats then received an intra-peritoneal injection of NaCl (for NG rats) or glucose (2g/kg) before acclimatizing for 10 minutes in an incubator to maintain skin temperature at 37°C. Iontophoresis of acetylcholine (ACh) and sodium nitroprusside (SNP) were then performed. Rats were randomized each treatment group.



Supplemental Material Figure II. (A) Time course of blood glucose concentrations following glucose injection (2 g/kg, 1.5 ml) in rats. (B) Time course of blood glucose concentrations following glucose injection in rats pre-treated with sodium chloride only (HG) or N-acetylcysteine (HG-NAC). * $P < 0.05$ vs baseline.



Supplemental Material Figure III. (A) Dose response curve to acetylcholine (ACh) in normoglycemic (NG) pre-contracted aortic ring preparations; and pre-contracted aortic preparations incubated with incremental concentrations of a hyperglycemic (HG) Krebs's solution (glucose concentrations: 30, 100 and 200 mM). (B) **Up:** Concentration of ACh administered to induce 50 % of maximal relaxation response to ACh in NG aortic ring preparations; and aortic preparations pre-incubated with incremental concentrations of a HG Krebs's solution (glucose concentrations: 30, 100 and 200 mM). **Down:** Maximal relaxation of aortic ring preparations in response to administration of ACh expressed as the percent relaxation relative to the measured pre-contraction with phenylephrine (10⁻⁶ mM). *P<0.05.

Résultats additionnels

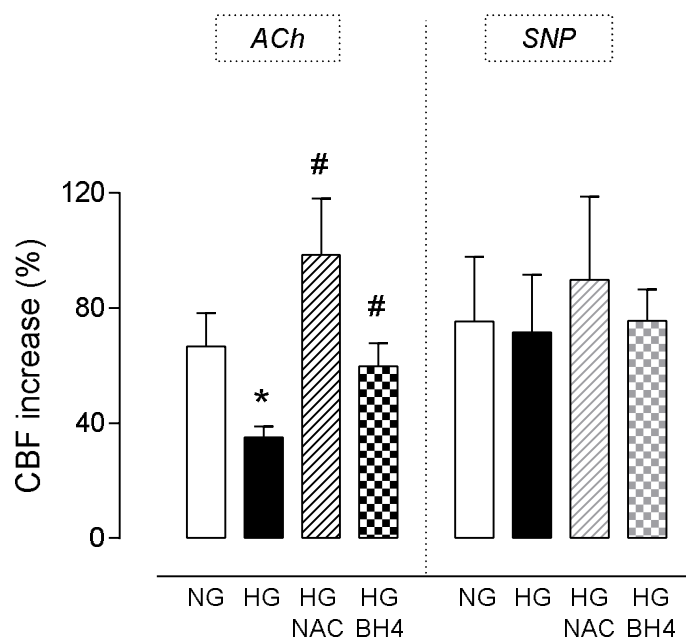


Figure 34 : Flux sanguin cutané (CBF : cutaneous blood flow) de rats sains en situation normoglycémique (NG) ou en réponse à une hyperglycémie aigue (HG).

Pourcentage d'augmentation par rapport à l'état basal du flux sanguin cutané mesuré par Laser Doppler, en réponse à une iontophorèse d'acétylcholine (ACh) et de nitroprussiate de sodium (SNP), permettant d'évaluer respectivement la fonction de relaxation vasculaire endothélium-dépendante et - indépendante. Ces tests ont été réalisés après avoir administré du chlorure de sodium (i.p.) chez les rats NG, ou du glucose (2g/kg, i.p.) pour les rats HG, HG-BH₄, et HG-NAC. Les animaux HG-NAC étaient prétraités au N-acétylcystéine afin d'évaluer l'implication du stress oxydant, et les animaux HG-BH₄ étaient prétraités à la tétrahydrobioptérine afin d'évaluer l'état de couplage de la eNOS. *: $p < 0.05$ vs NG, #: $p < 0.05$ vs HG. Les valeurs sont exprimées en moyenne $\pm$ SEM.

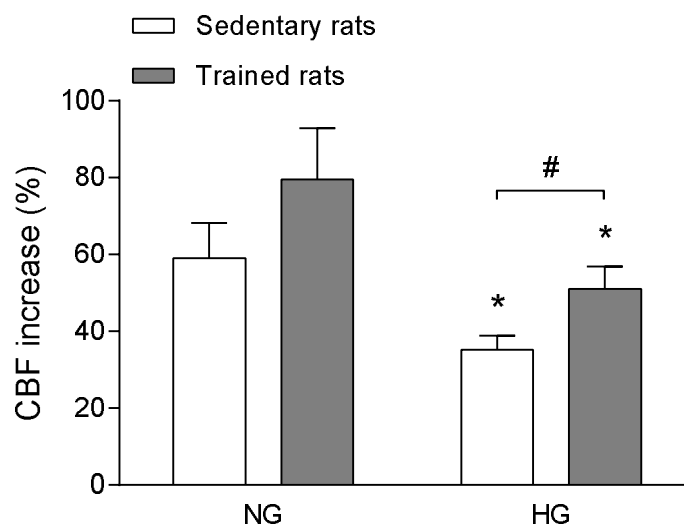


Figure 35 : Flux sanguin cutané (CBF : cutaneous blood flow) de rats sédentaires et entraînés en situation normoglycémique (NG) ou en réponse à une hyperglycémie aigue (HG). Pourcentage d'augmentation par rapport à l'état basal du flux sanguin cutané mesuré par Laser Doppler, en réponse à une iontophorèse d'acétylcholine. Ces tests ont été réalisés après avoir administré du chlorure de sodium (i.p.) chez les rats NG, ou du glucose (2g/kg, i.p.) pour les rats HG, sur des rats sédentaires et entraînés, au terme du protocole d'entraînement. *: $p < 0.05$ vs NG, # : $p < 0.05$ vs HG. Les valeurs sont exprimées en moyenne $\pm$ SEM.

ETUDE N°2

La fonction endothéliale vasculaire masque l'effet vasopresseur du système nerveux sympathique chez le rat syndrome métabolique.

~ • ~

Vascular endothelial function masks increased sympathetic vasopressor activity in rats with metabolic syndrome.

S. Battault, C. Meziat, A. Nascimento, L. Braud, J. Peyrol, S. Gayraud, G. Walther, C. Legros,
F. De Nardi, J. Draï, O. Cazorla, J. Thireau, G. Meyer*, C. Reboul*

Soumis dans *Journal of Hypertension*

RÉSUMÉ D'ARTICLE

Contexte scientifique

Le syndrome métabolique est caractérisé par différents facteurs de risques interdépendants, dont l'obésité viscérale et une intolérance au glucose associée à une dérégulation de l'insulinémie. Ces facteurs peuvent être responsables du déclenchement d'une hypertension artérielle, notamment en favorisant l'hyper-activation du système nerveux sympathique (SNS). Ce dernier est responsable d'une augmentation du tonus vasculaire et des résistances vasculaires périphériques. Cependant, malgré une augmentation de l'activité sympathique chez certains sujets obèses ou souffrant de syndrome métabolique, le tonus vasculaire et la pression artérielle ne sont pas toujours altérés (Huggett et al. 2004; Agapitov et al. 2008).

Il est bien décrit à ce jour que la régulation du tonus vasculaire est localement assurée par les agents vasoactifs produits par les cellules endothéliales, et notamment par le monoxyde d'azote (NO). Cet agent vasodilatateur joue un rôle important dans le contrôle du tonus vasculaire et donc de la pression artérielle. Ce gazotransmetteur pourrait être responsable d'une hypo-réactivité vasculaire face à une stimulation adrénergique, et ainsi limiter les effets néfastes induits par une sur-activation du SNS. **Ainsi, l'hypothèse de cette étude n°2 était que les effets vasoconstricteurs et hypertenseurs de l'hyperactivité du SNS, chez un modèle rat syndrome métabolique normotendu, pourraient être compensés par une biodisponibilité supérieure du NO au niveau vasculaire.**

Méthodologie

Des rats Wistars ont été soumis à un régime enrichi en lipide et en sucre (HFS : *high fat high sucrose*) pendant 15 semaines, permettant d'induire un syndrome métabolique.

L'activité du SNS a été évaluée grâce à une analyse des domaines fréquentiels de la variabilité de la fréquence cardiaque, et par un bilan des catécholamines circulantes (noradrénaline et adrénaline). La perfusion sanguine a été évaluée par une technique de laser doppler au niveau de la microcirculation cutanée, et la pression artérielle a été mesurée par la technique dite de « tailcuff » utilisant un brassard caudal. L'implication du NO dans la régulation du tonus vasculaire a été évaluée en mesurant la pression artérielle d'animaux préalablement traités à la L-NAME (20mg/kg).

Une exploration ex vivo de la réactivité vasculaire aortique, a permis de mettre en évidence le rôle de l'endothélium et du NO dans la régulation de la vasomotricité au cours d'un stress adrénergique. Enfin, l'expression et la phosphorylation de la eNOS (Ser1177) suite à un stress α -adrénergique ont été mesurées par western blot.

Résultats majeurs

Les animaux nourris avec un régime HFS présentaient une obésité viscérale et une hyperinsulinémie, associées à une hyperactivité du SNS. Néanmoins, ces animaux ne présentaient pas d'hypertension artérielle. De façon intéressante, nous avons pu mesurer une hyporeactivité vasculaire en réponse à un stress α 1-adrénergique (phényléphrine) sans changement apparent du niveau de l'expression des récepteurs α 1-adrénergiques. Cette hyporéactivité semble être liée à un phénomène endothélium- et eNOS-dépendant, impliquant l'hyperactivation de la eNOS au cours d'un stress adrénergique. **Ainsi, ces travaux démontrent l'implication de l'endothélium et plus particulièrement de la voie eNOS/NO dans le maintien d'une pression artérielle normale malgré une hyperactivation sympathique caractéristique d'un syndrome métabolique.**

Vascular endothelial function masks increased sympathetic vasopressor activity in rats with metabolic syndrome.**Running Head:** Endothelial control of blood pressure.

S. BATTAULT^a, C. MEZIAT^a, A. NASCIMENTO^a, L. BRAUD^b, J. PEYROL^a, S. GAYRARD^a, G. WALTHER^a, C. LEGROS^c, F. DE NARDI^c, J. DRAI^d, O. CAZORLA^e, J. THIREAU^e, G. MEYER^{af}, C. REBOUL^{af}

^a Laboratoire de Pharm-Ecologie Cardiovasculaire, EA4278, Avignon University, F-84000 Avignon, France

^b EB2M-PROTEE, EA 3819, Université de Toulon, F-83957 La Garde, France

^c Laboratoire de Biologie Neurovasculaire et Mitochondriale Intégrée CNRS UMR 6214, INSERM U1083, Université d'Angers, F-49045, Angers, France.

^d Fédération de Biochimie, Unité de Biochimie Métabolique et Moléculaire, Centre Hospitalier Lyon-Sud, F-69495, Pierre-Bénite, France

^e Laboratoire Physiologie et Médecine Expérimentale du Cœur et des Muscles, INSERM U-1046, CNRS UMR 9214, Université de Montpellier, F-34295 Montpellier, France.

^f Senior co-authors

Financial support:

S. Battault salary was supported by Laboratoire-Lescuyer.

Disclosures

No author reports conflict of interest.

Correspondence and requests for reprints to:**G. Meyer**

Laboratoire de Pharm-Ecologie Cardiovasculaire (EA4278),

Faculty of Sciences, Avignon University,

33 rue Louis Pasteur, 84000 Avignon, France

Phone: +33 490162944 ; Fax: +33 490162901 ; E-mail : gregory.meyer@univ-avignon.fr

Word count : 5389**Number of tables : 0****Number of figures: 7**

Abstract

Objective: Sympathetic hyperactivation, a common feature of obesity and metabolic syndrome, is a key trigger of hypertension. However, some obese subjects with autonomic unbalance present a dissociation between sympathetic nerve activity and sympathetic mediated vascular tone and thus normal blood pressure. Here, we aimed to determine in a rat model of metabolic syndrome, whether the endothelium and eNOS-NO pathway could counteract the vasopressor effect of the sympathetic system.

Methods: Rats were fed a high fat and sucrose diet for 15 weeks (HFS). Blood glucose homeostasis was evaluated at 13-14 weeks. Sympatho-vagal balance was evaluated by spectral analysis of heart rate variability and plasmatic catecholamines measurements. Blood pressure was measured at rest and during eNOS inhibition (L-NAME). Adrenergic vascular reactivity was assessed isometrically in response to $\alpha 1$ -adrenergic agonist, phenylephrine.

Results: HFS diet increased fat accretion (+77% epididymal, +101% dorsal), fasting insulinemia (+49.8%), fasting (+13.6%) and postprandial glycemia (+51%). HFS rats presented higher low on high-frequency spectral power ratio (x13), higher plasmatic epinephrine (+23%) but unchanged blood pressure. Interestingly, HFS rats exhibited vascular hyporeactivity (-23.6%) to $\alpha 1$ -adrenergic receptors stimulation that was abolished by endothelial removing or eNOS inhibition (L-NAME). In addition, eNOS phosphorylation (ser1177) was increased (+31%) by phenylephrine in HFS rats only. Accordingly, eNOS inhibition in-vivo revealed higher blood pressure in HFS compared to control rats (Respectively 147 vs 126 mmHg for mean blood pressure).

Conclusion: Restrain of adrenergic vasopressor action by the endothelium is increased in HFS rats and contributes to maintain blood pressure in physiological range.

Condensed abstract:

Despite sympathetic activation, some MetS and obese subjects present normal blood pressure and dissociation between sympathetic nerve activity and increased vascular tone. This suggests compensatory mechanisms occurring at vascular level in MetS/obese subjects that oppose sympathetic vasoconstrictor and hypertensive effect. Using a high fat, high sucrose diet, this study shows that in the time where rats develop metabolic syndrome and an autonomic unbalance, they also develop an increased eNOS-NO sensitivity to adrenergic stimulation resulting in vascular hypoadrenergic reactivity and therefore maintenance of physiological blood pressure.

Keywords: hypertension, metabolic syndrome, endothelium, sympathetic activation, nitric oxide.

Introduction

Metabolic syndrome (MetS) is a cluster of physiological dysregulations that include visceral obesity, hyperglycemia, insulin resistance and dyslipidemia. All abnormalities are well known risk factors for the development of cardiovascular disease (CVD) and type 2 diabetes. Moreover, patients with MetS develop commonly hypertension, a major comorbidity factor for CVD. Several components of MetS such as hyperinsulinemia [1–3], visceral obesity [4–6] and others are positive modulators of the sympathetic nervous system [4,7]. The sympathetic nervous system is a major vasoconstrictor system, which may contribute to the hypertension observed in patients with MetS. Surprisingly, some obese and MetS patients present normal arterial blood pressure (ABP) and vascular tone despite obvious sympathetic activation [4,8]. These observations suggest that (1) compensatory mechanisms counterbalance sympathetic action and therefore dissociate sympathetic activity from its hypertensive effect and that (2) vascular tone control might be involved in such phenomenon.

A healthy endothelium preserves the balance between vasodilatation and vasoconstriction, which determine the arterial diameter and consequently blood pressure. Notably, endothelium liberates the vasorelaxant gazotransmitter nitric oxide (NO) produced by the endothelial NO synthase (eNOS) [9], thereby assuming a suitable adaptation and control of blood pressure [9]. Indeed, various stimuli can activate eNOS such as bradykinine, hypoxia or shear stress in order to adapt blood flow and satisfy metabolic demand. eNOS is also activated in vascular smooth muscle during $\alpha 1$ -adrenergic receptors ($\alpha 1$ -AR) –stimulation to limit potential side effects of massive vasoconstriction during adrenergic stress [10,11]. Interestingly, endothelial function and eNOS pathway are altered in various pathological states. Metabolic diseases are classically associated with endothelial dysfunction; however, endothelium ability to limit arterial vasoconstriction can also be exacerbated. As exemple, this is the case during adrenergic stress in hepatic and renal diseases [12,13] but similar observations have been made in obese animal model [14]. Until now, the role of endothelium in preventing elevated vascular tone and ABP during sympathetic outflow in some obese subjects has never been studied.

The aim of this work was to evaluate the role of endothelium and the eNOS-NO pathway in vascular $\alpha 1$ -adrenergic hyporesponsiveness in population with MetS. For this purpose, we investigated the sympathetic activation, the impact of $\alpha 1$ -adrenergic receptors stimulation on arterial vasomotricity and how the endothelium and especially the eNOS activation state

could modulate this response in a rat model of high fat and high sucrose diet induced metabolic disorders.

Methods

Experimental protocol

All investigations conformed to European Parliament Directive 2010/63/EU (N° CEEA-00322.03) and were approved by the local research ethics committee (experimentation n°: 84.004). Male Wistar rats were randomly assigned into either the control group (Ctrl) fed with a standard diet (A04, SAFE, France) or to the high fat high sucrose group (HFS). The HFS diet is a high fat diet (230 HF containing 60% kcal as fat with a caloric value of 5.317 kcal/g; SAFE, France), completed with 10% of sucrose in drinking water during 15 weeks to induce MetS. At the end of the 15 weeks diet period, cardiac function was explored *in vivo* (ECG, blood pressure). Then rats were sacrificed, blood was collected for biochemistry analysis, total visceral and epididymal fat were removed and weighed as index of visceral obesity, and aorta was dissected for ex-vivo analysis of vascular function.

ECG recording and heart rate variability analysis.

ECG recordings were obtained through implantable CA-F40 telemetric ECG transmitters (DSI, St. Paul, MN) and by using a signal RCP-1 receiver connected to a data acquisition system (Ponemah Physiology Platform, DSI). Rats were instrumented under general anesthesia and allowed to recover from surgery for 8 days. The autonomic nervous system activity on cardiac function was assessed by studying beat-to-beat Heart Rate Variability (HRV) as described previously [15,16]. Twenty segments of 3-minutes (5 segments/hour) were analyzed using Kubios HRV software v2.2 to assess frequency domain - HRV [17]. First all RR intervals were measured and then mean RR interval was calculated. Then, after application of a cubic spline interpolation (20 Hz), the power spectrum is estimated with Welch's periodogram modelling i.e. the RR series is divided into overlapping segments (50%), each segment is windowed to decrease the leakage effect (1024s), and the spectrum estimate is obtained by averaging the FFT spectra of all windowed segments. Thus, the Fast Fourier Transform (Low frequency band, LF: 0.4-1.5Hz; high frequency band, HF: 1.5-5Hz) was applied to exclusively sinus RR intervals. As commonly published, the LF band power reflects sympathetic autonomic nervous system and baroreflex activities on heart (26, 51). The HF band power reflects parasympathetic activity (45). Thus, the LF/HF ratio could be used to estimate the sympatho-vagal activity on cardiac rhythm (5).

Blood pressure measurements.

Mean (MBP), systolic (SBP) and diastolic (DBP) blood pressures were assessed in conscious rats by tail-cuff method using the CODA tail-cuff system (Kent Scientific) at the end of the protocol. To confirm that this system was sensitive enough to detect adrenergic hypertensive effect, blood pressure was measured in some rats before and after an intraperitoneal injection of norepinephrine (1 mg/kg), a catecholamine involved in sympathetic nervous activity. Finally, to assess NO contribution in the regulation of blood pressure, blood pressure was measured in some rats before and 15 minutes after intraperitoneal injection of a NOS inhibitor, L-NAME (20mg/kg) to assess NO contribution in the regulation of blood pressure.

Isolated aortic rings

Under anesthesia (sodium pentobarbital, 100 mg/kg, i.p.), thoracic aorta was quickly removed and placed in cold Krebs–Henseleit bicarbonate buffer (composition in mM: NaCl 118, NaHCO₃ 25, KCl 4.8, KH₂PO₄ 1.2, CaCl₂ 1.25, Glucose 11). After removal of adherent tissue, the aorta was cut in small segments of 2mm long. The aortic rings were mounted onto stainless steel supports and suspended in the tissue bath containing Krebs–Henseleit buffer at 37°C continuously bubbled with O₂–CO₂ (95%–5%) gas mixture. The rings were connected to an isometric force transducer (EMKA technologies, EMKA Paris, France), linked to an amplifier (EMKA technologies, EMKA Paris, France) and a computerized acquisition system, to record changes in isometric force. The resting tension was adjusted to 2.0 g and aortic rings were allowed to stabilize for 60 min. From there, KCl solution (60 mM) was applied in order to obtain a reference contraction, which was used to normalize subsequent contractile responses. Endothelial integrity was then tested with a single dose of phenylephrine (PE, 1 µM) followed by a vasorelaxing dose of acetylcholine (ACh, 10 µM). To assess vasocontractile capacity to α₁ adrenergic agonist, cumulative doses of phenylephrine were added in the bath (0.1 nM to 10 µM). To evaluate the implication of endothelial activity on alpha adrenergic vasoconstriction, the inner surface of some rings was gently rubbed to remove endothelium before the rings were mounted. To test endothelium capacity to inhibit agonist and non-agonist induced vasoconstriction, aortic rings response to respectively a single dose of PE (1 µM) and a single dose of KCl (60 mM). In the same way, the effect of eNOS activity was evaluated by treating aortic rings with L-NAME (0.3 mM) 30min prior to the vasoconstriction protocol. The responses were characterized by E_{max} values corresponding to the maximal contractile effect of the drug and EC₅₀ values which represent the concentration of drug that induces a contraction equal to 50% of its own maximal effect.

Fasting blood glucose and glucose tolerance tests.

Intra-Peritoneal Glucose Tolerance Tests (IPGTT) were performed at the end of the 13th week of the protocol. First, blood was obtained via tail clip to assess fasting blood glucose (Caresens® N, DinnoSante™). Then, rats received an intraperitoneal injection of a glucose solution (2g/kg), and blood glucose was measured at 10, 20, 30, 60 and 120 minutes after the glucose injection.

Blood analysis

Blood samples were stored at -20°C until analysis. Total cholesterol (TC), high-density lipoprotein cholesterol (HDL), low lipoprotein cholesterol (LDL) and triglycerides (TG) were determined in plasma by automated enzymatic kits on Cobas 6000 autoanalyzer. Serum insulin was determined using a commercial rat insulin ELISA kit (10-1250-01 Mercodia). Plasmatic norepinephrine and epinephrine were determined by high performance liquid chromatography analysis (Column: Vydac 218TP54, 5 µm, 4.6 mm i.d. x 250 mm; Waters Separations Module 2695; multi-wavelength fluorescence detector Waters 2475).

Western blot analysis

Western blots were performed as previously described [25]. Briefly, proteins from aorta homogenates were separated onto sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels and transferred onto polyvinylidene difluoride membranes. Membranes were incubated with primary antibodies at 4°C in 1 % milk (α 1D adrenergic receptor, 1:500 Santa Cruz; eNOS, 1:1000 BD Transduction and GAPDH, 1:5000; Santa Cruz), or 0.3 % bovine serum albumin (eNOS-PSer1177 1:500; BD Transduction) in Tris-buffered saline containing 0.05 % Tween-20 overnight. Immunodetection was carried out using ECL or ECL Plus system (SuperSignal® West Pico Chemiluminescence Substrate, Thermo Scientific; Luminata™ Forte Western HRP substrate, Millipore Corporation, respectively) and membranes were then exposed to X-ray films for revelation. eNOS protein content was expressed relative to GAPDH content. eNOS-PSer1177 protein content was expressed relative to eNOS content. To evaluate PE impact on eNOS activation, the phosphorylation level at Ser1177 of eNOS was measured from aorta segments previously incubated with or without PE (10 µM) for 15 minutes.

Statistical analysis

Data were expressed as the mean $\pm$ SEM. Unpaired t-tests were used for single comparison between groups. For studies involving multiple measures on the same animal over time as well as for dose-response curves, comparison between groups were made using two-way ANOVA followed by a Sidak post hoc test where appropriate. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant. Statistical analysis was done using GraphPad Prism software.

Results

High fat and high sucrose diet induces MetS in Wistar rats

After thirteen weeks, enriched fat and sucrose diet feeding significantly increased body mass of HFS rats compared to their littermate assigned to standard chow diet (Fig 1A). HFS rats had higher epididymal and dorsal fat mass in than Ctrl rats (Fig 1B). HFS rats also presented elevated fasting blood glucose (Fig 1C), elevated fasting serum insulin (Fig 1D) and enhanced elevation of blood glucose during glucose tolerance test (Fig 1E). Blood analysis revealed that HFS rats had higher LDL cholesterol and triglyceride levels with unchanged total cholesterol and HDL levels (Fig 1 F). All together these results showed that HFS diet induced central obesity (increased body mass and visceral fat accretion), alteration of glucose and insulin metabolisms and dyslipidemia, which fit the definition of MetS in Human [26].

Increased sympathetic nervous outflows in HFS rats does not translate into higher blood pressure

Obesity and MetS are classically associated with increased sympathetic nervous outflows [4–6]. We monitored cardiac electrical activity (ECG) using telemetric system over 24 hours in Ctrl and HFS rats and then analyzed the activity of autonomic nervous system through beat-to-beat HRV analysis in the frequency domain (Figure 2A & 2B). The ‘low’ frequency band (LF) reflects mostly the influences of the sympathetic system on heart rhythm and oscillations in ‘high’ frequency bands (HF) reflect exclusively vagal activity. Thus LF/HF reflects sympatho-vagal balance [16]. HFS rats had a drastic increase in LF bands (Fig 2A, 2B & 2C) associated with a smaller increase in HF bands (Fig 2A, B and D). Consequently, HFS rats exhibited higher LF/HF ratio when compared to Ctrl rats (Fig 2E). This result indicates that alteration of sympatho-vagal balance in HFS rats is characterized by higher sympathetic tone. Classically, increased peripheral sympathetic outflow is associated with high level of circulating catecholamines [27,28]. We thus evaluated plasmatic levels of epinephrine and

norepinephrine by high performance liquid chromatography. Consistent with the higher LF/HF ratio in HFS rats, plasmatic level of epinephrine was higher in HFS when compared to Ctrl ones (Fig 2F). Similar tendency was observed with norepinephrine levels, although it did not reach significance (Fig 2G). Since sympathetic tone is known to affect vascular tone and to increase blood pressure, we measured ABP in conscious rats by tail-cuff method. Firstly, we evaluated ABP response to NE administration (1 mg/kg) in Ctrl animals and observed that this adrenergic stress produced a large increase in ABP in Ctrl animals (Fig1 suppl data). By contrast, although our ABP measurement device effectively detected ABP variation in response to AR-stress, we observed no difference of the ABP indexes between Ctrl and HFS animals in steady state (Fig 2I). Altogether, these results supported clearly sympathetic hyperactivity in HFS rats without any observable consequence on ABP.

Endothelium-dependent vascular hyporeactivity to vasoconstrictive agent masks sympathetic-dependent hypertension in HFS rats

The vascular tone is the consequence of the balance between vasoconstrictive and vasorelaxant factors. We first examined the vasocontractile function known to depend on the sympathetic activity through adrenergic signaling pathway. To decipher why the arterial blood pressure was unchanged in HFS rats despite increased sympathetic outflow, we evaluated HFS rats could present down regulation of α_{1D} -AR, which appears to be highly implicated in this pathway [29–31], but we found no difference in its expression level between groups as confirmed by western blot (Fig 3A). Next we assessed the impact of HFS diet on arterial contractile response to the specific α_1 -AR agonist PE. The dose-response to PE obtained in isolated aortic rings of HFS rats was reduced when compared to Ctrl ones (Fig 3B). This alteration was characterized by reduced maximal response (E_{max} , Fig 3C) and sensitivity (pD_2 , Fig 3D) to PE in HFS aortic rings compared to Ctrl ones. Altogether, those results clearly showed that HFS diet does not alter α_{1D} -AR expression level but alters the vasoconstrictive response mediated by the α_1 -AR stimulation.

During vasoconstriction, the endothelium also releases some vasorelaxant factors in order to restrain the contractile response [32–34]. Therefore, the involvement of the endothelium in the modifications of the vascular responses in HFS rats was tested by mechanically removing the endothelium in the aorta (Fig 4). In this condition, Ctrl aorta contractile response to PE was strengthened, increasing maximal responses from 68% to 123% of KCl contraction (Fig 4B). This result shows that the endothelium limits the vasoconstrictive effect of PE in healthy

conditions. Interestingly, this increase in the contractile response to PE in endothelium-free aortic rings was higher in HFS than in Ctrl rats (Here, the maximal response increased from 52% to 122% of KCl contraction between the respective endothelium-intact and endothelium-free aorta) (Fig 4B). It is important to note that in the absence of endothelium, HFS and Ctrl aorta reached the similar level of contraction (Fig 4A, B). The aorta sensitivity to PE (-Log EC50) was increased by the endothelium removal and Ctrl aorta remained slightly more sensitive to PE than HFS one (Fig 4C). Taken together these data show that HFS rats exert reduced adrenergic vasocontractile capacity, with no alteration at the muscular level, but due to an enhancement of endothelial anticontractile effect.

The endothelial cells maintain vascular tone by the elaboration of relaxing factors in response to various molecular and physical factors. To examine whether endothelium inhibitory effect on vasoconstriction and its amplification in HFS rats was specific to α_1 -AR stimulation or relied on common features of vasoconstriction, we evaluated Ctrl and HFS aortic rings responses to a high single dose of PE (1 μ M) and to a high single dose of KCl (60 mM), a non-receptor dependent vasoconstrictor. As expected, we observed that in both populations, developed contraction to PE were significantly attenuated when endothelium was preserved. Once again, this phenomenon was amplified in HFS aorta (Developed contraction reduced from 4.7 g to 3.2 g in Ctrl aorta and from 4.2 g to 1.6 g in HFS ones) (Fig 4D). Interestingly, when aortas were stimulated with KCl, we found no difference between developed contraction obtained in aortas without and with endothelium in Ctrl aortic rings. Only a slight decrease was observed between these two conditions in HFS aortic rings, however this was not statistically significant (Fig 4E). These results definitively confirm that endothelium preferentially antagonizes α_1 -AR induced vasoconstriction and that this effect is potentiated in HFS rats.

The endothelium-derived NO is known to modulate the contractile response during α_1 -AR mediated vasoconstriction [11,13]. Therefore, eNOS-NO pathway implication in the modification of α_1 -AR vascular responses was tested by treating intact aorta with an eNOS inhibitor, L-NAME. The inhibition of eNOS increased the constrictive response to PE to a similar value in both Ctrl and HFS aorta. Indeed, between conditions without and with L-NAME pre-treatment, maximal response to PE increased from 68% to 118% of KCl contraction in Ctrl rats and from 52 to 120 % of KCl contraction in HFS rats. As a

consequence, differences observed between Ctrl and HFS were totally abolished in presence of L-NAME, (Fig 5A, B & C). The production of NO by eNOS depends on both the level of eNOS expression and the level of activation by its phosphorylation on its activation site (ser1177). In basal conditions, both the levels of eNOS expression and eNOS-Pser1177/eNOS ratio were similar between Ctrl and HFS aorta (Fig 5D and E), which cannot explain the lower response to PE in HFS aorta. Next we evaluated the level of eNOS activation by PE in Ctrl and HFS aorta. Interestingly, PE reduced the level of eNOS-Pser1177 in Ctrl aortic rings by 13% and increased it in HFS aortas by 31% (Fig 5F). Finally, to confirm the endothelium and eNOS contributions in the blunting of the sympathetic activation on blood pressure, we measured *in vivo* blood pressure in Ctrl and HFS rats before and after intraperitoneal injection of L-NAME (20mg/kg). In Ctrl rats, L-NAME had modest and not significant effects on systolic (+6%), diastolic (+5%), and mean (+5%) blood pressures (Fig 5G). In HFS rats, the same injection of L-NAME produced a significant increase of systolic (+14%), diastolic (+17%) and mean (+17%) blood pressures (Fig 5G). Thus, in presence of L-NAME, systolic, diastolic and mean blood pressures were higher in HFS rats when compared to Ctrl ones (Fig 5G). Altogether these results showed that HFS diet was associated with increased sympathetic vasopressor activity that was counterbalanced by an eNOS-dependent mechanism in the endothelium.

Discussion

The main findings of the present study are that (1) HFS rats exhibited increased peripheral sympathetic outflow without effect on blood pressure, (2) increased eNOS response to $\alpha 1$ -AR stimulation contributes to mask such vasopressor impact of the sympathetic outflow.

Sympathetic activation is a common feature of obesity and metabolic disorders [35]. There is accumulating evidence that hyperinsulinemia, obesity and possibly other components of MetS exert this sympatho-excitatory effect. For example insulin infusion under euglycemic conditions has been demonstrated to increase muscle sympathetic nerve activity [36]. Body fat products such as leptin and non-esterified fatty acids have also been associated with whole-body norepinephrine spillover [37] and $\alpha 1$ -AR vasopressor activity [38]. Consistently, in our rat model of diet induced MetS with abdominal obesity and hyperinsulinemia, both HRV analysis and plasma catecholamine levels evidenced high sympathetic activity in HFS rats. Using sympatholytic agents [39] or $\alpha 1$ -AR blockers [40], several groups have highlighted the implication of sympathetic activity in higher vasopressor activity and hypertension observed in obesity and MetS. This contrasts with other studies [4,8] and the

present one in which despite obvious sympathetic activation no apparent change in arterial blood pressure was observed. Thus, some unknown mechanisms counteract the subsequent increase in arterial pressure expected with sympathetic activation.

Nevertheless, in our MetS rats, L-NAME increased blood pressure and unmasked a negative regulatory role of eNOS even in basal condition. Considering that sympathetic-dependent increase in arterial blood pressure was obvious in HFS rats only in presence of L-NAME, it seems that at this stage of the MetS pathology, some compensatory mechanisms, triggered by eNOS-NO pathway, contribute to maintain a normal blood pressure in HFS rats by counteracting the impact of the sympathetic tone.

There are at least two mechanisms by which NO can lower blood pressure. NO produced in vascular endothelial cells acts as a potent vasodilator and thereby reduces vascular peripheral resistance [41]. NO is also able to modulate the autonomic nervous system activity and thus the impact of sympathetic tone on blood pressure [9,42]. In our work, the vascular contribution of eNOS on arterial pressure was obvious since aortic hyporeactivity to $\alpha 1$ -AR agonist in HFS aortic rings was blunted either by endothelial removal or by eNOS inhibition with L-NAME. This clearly highlights the key role of the endothelium and eNOS-NO-dependent vasodilation in maintaining blood pressure of HFS rats at level seen in Ctrl rats.

To understand this phenomenon, we first considered the possibility that our experimental model may have an increase in eNOS expression and/or its phosphorylation on its main activation site (Ser1177), but we found no difference between groups on these parameters.

However, previous studies evaluating intercellular signaling between vascular smooth muscle cell and endothelial cell indicate that eNOS is activated in response to $\alpha 1$ -AR agonist [43,44]. In our study, eNOS phosphorylation on its activation site in response to $\alpha 1$ -AR agonist was highly evident in HFS rats but not in Ctrl ones. This phenomenon has been also reported in the rat model of renovascular hypertension known as 2 kidneys 1 clip and explained by the activation of the Pi3K-Akt pathway. Indeed, in this model increased eNOS-P in response to PE was abolished by the use of wortmannin [13]. Thus, despite the level of eNOS phosphorylation was not markedly altered in HFS aorta, its higher ability to be activated during the stimulation of $\alpha 1$ -AR stimulation constitutes a key element in maintaining blood pressure at Ctrl level in HFS rats.

To conclude, we emphasize here the key role of the endothelium-dependent eNOS-NO pathway to limit or prevent the development of hypertension in MetS subjects (see schematic illustration of the proposed mechanism on Fig 6). Indeed, in such pathological state associated

with impaired sympatho-vagal balance, the endothelium ability to modulate adrenergic-dependent vasoconstriction seems to constitute the last defense against hypertension, which constitutes one of the worst cardiovascular risk factors. Thus, in MetS, all strategy that contribute to protect or improve endothelial function, such as exercise training or an appropriate diet have to be considered in order to reduce the proliferation of cardiovascular risk factors.

References

- 1 Heise T, Magnusson K, Heinemann L, Sawicki PT. Insulin Resistance and the Effect of Insulin on Blood Pressure in Essential Hypertension. *Hypertension* 1998; 32:243–248.
- 2 Ferrannini E, Natali A, Capaldo B, Lehtovirta M, Jacob S, (egir) HY-J for the EG for the S of IR. Insulin Resistance, Hyperinsulinemia, and Blood Pressure Role of Age and Obesity. *Hypertension* 1997; 30:1144–1149.
- 3 Ferrannini E. Insulin and blood pressure: connected on a circumference? *Hypertension* 2005; 45:347–348.
- 4 Huggett RJ, Burns J, Mackintosh AF, Mary DASG. Sympathetic Neural Activation in Nondiabetic Metabolic Syndrome and Its Further Augmentation by Hypertension. *Hypertension* 2004; 44:847–852.
- 5 Alvarez GE, Beske SD, Ballard TP, Davy KP. Sympathetic Neural Activation in Visceral Obesity. *Circulation* 2002; 106:2533–2536.
- 6 Grassi G, Seravalle G, Cattaneo BM, Bolla GB, Lanfranchi A, Colombo M, *et al.* Sympathetic Activation in Obese Normotensive Subjects. *Hypertension* 1995; 25:560–563.
- 7 Grassi G, Dell’Oro R, Quarti-Trevano F, Scopelliti F, Seravalle G, Paleari F, *et al.* Neuroadrenergic and reflex abnormalities in patients with metabolic syndrome. *Diabetologia* 2005; 48:1359–1365.
- 8 Agapitov AV, Correia ML de G, Sinkey CA, Haynes WG. Dissociation Between Sympathetic Nerve Traffic and Sympathetically Mediated Vascular Tone in Normotensive Human Obesity. *Hypertension* 2008; 52:687–695.
- 9 Sander M, Chavoshan B, Victor RG. A Large Blood Pressure–Raising Effect of Nitric Oxide Synthase Inhibition in Humans. *Hypertension* 1999; 33:937–942.
- 10 Dora KA, Doyle MP, Duling BR. Elevation of intracellular calcium in smooth muscle causes endothelial cell generation of NO in arterioles. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94:6529–6534.
- 11 Straub AC, Butcher JT, Billaud M, Mutchler SM, Artamonov MV, Nguyen AT, *et al.* Hemoglobin α /eNOS Coupling at Myoendothelial Junctions Is Required for Nitric Oxide Scavenging During Vasoconstriction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014; :ATVBAHA.114.303974.
- 12 Barrière E, Tazi KA, Pessione F, Heller J, Poirel O, Lebrec D, *et al.* Role of small-conductance Ca^{2+} -dependent K^{+} channels in in vitro nitric oxide-mediated aortic

- hyporeactivity to α -adrenergic vasoconstriction in rats with cirrhosis. *J Hepatol* 2001; 35:350–357.
- 13 Silva BR, Pernomian L, Grando MD, Bendhack LM. Phenylephrine activates eNOS Ser1177 phosphorylation and nitric oxide signaling in renal hypertensive rat aorta. *Eur J Pharmacol* 2014; 738:192–199.
- 14 Jerez S, Scacchi F, Sierra L, Karbiner S, Peral de Bruno M. Vascular Hyporeactivity to Angiotensin II and Noradrenaline in a Rabbit Model of Obesity: *J Cardiovasc Pharmacol* 2012; 59:49–57.
- 15 Thireau J, Poisson D, Zhang BL, Gillet L, Le Pécheur M, Andres C, *et al.* Increased heart rate variability in mice overexpressing the Cu/Zn superoxide dismutase. *Free Radic Biol Med* 2008; 45:396–403.
- 16 Thireau J, Zhang BL, Poisson D, Babuty D. Heart rate variability in mice: a theoretical and practical guide. *Exp Physiol* 2008; 93:83–94.
- 17 Tarvainen MP, Niskanen J-P, Lipponen JA, Ranta-Aho PO, Karjalainen PA. Kubios HRV--heart rate variability analysis software. *Comput Methods Programs Biomed* 2014; 113:210–220.
- 18 Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. *Circulation* 1996; 93:1043–1065.
- 19 Gehrmann J, Hammer PE, Maguire CT, Wakimoto H, Triedman JK, Berul CI. Phenotypic screening for heart rate variability in the mouse. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279:H733-740.
- 20 Malliani A. The Pattern of Sympathovagal Balance Explored in the Frequency Domain. *News Physiol Sci Int J Physiol Prod Jointly Int Union Physiol Sci Am Physiol Soc* 1999; 14:111–117.
- 21 Thireau J, Aimond F, Poisson D, Zhang B, Bruneval P, Eder V, *et al.* New insights into sexual dimorphism during progression of heart failure and rhythm disorders. *Endocrinology* 2010; 151:1837–1845.
- 22 Thireau J, Karam S, Roberge S, Roussel J, Aimond F, Cassan C, *et al.* B-adrenergic blockade combined with subcutaneous B-type natriuretic peptide: a promising approach to reduce ventricular arrhythmia in heart failure? *Heart Br Card Soc* 2014; 100:833–841.

- 23 Berul CI, Maguire CT, Gehrmann J, Reddy S. Progressive atrioventricular conduction block in a mouse myotonic dystrophy model. *J Interv Card Electrophysiol Int J Arrhythm Pacing* 2000; 4:351–358.
- 24 Tankersley CG, Campen M, Bierman A, Flanders SE, Broman KW, Rabold R. Particle effects on heart-rate regulation in senescent mice. *Inhal Toxicol* 2004; 16:381–390.
- 25 Battault S, Singh F, Gayrard S, Zoll J, Reboul C, Meyer G. Endothelial function does not improve with high-intensity continuous exercise training in SHR: implications of eNOS uncoupling. *Hypertens Res Off J Jpn Soc Hypertens* Published Online First: 5 November 2015. doi:10.1038/hr.2015.114
- 26 Grundy SM, Brewer HB, Cleeman JI, Smith SC, Lenfant C, Participants for the C. Definition of Metabolic Syndrome Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association Conference on Scientific Issues Related to Definition. *Circulation* 2004; 109:433–438.
- 27 Goldstein DS, McCarty R, Polinsky RJ, Kopin IJ. Relationship between plasma norepinephrine and sympathetic neural activity. *Hypertension* 1983; 5:552–559.
- 28 Vollmer RR. Selective Neural Regulation of Epinephrine and Norepinephrine Cells in the Adrenal Medulla-Cardiovascular Implications. *Clin Exp Hypertens* 1996; 18:731–751.
- 29 Tanoue A, Koba M, Miyawaki S, Koshimizu T, Hosoda C, Oshikawa S, *et al.* Role of the $\alpha 1D$ -adrenergic receptor in the development of salt-induced hypertension. *Hypertension* 2002; 40:101–106.
- 30 Tanoue A, Nasa Y, Koshimizu T, Shinoura H, Oshikawa S, Kawai T, *et al.* The $\alpha(1D)$ -adrenergic receptor directly regulates arterial blood pressure via vasoconstriction. *J Clin Invest* 2002; 109:765–775.
- 31 Panza JA, Epstein SE, Quyyumi AA. Circadian variation in vascular tone and its relation to α -sympathetic vasoconstrictor activity. *N Engl J Med* 1991; 325:986–990.
- 32 Tesfamariam B, Weisbrod RM, Cohen RA. Endothelium inhibits responses of rabbit carotid artery to adrenergic nerve stimulation. *Am J Physiol - Heart Circ Physiol* 1987; 253:H792–H798.
- 33 Jones CJ, DeFily DV, Patterson JL, Chilian WM. Endothelium-dependent relaxation competes with $\alpha 1$ - and $\alpha 2$ -adrenergic constriction in the canine epicardial coronary microcirculation. *Circulation* 1993; 87:1264–1274.
- 34 Tuttle JL, Falcone JC. Nitric oxide release during $\alpha 1$ -adrenoceptor-mediated constriction of arterioles. *Am J Physiol - Heart Circ Physiol* 2001; 281:H873–H881.

-
- 35 Lambert GW, Straznicky NE, Lambert EA, Dixon JB, Schlaich MP. Sympathetic nervous activation in obesity and the metabolic syndrome—Causes, consequences and therapeutic implications. *Pharmacol Ther* 2010; 126:159–172.
- 36 Scherrer U, Sartori C. Insulin as a vascular and sympathoexcitatory hormone: implications for blood pressure regulation, insulin sensitivity, and cardiovascular morbidity. *Circulation* 1997; 96:4104–4113.
- 37 Straznicky NE, Lambert EA, Lambert GW, Masuo K, Esler MD, Nestel PJ. Effects of dietary weight loss on sympathetic activity and cardiac risk factors associated with the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90:5998–6005.
- 38 Haastrup AT, Stepniakowski KT, Goodfriend TL, Egan BM. Intralipid enhances alpha1-adrenergic receptor mediated pressor sensitivity. *Hypertension* 1998; 32:693–698.
- 39 Charkoudian N, Joyner MJ, Barnes SA, Johnson CP, Eisenach JH, Dietz NM, *et al.* Relationship between muscle sympathetic nerve activity and systemic hemodynamics during nitric oxide synthase inhibition in humans. *Am J Physiol - Heart Circ Physiol* 2006; 291:H1378–H1383.
- 40 Frisbee JC. Impaired hemorrhage tolerance in the obese Zucker rat model of metabolic syndrome. *J Appl Physiol* 2006; 100:465–473.
- 41 Haynes WG, Noon JP, Walker BR, Webb DJ. Inhibition of nitric oxide synthesis increases blood pressure in healthy humans. *J Hypertens* 1993; 11:1375–1380.
- 42 Young CN, Fisher JP, Gallagher KM, Whaley-Connell A, Chaudhary K, Victor RG, *et al.* Inhibition of nitric oxide synthase evokes central sympatho-excitation in healthy humans. *J Physiol* 2009; 587:4977–4986.
- 43 Lambole M, Pittet P, Koenigsberger M, Sauser R, Bény J-L, Meister J-J. Evidence for signaling via gap junctions from smooth muscle to endothelial cells in rat mesenteric arteries: possible implication of a second messenger. *Cell Calcium* 2005; 37:311–320.
- 44 Straub AC, Billaud M, Johnstone SR, Best AK, Yemen S, Dwyer ST, *et al.* Compartmentalized Connexin 43 S-Nitrosylation/Denitrosylation Regulates Heterocellular Communication in the Vessel Wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011; 31:399–407.

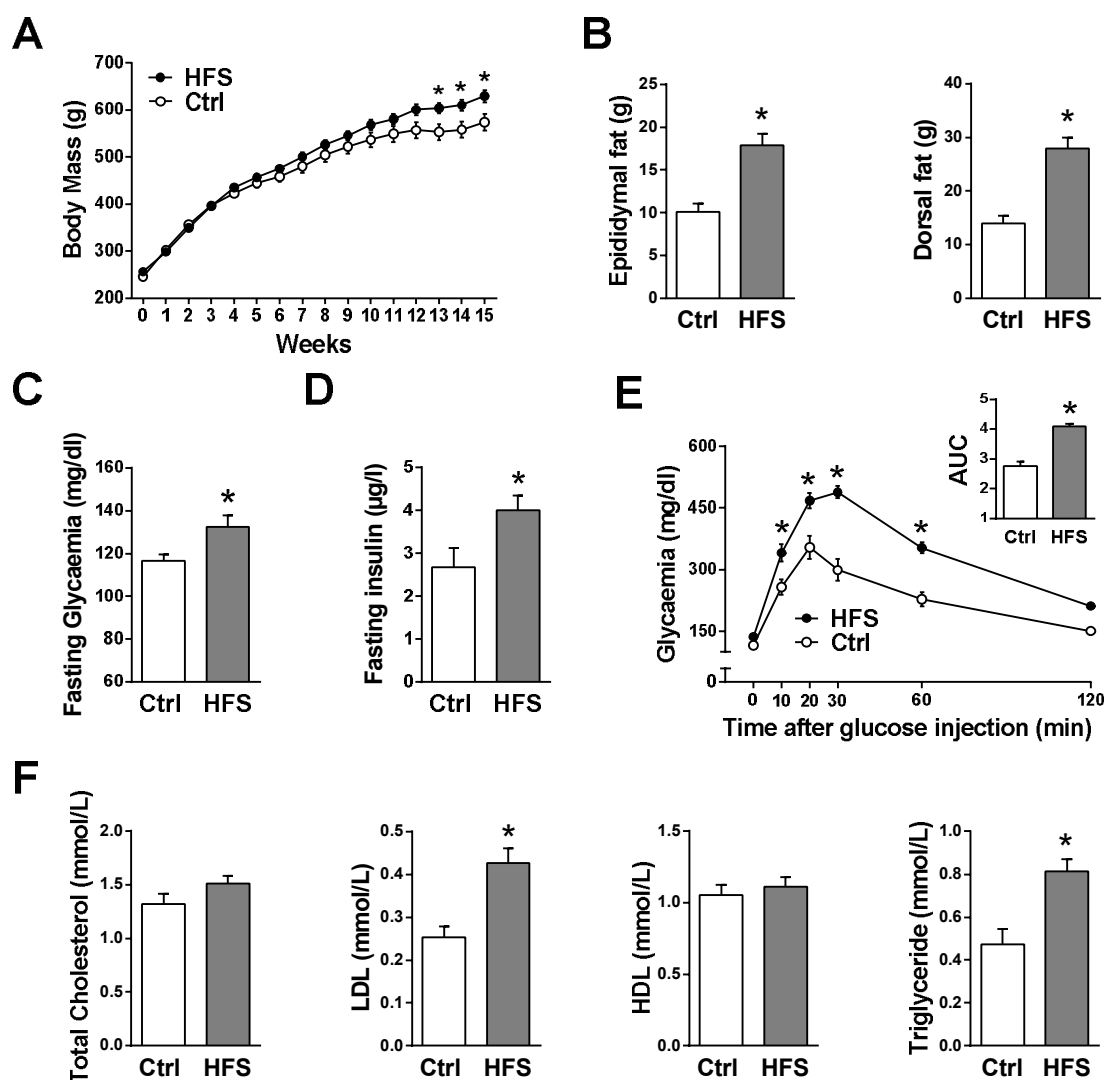


Figure 1. High fat and high sucrose diet induces MetS in Wistar rats. A: Follow up of body mass during the 15 weeks of high fat/high sucrose diet (HFS) or standard diet (Ctrl). B: Epididymal and dorsal fat mass at the end of the protocol. C: Fasting blood glucose measured at week 13 and 14 of the protocol. D: Fasting blood insulin concentration measured at week 12 of the protocol. E: Blood glucose concentration measured during a glucose tolerance test (IPGTT) performed in fasted rats during the 13th week of the protocol and corresponding area under the curve (AUC)(inner graph). G: Plasmatic total cholesterol, Low Density Lipoprotein (LDL), High Density Lipoprotein (HDL) and triglyceride measured at the end of the protocol. Values are the mean $\pm$ SEM. *P<0.05 vs. Ctrl group.

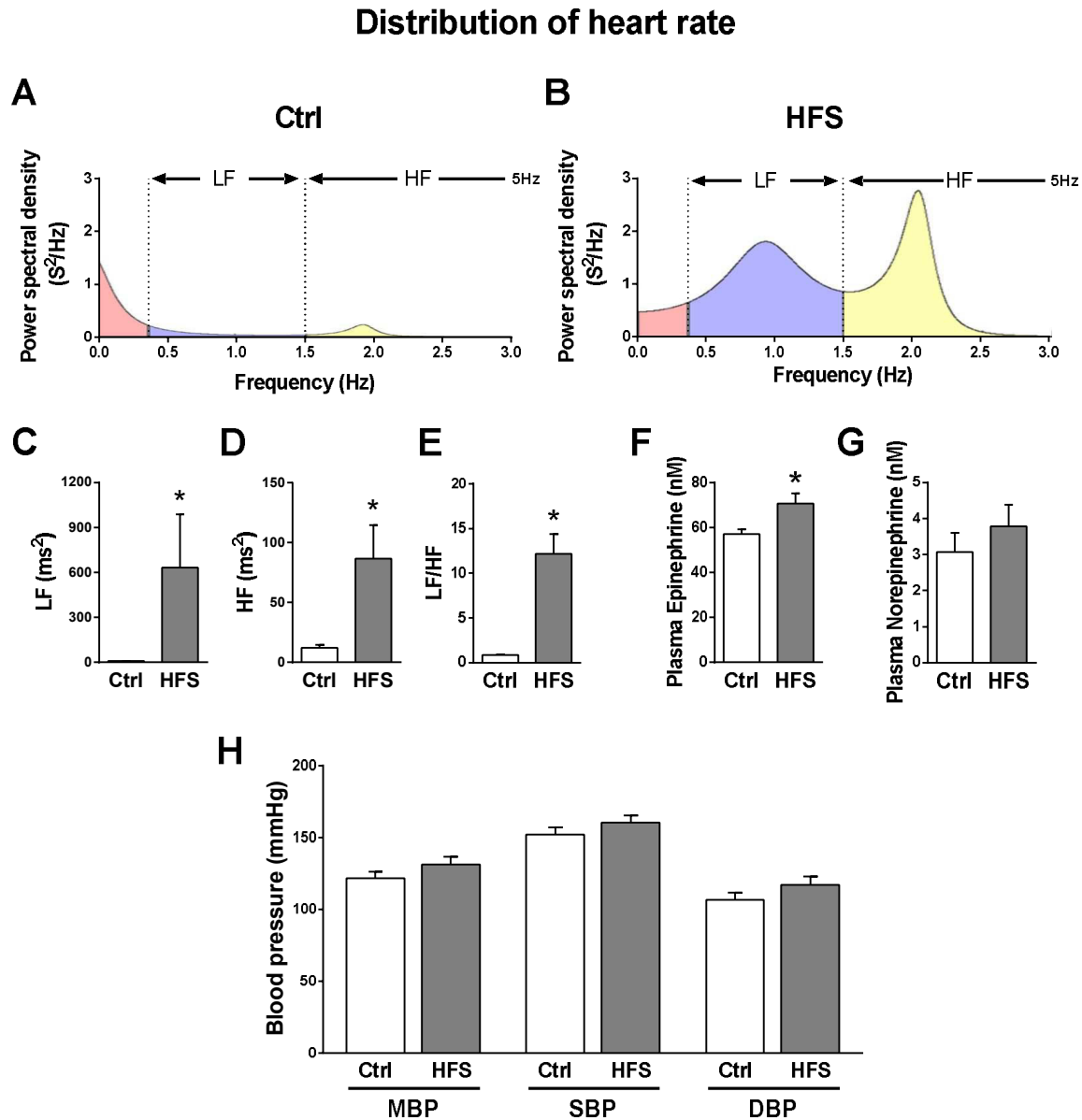


Figure. 2. HFS rats present sympathetic hyperactivation with unchanged blood pressure. A: Representative Fast Fourier Transform spectrum of RR intervals variability obtained in Ctrl population. B: Representative Fast Fourier Transform spectrum of RR intervals variability obtained in HFS population. C: Low frequencies (LF) spectral power measured by heart rate variability analysis in the frequency and time-domain at week 14 of the protocol. D: High frequencies spectral power measured by heart rate variability analysis in the frequency- and time-domain at week 14 of the protocol. E: LF to HF ratio. F: Plasmatic epinephrine measured at the end of the protocol. G: Plasmatic norepinephrine measured at the end of the protocol. H: Mean (MBP), systolic (SBP) and diastolic (DBP) blood pressure

measured by tailcuff method at week 14 of the protocol. Values are the mean $\pm$ SEM. * $P < 0.05$ vs. Ctrl group.

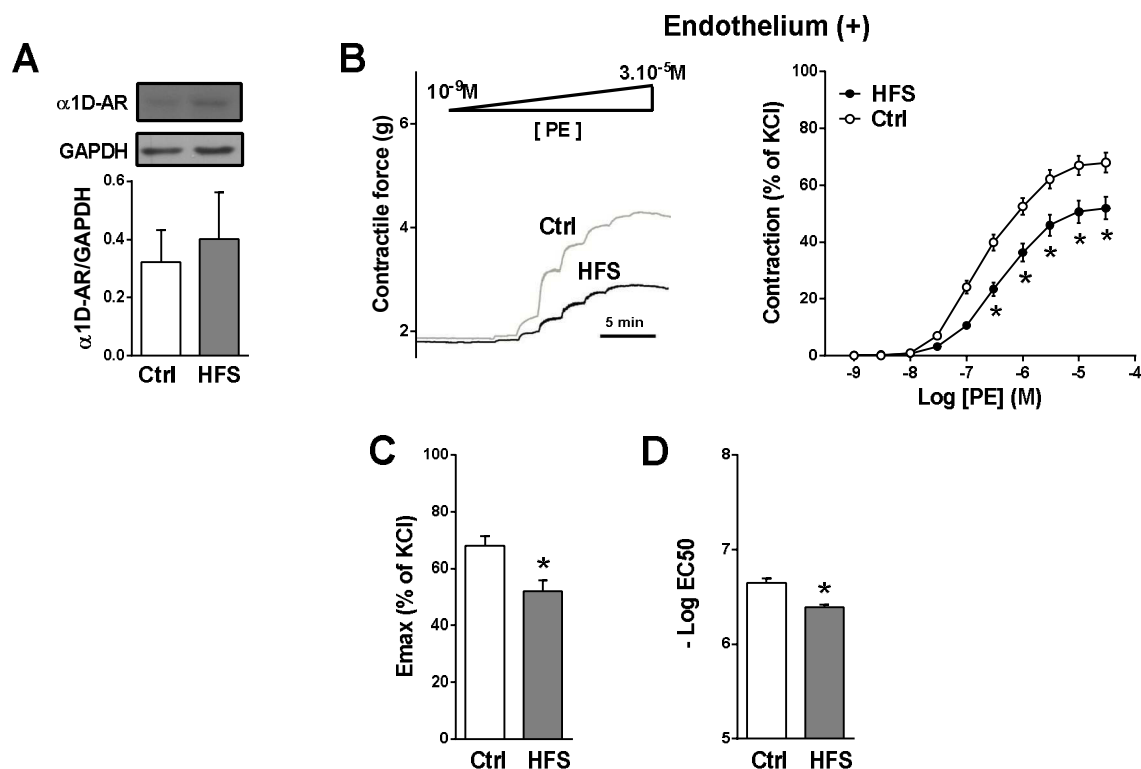


Figure. 3. HFS rats exhibit vascular hyporeactivity to $\alpha 1$ -adrenergic agonist.

A: $\alpha 1D$ -AR expression measured in aortic tissue lysates by Western immunoblotting. B: Left: Representative recordings demonstrating the responses evoked by PE in aortic rings of Ctrl and HFS rats. Right: Dose-dependent response to cumulative dose of PE on aortic rings. C: Maximal contraction of aortic rings to PE. Data are expressed in percent contraction relative to maximal contraction obtained with 60 mM KCl. D: Logarithm of PE concentration inducing 50% of maximal response (EC₅₀) to PE on aortic rings. Values are the mean $\pm$ SEM. * $P < 0.05$ vs. Ctrl group.

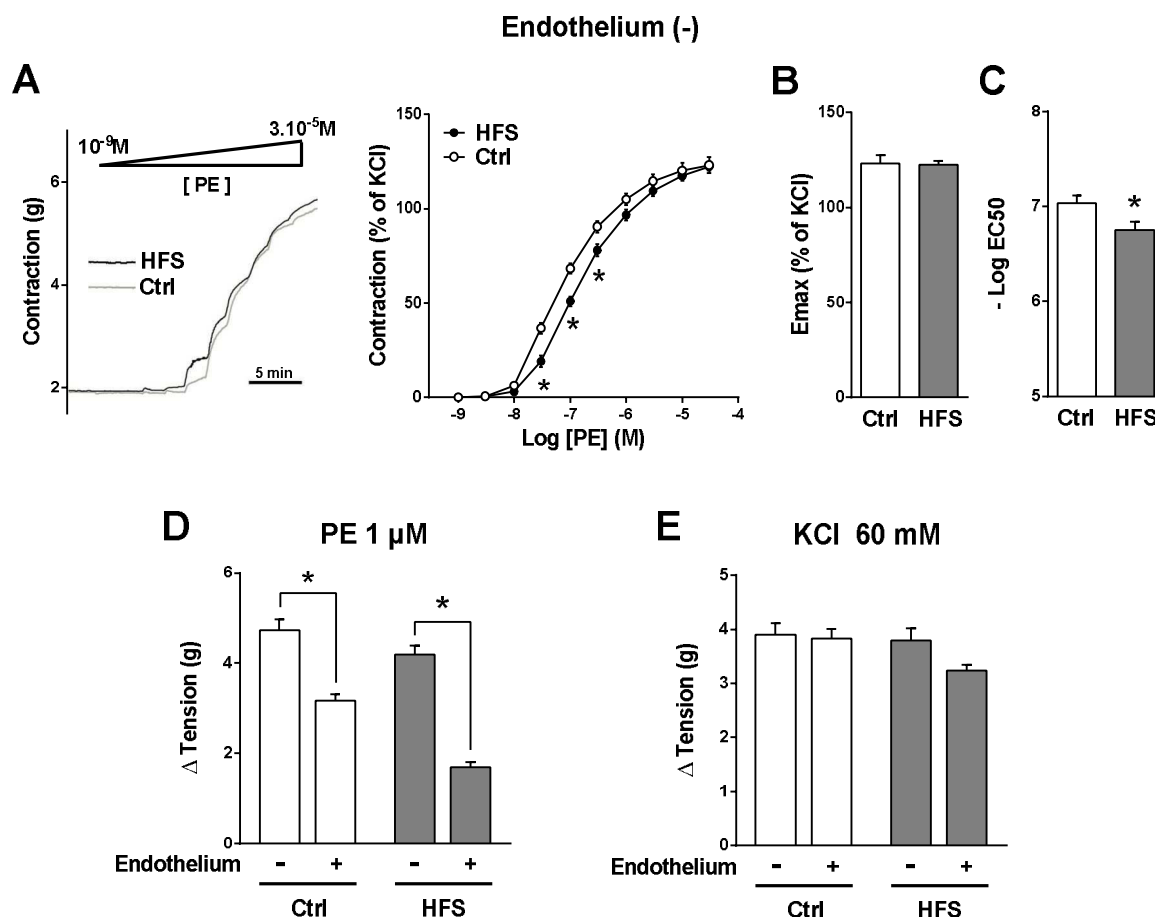


Figure 4. Endothelium mediates vascular α 1-adrenergic hyporeactivity in HFS rats. A: Left: Representative recordings demonstrating the responses evoked by PE in aortic rings of Ctrl and HFS rats on which endothelium was removed. Right: Dose-dependent response to cumulative dose of PE on aortic rings on which endothelium was removed expressed relative to the amplitude of contraction with KCl. B: Maximal contraction of aortic rings to PE. Data are expressed in percent contraction relative to maximal contraction obtained with 60 mM KCl. C: Logarithm of PE concentration inducing 50% of maximal response (EC₅₀) to PE on aortic rings on which endothelium was removed. D: Developed tension by aortic rings with or without endothelium in response to 1 μ M of PE. E: Developed tension by aortic rings with or without endothelium in response to 60 mM of KCl. Values are the mean $\pm$ SEM. *P<0.05 vs. Ctrl group.

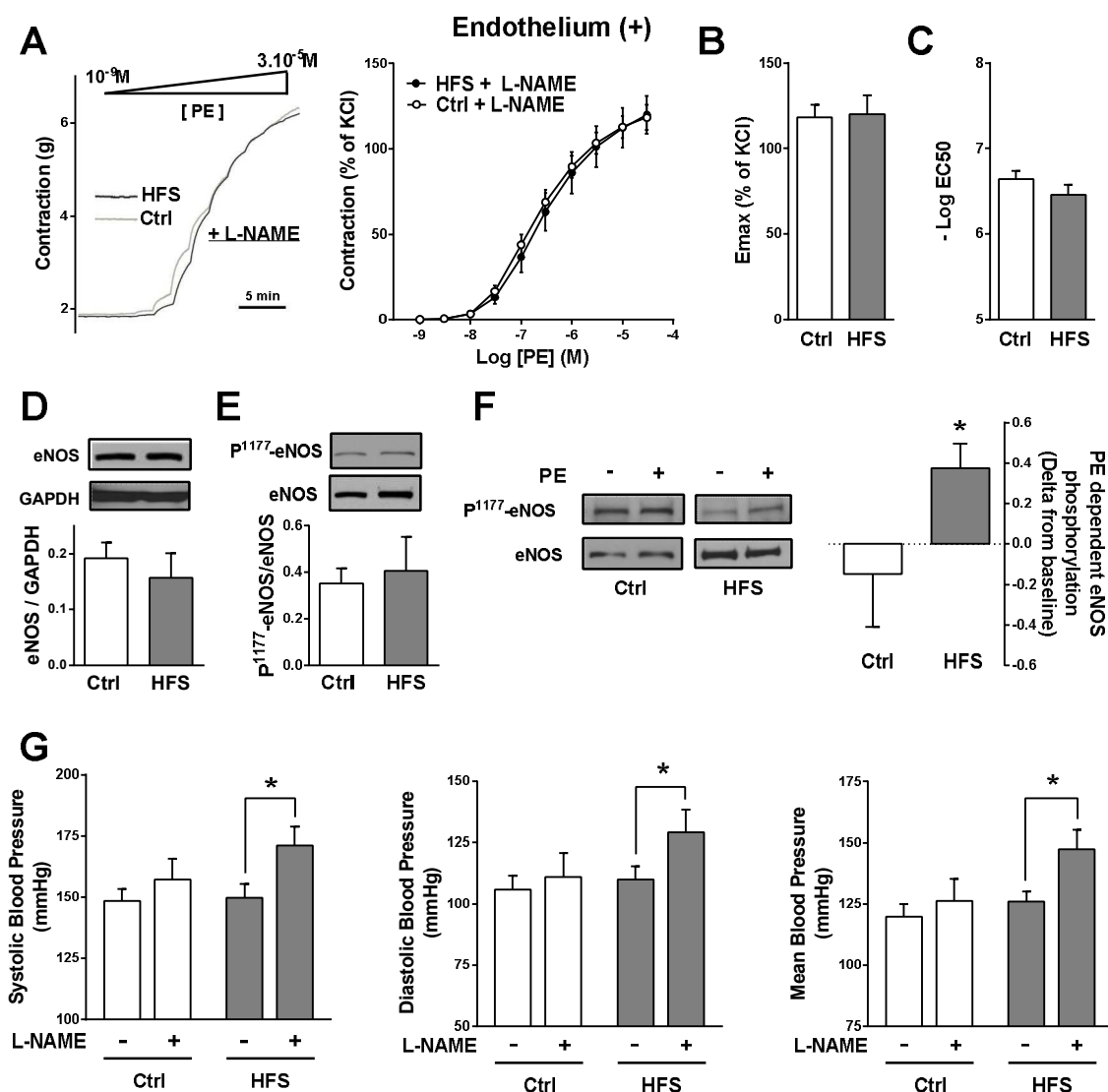


Figure. 5. Endothelial nitric oxide synthase depresses vascular α 1-AR dependent vasopressor activity in HFS rats. A: Left: Representative recordings demonstrating the responses evoked by PE in aortic rings of Ctrl and HFS rats that were pre-treated with L-NAME (0.3 mM). Right: Dose-dependent response to cumulative dose of PE on aortic rings pre-treated with L-NAME (0.3 mM). B: Maximal contraction of aortic rings to PE. Data are expressed in percent contraction relative to maximal contraction obtained with 80 mM KCl. C: Logarithm of PE concentration inducing 50% of maximal response (EC50) to PE on aortic rings that were pre-treated with L-NAME (0.3 mM). D: eNOS expression measured in aortic tissue lysates by Western immunoblotting. E: eNOS phosphorylation at Ser 1177 (P¹¹⁷⁷-eNOS) measured in aortic tissue lysates by Western immunoblotting. F: PE dependent eNOS phosphorylation at Ser 1177 (P¹¹⁷⁷-eNOS) measured by Western immunoblotting in tissue lysates of aorta pre-incubated à 37°C with or without PE (10 μ M) for 15 min. The values

correspond to the difference between eNOS phosphorylation measurement obtained in samples of a same aorta that were previously incubated in Krebs-HEPES solution with or without PE (10 μ M). G: Mean, systolic and diastolic blood pressure measured before and after intraperitoneal injection of L-NAME (20mg/kg). Values are the mean $\pm$ SEM. *P<0.05.

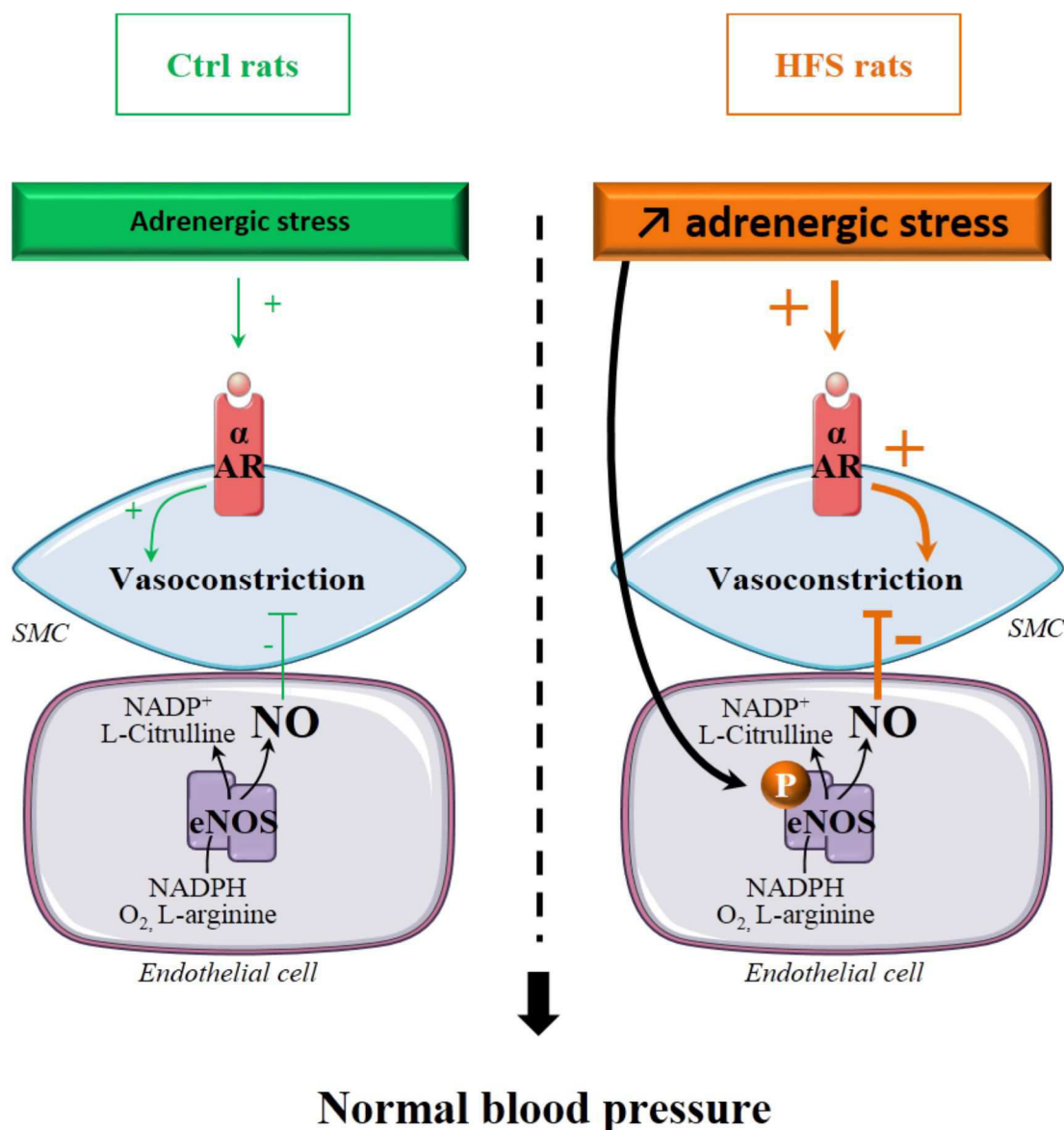


Figure. 6. Endothelium masks increased sympathetic vasopressor activity in rats with metabolic syndrome. In control condition, adrenergic vasoconstriction is blunted by eNOS-NO anticontractile activity. In HFS rats, vasoconstrictive adrenergic influence is increased but does not translate into elevated blood pressure because of a greater eNOS-NO anticontractile activity.

Résultats additionnels

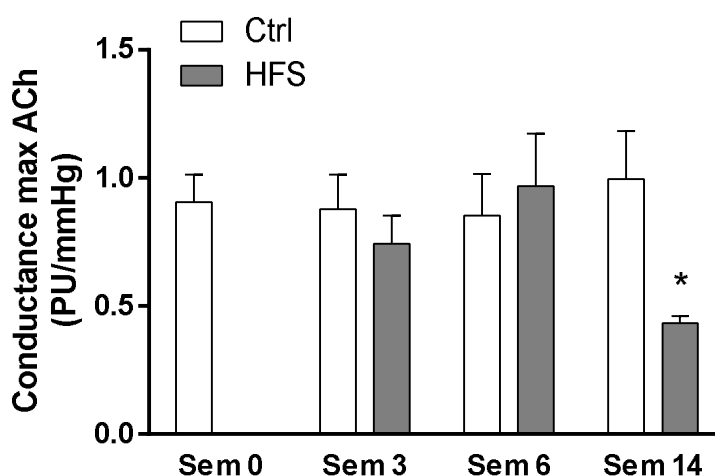


Figure 36: Suivi longitudinal du flux sanguin cutané mesuré par Laser Doppler, en réponse à une iontophorèse d'acétylcholine (ACh) permettant d'évaluer la fonction de relaxation vasculaire endothélium-dépendante au niveau de la microcirculation cutanée de rats sains (Ctrl) et SMet (HFS). Les résultats sont exprimés en conductance (PU/mmHg)* : $p < 0.05$ vs Ctrl. Les valeurs ont été exprimées en moyenne $\pm$ SEM.

ETUDE N°3

**Effets bénéfiques de l'exercice physique sur la fonction vasoactive
du PVAT de rats obèses.**

~ • ~

**Exercise training impacts perivascular adipose tissue in obese rats: beneficial
consequences on vascular function.**

C. Meziat, D Boulghobra, E. Strock, S. Battault, J. Peyrol, A. Do Nascimento, B. Jover, N.
Gayrard, S. Gayrard, G Walther, C Reboul

Article en préparation

RÉSUMÉ D'ARTICLE

Contexte scientifique

Depuis quelques années, un nouvel acteur impliqué dans la régulation de la fonction vasculaire est apparu : le tissu adipeux périvasculaire (PVAT). En condition physiologique, celui-ci semble participer au maintien de l'homéostasie vasculaire grâce notamment à des échanges de molécules vasoactives avec les cellules de l'endothélium et du muscle lisse vasculaire (Lohn et al., 2002 ; Wojcicka et al., 2010). Cependant, en situation pathologique, comme dans le cadre de l'obésité ou du syndrome métabolique, ce tissu adipeux semble participer à l'installation de dysfonctions vasculaires (Ketonen et al., 2010 ; Marchesi et al., 2009). L'exercice physique est connu pour être une stratégie préventive et thérapeutique intéressante dans le traitement des pathologies cardiométaboliques (Roque et al., 2013). En effet il permet, en augmentant la biodisponibilité du NO, de prévenir ou d'améliorer la fonction vasculaire chez des sujets sains comme chez des sujets souffrants de désordres métaboliques (Maiorana et al., 2003). Plus récemment, des travaux ont démontré que l'exercice physique est capable de modifier le phénotype et le métabolisme du tissu adipeux, réduisant ainsi ses effets délétères sur la physiologie cardiovasculaire (Thompson et al., 2012). Néanmoins, aucune étude à ce jour ne s'est intéressée aux effets de l'exercice physique sur le PVAT dans le cadre de pathologies métaboliques. **Ainsi, au cours de cette étude, nous avons évalué, chez un modèle de rats syndromes métaboliques, les effets de l'exercice physique sur la biocommunication entre le PVAT et la fonction vasculaire. Une attention toute particulière a été portée sur le couple stress oxydant / eNOS..**

Méthodologie

Des rats males Wistar ont été soumis à un régime riche en lipides et en sucre (HFS : *high fat high sucrose*) pendant 15 semaines. Après 6 semaines, les rats ont été assignés aléatoirement au groupe de rat sédentaire (HFS) ou entraînés (HFS-Ex). Des tests de vasoréactivité de l'aorte ont été réalisés sur ces animaux au terme du régime, en présence ou non de PVAT autour du vaisseau. Dans un deuxième temps, nous avons évalué l'influence du secretome des PVAT de rats contrôles (Ctrl), HFS et HFS-Ex, sur des anneaux d'aortes saines. Afin de caractériser ce PVAT, des coupes histologiques ont été réalisées permettant de visualiser le phénotype du PVAT, et d'évaluer la production d'espèces oxygénées réactives

par fluorescence. Enfin, l'expression protéique de la thermogénine (UCP-1), de l'adiponectine, de la eNOS ainsi que sa phosphorylation (Ser 1177), a été mesurée au sein du PVAT et du secrétome. L'expression et la phosphorylation de la eNOS ont été quantifiées au niveau du tissu artériel.

Résultats majeurs

Au terme du régime, la masse et la « brunisation » du PVAT des rats HFS avait tendance à être augmentée par rapport au groupe Ctrl. De manière intéressante, l'exercice a permis de normaliser la masse du PVAT et de potentialiser le phénomène de « brunisation » du tissu. Nous avons observé qu'en l'absence de PVAT, le régime HFS avait tendance à altérer la relaxation liée à l'endothélium, alors que lorsque le PVAT était présent autour de l'artère HFS, sa sensibilité à l'ACh était augmentée. L'exercice physique a permis de potentialiser la relaxation endothélium-dépendante et la sensibilité du muscle lisse vasculaire au monoxyde d'azote, et ceci était encore plus marqué en présence du PVAT. De manière intéressante, le secrétome du PVAT d'animaux HFS sédentaire est à l'origine d'une dysfonction endothéliale marquée alors que ce phénomène n'est pas observé chez le secrétome du PVAT d'animaux HFS-Ex. Il est de plus intéressant de noter que l'exercice physique permet de prévenir les effets délétères du régime HFS sur la voie adiponectine/eNOS et de limiter la production d'ERO dans la paroi vasculaire. **Cette 3^{ème} étude de mon travail de doctorat, a permis de montrer que l'exercice physique permet de prévenir les modifications des propriétés vaso-actives du PVAT liées à un régime HFS. Ce phénomène pourrait être expliqué par une amélioration du statut oxydant de la paroi artérielle, et à une potentialisation de la voie adiponectine/eNOS par l'exercice physique.**

Exercise training impacts perivascular adipose tissue in obese rats: beneficial consequences on vascular function.

C. Meziat¹, D Boulghobra¹, E. Strock¹, S. Battault¹, J. Peyrol¹, A. Do Nascimento^{1,2}, B. Jover^{3,4}, N. Gayrard⁴, S. Gayrard¹, G Walther¹, C Reboul¹

¹ LAPEC EA-4278, Avignon University, F-84000 Avignon, France.

² Laboratory of Cardiovascular Investigation, RJ, Brasil

³ Cardiac and Muscle Physiology Laboratory – PHYMEDEXP, INSERM U1046, UMR CNRS 9214, Montpellier University, F34093, Montpellier, France.

⁴ Pharmacology and Diabetes Innovation Laboratory EA-7288, Montpellier University, F34093, Montpellier, France.

Running Head: Exercise training alters perivascular adipose tissue effect in obesity.

Corresponding author:

Cyril Reboul

Cardiovascular Physiology Laboratory – EA4278

Faculty of Sciences, Avignon University

33 rue Louis Pasteur, 84000 Avignon, France

Phone: +33 490162946

E-mail: cyril.reboul@univ-avignon.fr

And

Guillaume Walther

Cardiovascular Physiology Laboratory – EA4278

Faculty of Sciences, Avignon University

33 rue Louis Pasteur, 84000 Avignon, France

Phone: +336 22 37 15 10 / +334 90 16 29 45

E-mail: guillaume.walther@univ-avignon.fr

Abstract

Background: The perivascular adipose tissue (PVAT), a new key regulator of vascular function, seems beneficial in healthy arterial tissue but deleterious in subjects with metabolic disorders. Exercise training is widely known to modulate vascular tone, and has also been demonstrated to impact adipose tissue biology. Here we evaluated for the first time the impact of exercise training on PVAT of obese rats and its potential consequences on vascular function.

Methods: Male Wistar rats were fed with high fat high sucrose diet (HFS) for 15 weeks. After 6 weeks rats were randomly assigned into two groups: sedentary or exercised group (HFS ex).

Results: We reported increased PVAT mass in HFS rats associated with a tendency to increase both white to brown adipocytes ratio and uncoupling protein 1 level. Interestingly, exercise training normalized PVAT mass and markedly increased this browning process. In HFS rats, no deleterious effect of PVAT was observed on ACh response of aortic rings. However, when the secretome of the PVAT of HFS animals was tested on healthy aortic rings strong deleterious effects appeared. In exercised HFS animals this phenomenon was totally blunted. Interestingly, the improvement of the aortic response to ACh, obvious in free PVAT aortic rings, was potentiated in aorta with PVAT, suggesting a role of PVAT in the beneficial effect of exercise. Finally, we observed that HFS diet resulted altered adiponectin-eNOS pathway in PVAT, whereas exercise training normalized this pathway at the level seen in Ctrl animals and reduced ROS production in the aortic wall.

Conclusion: To conclude, exercise training is able, in obese animals, to restore the adiponectin-eNOS pathway in the PVAT which could contribute to the reduction of ROS production in the aortic wall and to the subsequent increase in vascular endothelial function.

INTRODUCTION

Obesity and its closely associated complications, known as metabolic syndrome, are associated with poor cardiovascular prognosis and constitute then a global healthcare phenomenon. Indeed, obesity has numerous adverse effects on vascular (Steinberg et al., 1996; Walther et al., 2015) and cardiac function (Iacobellis et al., 2002). Especially, vascular dysfunction appears as an early trigger of cardiovascular outcomes (Cai and Harrison, 2000). Despite the underlying biological mechanisms are not fully understood, endothelial dysfunction appears as a key element (Hadi et al., 2005). Indeed, increased inflammatory processes as well as nitro-oxidative stress observed in those populations, negatively impact the endothelial function (Heitzer et al., 2001; Hamilton et al., 2013) and especially the ability of the endothelium to synthesize nitric oxide (NO) by the endothelial NO synthase (eNOS) (Forstermann et al., 2006).

Recently, a new potential player of the vascular dysfunction is under the spotlight, the perivascular adipose tissue (PVAT). PVAT has been recently recognized as an active endocrine and paracrine organ (Lee et al., 2011; Weston et al., 2013) and emerges as a potential key regulator of vascular function. Its localization, close to the smooth muscles layer of most of systemic blood vessels made him a potential potent regulator of vascular function, like the endothelium in its own time. Indeed, PVAT is able to secrete some relaxing factor, named PVAT-derived relaxing factors (PVRF), that modulate the vasoconstrictive response to adrenergic stress (Dubrovskaya et al., 2004; Takemori et al., 2006), by both endothelium-dependent and independent mechanisms (Wojcicka et al., 2011; Gao et al., 2007). Interestingly, this anti-contractile effect is lost in subjects with metabolic disorders. This is obvious in humans (Greenstein et al., 2009) as well as in rodents (Marchesi et al., 2009). In such pathological states, PVAT even contributes to increased ROS production in the aortic wall (Antonopoulos et al., 2015; 2015; Xia et al., 2016) and to reduce vascular function.

Dysfunctional state of eNOS (Xia et al., 2016) and alteration of adiponectine-dependent pathways (Antonopoulos et al., 2015) appears implied.

Thus PVAT could be considered as an interesting target to prevent or correct vascular dysfunctions in such pathological populations. Among strategies well described to impact both adipose tissue and the cardiovascular system, exercise training is recognized as efficient and is highly recommended in patients with metabolic disorders for the prevention and rehabilitation of cardiovascular diseases (Thijssen et al., 2010). Indeed, exercise training is well known to improve vascular endothelial function in healthy subjects (Green et al., 2011) as well as in some pathologies (Pedersen et al., 2006). This seems to be mainly due to the beneficial effects of exercise on eNOS level and activation state (Zhang et al., 2009; Farah et al., 2013). Exercise also impacts the adipose tissue. Indeed, its effects on lipid metabolism (Berg et al., 1994; Teixeira Lemos et al., 2009), adipocytes size and lipid content reduction (Gollisch et al., 2009; Thompson et al., 2012) are well described. In addition, exercise training is also associated with a browning of white subcutaneous adipose tissue, and thus with increased of its metabolic rate (Sutherland et al., 2009; Stanford et al., 2015; Vernochet et al., 2012). To the best of our knowledge, only one study was interested by the effect of exercise on PVAT and reported in healthy rats that exercise training impacted the phenotype of PVAT but has no alteration on its vascular effects (Araujo et al., 2015). The impact of exercise training on the PVAT of obese animals and its consequence on vascular function has never been challenged.

In this study we aim to investigate, using a model of high fat high sucrose diet in rats, whether exercise training is able to modulate the phenotype of PVAT and its impact on the control of vascular function.

MATERIALS AND METHODS

Animal model

All investigations conformed to the European Parliament Directive 2010/63/EU (N° CEEA-00322.03) and were approved by the local research ethics committee (n°84.004).

Male Wistar rats (200-225g) from Janvier (France) were used for this study, housed four by cage under controlled conditions of temperature ($21^{\circ}\text{C} \pm 1$), hygrometry ($60\% \pm 10$) and lightening (12 hours a day), with free access to tap water and standard food. After one acclimation week, rats were randomly assigned into three different group: control rats (Ctrl rats; N=55) fed with standard diet (A04, SAFE, France), rats fed with high fat and high sucrose diet (HFS diet, 230 HF, SAFE, France completed with 10% sucrose in drinking water; HFS rats, N=37) for 15 weeks, and HFS exercised rats fed with HFS diet and exercised from the 6th week of the diet to the end of the experiments (HFS-Ex; N=32). The exercise program consisted in treadmill running once per day, four times a week for 9 weeks at 60% of their maximal aerobic velocity (MAV) for one hour.

Preparation of isolated thoracic aortic rings

After the diet ended, rats were anesthetized (sodium pentobarbital, 120 mg.kg⁻¹, i.p.) and thoracic aorta was quickly removed and placed in cold Krebs-Henseleit bicarbonate buffer (composition in mM: NaCl 118; NaHCO₃ 25; Glucose 11; KCl 4.8; KH₂PO₄ 1.2; MgSO₄·7H₂O 1.1; CaCl₂ 1.25). In some experiments, PVAT surrounded was excised ((-) PVAT) or not ((+) PVAT), and aorta was cut into 2-3mm thick. The aortic rings were mounted into stainless steel supports and suspended in the tissue bath containing Krebs-Henseleit buffer at 37°C continuously bubbled with O₂-CO₂ gas mixture (95%-5%). The rings were connected to an isometric force transducer (EMKA technologies, EMKA Paris, France), and linked to an amplifier (EMKA technologies, EMKA Paris, France), and a

computer acquisition system to record changes in isometric force. After equilibration for 45mn, the intactness of endothelium was confirmed by acetylcholine (ACh, 10 μ M) in phenylephrine (PE, 1 μ M) pre-contracted vessels. More than 70% vasorelaxation induced by ACh was considered as no injury of the endothelium. Data acquisition was performed using IOX (EMKA technologies, EMKA Paris, France).

Vascular reactivity

In the first series of bioassay experiments (protocol 1), PVAT was left intact around aortas, and endothelium was removed mechanically by inserting a roughened stainless-steel wire into the lumen. Following the integrity test, one dose of potassium chloride (KCl, 60mM) was applied to determine maximal smooth muscle contraction. Then, vascular contraction was assessed by the contractile response to norepinephrine (Nor) (1nM to 10 μ M), on aortic rings incubated with NO synthase inhibitor N ω -nitro-L-arginine methylester hydrochloride (L-NAME, 100 μ M) ((+) L-NAME) or not ((-) L-NAME). Vascular tension was expressed as a percentage of the steady-state tension (100%) induced by KCl.

In the second series of bioassay experiments (protocol 2), endothelium-dependant and independent relaxation in PE (1 μ M) pre-contracted vessels were assessed by measuring the dilatory effect of ACh (1nM to 100 μ M) and sodium nitroprusside (SNP, 1nM to 100 μ M) respectively, on aortic rings (+) or (-) PVAT. The vascular dilatation was expressed as a percentage of maximum response to PE.

In the third series of bioassay experiments (protocol 3), we replaced 1.5mL of the three different PVAT-incubated solution (secretome) in a donor bath chamber to a healthy (Ctrl, (-) PVAT) aorta in an acceptor chamber (Fig 3A). Then we performed a cumulative concentration-dependent response to ACh (1nM to 100 μ M) in PE (1 μ M) pre-contracted aortic

rings. To investigate the part of oxidative stress induced by PVAT secretions, we incubated aortic rings with N-acetylcysteine (NAC, 10 μ M) (secretome-NAC) or not.

In the fourth series of bioassay experiments (protocol 4), we replaces 1.5mL of each secretome (Ctrl/HFS/HFSEx) in a donor bath chamber to respective aorta ((-) PVAT) in an acceptor chamber. Next, we performed a cumulative concentration-dependent response to ACh (1nM to 100 μ M) in PE (1 μ M) pre-contracted aortic rings.

Biochemical analyses

Histological sections

Formalin-fixed PVAT samples were processed through paraffin embedment, sectioned at five microns, stained with hematoxylin and eosin for morphometric determinations. Sections were examined with a TM300 microscope associated with a system of digitization of image (Nikon camera, DXM1200) at X10 magnification.

Western Blot

Immunoblotting of total and phosphorylated eNOS (Ser 1177), Adiponectine, uncoupling protein 1 (UCP-1), was performed using standard techniques. Briefly, proteins from aorta and PVAT homogenates were separated on polyacrylamide-SDS gels and transferred onto PVDF membranes at 100V for 1h30. Membranes were blocked for 1h with 10% milk or 3% bovine serum albumine in Tris-buffered saline containing 0.05 % Tween-20 overnight. Then membranes were incubated with primary antibodies at 4°C (eNOS-PSer 1177 1:500; BD transduction; eNOS, 1:1000 BD Transduction, GAPDH, 1:5000 Santa Cruz; Adiponectin, 1:1000 Cell Signaling; Tubulin, 1:1000 BD Bioscience; UCP1, 1:300 Santa Cruz). Immunodetection was carried out using ECL or ECL Plus system (SuperSignal® West Pico Chemiluminescence Substrate, Thermo Scientific; Luminata TM Forte Western HRP substrate,

Millipore Corporation, respectively) and membranes were then exposed to X-ray films for revelation.

Proteomic profiler evaluation

Capture and control antibodies have been spotted in duplicate on nitrocellulose membranes. PVAT lysates are diluted, mixed with a cocktail of biotinylated detection antibodies, and incubated overnight with the Proteome Profiler Rat Adipokine Array®. After washes, Streptavidin-HRP and chemiluminescent detection reagents are applied, and a signal is produced at each capture spot corresponding to the amount of protein bound. Membranes were exposed to X-ray films for revelation.

ROS measurements with fluorescent dye dihydroethidium (DHE).

Aortic segments with PVAT left intact surround were embedded in Optimal Cutting Temperature compound (OCT from Tissue-Tek) and flash frozen in liquid nitrogen. Frozen sections (14 µm thick) was covered with 10µM DHE on top, incubated in a light-protected humidified chamber at 37°C for 5mn, and a cover slip was applied. Slides were viewed with a fluorescence microscope (OLYMPUS BX60, Excitation: 488nm; emission: 610nm). Images were analysed using the software Image J.

Statistical analyses

Data were expressed as the mean $\pm$ SEM. For comparison of multiple experimental conditions, Student's t test, analysis of variance (ANOVA) or repeated measures ANOVA followed by the Bonferroni adjusted t test were used. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant. Statistical analysis was done using GraphPad Prism software.

RESULTS

Exercise training reduces HFS diet induced obesity and metabolic disorders.

At the end of the 15 weeks of HFS diet visceral fat was increased (2.5 times) in HFS rats compared with Ctrl, whereas no changes in total body weight has been observed (Table 1). Blood glucose as well as blood insulin measured after overnight fasting was markedly higher in HFS than Ctrl rats (Table 1). In addition, blood glucose remained higher throughout the 2-hours IPGTT, as indicated by the higher area under the curve (Table 1). However, the Homeostatic Model Assessment of Insulin Resistance score (HOMA-IR) only tended to be higher in HFS than in Ctrl animals without reaching significance (Table 1). HFS diet resulted also in a 2 times increase in blood triglycerides (Table 1). The efficiency of exercise training in the HFS-Ex group was first confirmed by the higher maximal aerobic velocity in HFS-Ex rats than in sedentary HFS animals (HFS: 25.20 ± 1.46 m.min⁻¹; HFS-Ex: 39.50 ± 0.29 m.min⁻¹; $p < 0.0001$). Exercise training reduced body weight (table 1), that was explained by the lower visceral fat accumulation in HFS-Ex rats (Table 1). Exercise training also reduced the difference between Ctrl and HFS rats concerning fasting blood glucose and insulin but the difference between HFS and HFS-Ex rats did not reach significance (Table 1). However, the glycemic response to IPGTT in HFS rats was significantly reduced by exercise training (Table 1). Finally, exercise training markedly reduced blood triglycerides (Table 1). Altogether, these results indicate that 1) HFS rats are a reliable model of visceral obesity associated with its body of metabolic disorders and that 2) exercise training performed in HFS rats was able to prevent or reduce many features of obesity.

Exercise reduced PVAT mass and increased its brownisation..

In line with results obtained on visceral adipose tissue, HFS diet increased PVAT mass (Figure 1A and B). This was associated with a tendency to increase brown adipose tissue, as

highlighted by the higher number of multilocular adipocytes in HFS PVAT compared to Ctrl ones (Figure 1C). In accordance with this, the level of uncoupling protein 1 (UCP1), used as a marker of thermogenic respiration, tended to be increased in the PVAT of HFS compared to Ctrl ones but did not reach significance (Figure 1D). Exercise in HFS rats (HFS-Ex group) normalized PVAT mass at level seen in Ctrl (Fig 1A and B). In addition, the slight increase in brown adipose tissue seen in PVAT of HFS rats was exacerbated in HFS-Ex as shown by the significant increase of small multilocular adipocytes (Figure 1C) and confirmed by the significant increase of UCP1 level in PVAT of HFS rats (Figure 1D). Those results contribute to show that exercise training is able to impact PVAT as it does on other adipose tissue (Thompson et al., 2012).

Exercise training altered the role of PVAT on vascular function.

It has been previously reported that obesity in mice resulted in a PVAT-dependent alteration of endothelium response to ACh (Xia et al., 2016). Thus, we challenged whether our experimental conditions and their effects on PVAT could affect the endothelium-dependent and independent relaxation of aortic rings. In PVAT free aortic rings, the vasorelaxant response to ACh tended to be reduced in HFS compared to Ctrl ones (Figure 2A). This was obvious regarding maximal response to ACh (R_{max} Ctrl: $69.14 \pm 4.00\%$; HFS: $55.21 \pm 6.89\%$; $p=0.07$). However, no effect was observed when we tested the endothelium-independent vascular smooth muscle cells sensitivity to NO with increasing dose of SNP (Figure 2B). In line with previous work (Lozano et al., 2016; Jenkins et al., 2016), these results strongly supported that HFS diet was associated with endothelium-dependent vascular dysfunction (Figure 2A and B). Next we performed the same experiments but in aorta with PVAT. It has been previously reported that PVAT exacerbates the vascular dysfunction observed in obese mice (Xia et al., 2016). Unexpectedly, in our model the dose-response curve to ACh was

shifted leftward in HFS aorta when compared to Ctrl rats (Figure 2C), meaning of higher sensitivity of aortic rings to ACh (EC_{50} Ctrl: $7.12e^{-07} \pm 1.69e^{-07}M$; HFS: $1.67e^{-07} \pm 3.26e^{-08}M$, $p < 0.05$). The same results were obtained regarding the endothelium-independent response to SNP (Figure 2D), which strongly supports that in presence of PVAT vascular smooth muscle cells sensitivity to NO was improved. In this work, we especially aimed to study whether exercise training is able to modulate the impact of PVAT on vascular function. In line with the literature (Touati et al., 2011), endothelium-dependent relaxation was improved in HFS exercised rats when compared to sedentary HFS ones. Indeed, despite no effect of exercise was observed on the response to SNP (Figure 2B), endothelium-dependent response to ACh was tended to be increased (Figure 2A). This was obvious regarding maximal response (HFS: $55.21 \pm 6.89\%$, HFS Ex: $68.42 \pm 5.06\%$, $p = 0.07$) as well as EC_{50} (HFS: $1.97e^{-7} \pm 5.98e^{-8}M$, HFS-Ex: $9.60e^{-8} \pm 2.08e^{-8}M$, $p = 0.06$). When we performed the same experiments but in aorta with PVAT, we reported that the beneficial effect of exercise on response to ACh was exacerbated (Figure 2C). This phenomenon was not observed when we tested the vascular response to SNP (Figure 2D). Our results can be explained by the effects of our experimental conditions on both the PVAT, the aortic wall and their interactions. Thus, to discriminate the impact on PVAT from those on aortic wall, we next evaluated the impact of PVAT secretion, named secretome, from each experimental populations on healthy aortic rings without PVAT (Figure 3A). We first observed, in line with previous work (Lee et al., 2014), that ACh-vasorelaxation was lowered when performed in presence of the secretome of healthy PVAT (R_{max} without Secretome: $69.14 \pm 4.00\%$ vs R_{max} with Secretome: $39.13 \pm 4.48\%$, $P = 0.0004$). Since, the response to SNP remained preserved (R_{max} without PVAT: $84.85 \pm 2.88\%$ vs R_{max} with PVAT-Secretome: $86.99 \pm 3.17\%$, $P = 0.6$), we can conclude that the effects of the secretome were mainly due to endothelial dysfunction. Interestingly, these effects were strongly exacerbated when healthy aortic rings were incubated with the secretome of HFS

PVAT. Indeed, ACh response of healthy aortic rings incubated with the secretome of HFS rats was markedly lower than those obtained with the secretome of Ctrl rats (Figure 3B). Finally, the effect of exercise training on the PVAT of HFS rats was able to prevent this phenomenon, since in presence of secretome of HFS-Ex rats, the aortic response to ACh was normalized at level seen in Ctrl conditions (Figure 3B). Because no effect of the secretome was observed on the response to SNP whatever the experimental conditions (Figure 3C), we can firmly stipulate that such effects were endothelium-dependent. Altogether those results shown that despite higher sensitivity of vascular smooth muscles to NO in HFS aorta with PVAT, in this group of rats this specific adipose tissue released some deleterious compounds that could have negative effects on healthy arteries. This strongly support the idea of compensatory mechanisms at the level of the aorta in HFS rats. Interestingly exercise training prevented the deleterious effects of PVAT secretion on arterial function and potentiate the vascular response to ACh in aorta with PVAT.

Exercise training impact the adiponectin-eNOS pathway and ROS production in PVAT.

In arterial tissue, vasodilatation is mainly mediated by eNOS-NO dependent vascular smooth muscle relaxation (Ignarro et al., 1999). The eNOS is largely express in the vascular endothelium, but recently has also been observed in PVAT (Xia et al. 2016; Gil-Ortega et al., 2010). Next, we measured the impact of our experimental conditions on eNOS level and phosphorylation on its main activation site serine¹¹⁷⁷ (eNOS-P). In PVAT free aorta, HFS diet only tended to reduce eNOS level (P=0.12; Suppl Figure 1) and has no effect on eNOS-P. In line with previous work (Davis et al., 2003; Dimmeler et al., 1999), exercise training increased both eNOS level and eNOS-Pser1177 (Suppl Figure 1). We next focused our biochemical assay on PVAT. Interestingly, as evidenced by western blot analyses, HFS diet reduced both eNOS level and eNOS-P in PVAT (Figure 4A). Exercise training in HFS rats

totally blunted this phenomenon (Figure 4A). The role of eNOS of the endothelium in the regulation of vascular tone is largely described in the literature (Ignarro et al., 1999; Zhao et al., 2015), however, whether eNOS expressed in the PVAT could impact the vascular function has never been clearly identified. To test this, we challenged in endothelium denuded aortic rings with PVAT the contractile response to norepinephrine in presence or not of L-NAME to inhibit eNOS of the PVAT. No specific effect of L-NAME was reported in Ctrl and HFS aorta, suggesting that eNOS-NO pathway from the PVAT did not contribute directly to modulate aortic response to norepinephrine (Figure 4B and C). In contrast, in HFS-Ex aortic rings, the maximal response to norepinephrine was reduced when compared to HFS (R_{max} HFS: 106.00 ± 4.66 %, HFS-Ex: 93.70 ± 5.52 %; $P < 0.05$). Moreover, L-NAME increased the response to norepinephrine (Figure 4D). In line with the effects of exercise training on eNOS in the PVAT, these results strongly suggest that eNOS from the PVAT of HFS-Ex animals contributed to modulate vascular smooth muscle cells contractile response to adrenergic agonists. Altogether those results contribute to show that eNOS was clearly impacted by our exercise training not only in the endothelium but also in the PVAT. Subsequently, eNOS from the PVAT became efficient to modulate vascular tone.

Despite we reported here some effects of PVAT on vascular smooth muscle cells function, we have shown above that the deleterious effects of the PVAT secretome was obvious only when we challenged the endothelium-dependent vasorelaxation (Figure 3B). When we performed a proteome profile of adipokines secreted by the PVAT we observed that HFS diet have no strong impact on the level of different adipokines (Suppl Figure 2), and that exercise tended to reduce the production of almost all adipokines (Suppl Figure 2). Among the adipokine known to interact with eNOS, adiponectine has been largely studied and shown to activate the eNOS-NO pathway in the cardiovascular system (Hattori et al., 2003; Chen et al., 2003). In addition, it has been reported in type 2 diabetic human that reduced adiponectine

level in PVAT increased ROS production in the arterial wall and thus contribute to the development of vascular dysfunction (Antonopoulos et al., 2015). Interestingly, in our model, when we measured the level of adiponectine by western blot in the PVAT, we reported exactly the same pattern than those observed on eNOS level and phosphorylation. Indeed, in line with the results of Antonopoulos et al. (Antonopoulos et al., 2015), adiponectine level was reduced in HFS PVAT when compared to Ctrl PVAT (Figure 4E). A key result of this work was that exercise training was able to normalize the level of adiponectine in HFS PVAT at level seen in Ctrl PVAT (Figure 4E). Those results were also obvious when biochemical assay were performed on PVAT secretome (Suppl Figure 3). Considering the close relationship between adiponectine availability and ROS production in the arterial wall (Nour-Eldine et al., 2016), we evaluated the level of ROS production by DHE staining in aorta with PVAT. HFS diet tended to increase ROS production, however differences did not reach significance (Figure 4F). Exercise training markedly reduced ROS production in the aortic wall (Figure 4F). Altogether those results reported that exercise training is able, in obese animals, to restore the adiponectine-eNOS pathway in the PVAT which could contribute to the reduction of ROS production in the aortic wall and then to increased vascular endothelial function.

DISCUSSION

The aim of this work was to evaluate the impact of exercise training on PVAT of obese rats and its potential consequences on vascular function. We observed here using a model of HFS diet in rats that exercise training was able to normalize the adiponectine-eNOS pathway in aorta of obese rats, and thus have beneficial effects on vascular function.

PVAT has been previously shown as a key trigger of vascular dysfunction in obese mice (Xia et al., 2016) and type 2 diabetics subjects (Antonopoulos et al., 2015). In our model of high fat and high sucrose diet in rats, we observed yet an improvement of vascular response to ACh in aorta with PVAT, which is explained by higher sensitivity of the VSM to NO in presence of the PVAT. Thus, this result appears contradictory with the scientific literature. However, when we tested the impact of PVAT secretome of HFS animals on healthy aortic rings, clear deleterious effects appeared. Thus, it seems likely that in our model of HFS rats compensatory mechanisms, involving a non-explored communication between smooth muscle cells layer and PVAT, contribute to normalize vascular function during the development of the metabolic pathology. Such discrepancies between our work and the literature could be explained by differences regarding the development of the metabolic diseases. Indeed, our model of HFS diet in rats is surely associated with visceral obesity, however metabolic disorders were not at a late stage of the disease. For example, body mass was not significantly different between HFS and Ctrl rats and no insulin-resistance was obvious. In addition, in our model, PVAT remodelling is characterized by some features of browning adipose tissue, whereas with more prolonged diet and a later stage of the metabolic diseases, a marked whitening of the PVAT has been reported with deleterious effect on vascular function (Ketonen et al., 2010). This reinforce the idea of an early stage of the pathology in our model. Indeed, excessive calories intake results first in an adaptive process named diet-induced thermogenesis (Rothwell et al., 1979). This process contributes to increase energy expenditure and is explained by increased UCP-1 level in the adipose tissue. Such a tendency was also observed in the PVAT of our model, since we observed that HFS diet tended to increase the level of multilocular adipocytes and of UCP1 in the PVAT. It seems then that the whitening of the PVAT tissue is observed only when the excess in calories intake is more prolonged. Thus, it is of main interest to note that, at an early stage of the pathology, deleterious vascular

effects of PVAT secretion were counteracted by compensatory high VSM sensitivity to NO. This suggest that PVAT was impacted by metabolic pathology earlier than the vascular function, and constitute then an early trigger of future vascular disorders. However, further studies are needed to confirm this hypothesis.

Considering this potential forerunner role of PVAT in the development of vascular dysfunction in metabolic diseases, it could constitute an interesting therapeutic target. Among the strategy well known to impact the adipose tissue, exercise training is known as really efficient (Boulé et al., 2001; Mourrier et al., 1997). Indeed, exercise training results in an increased level of beige adipocytes and then of the metabolic rate of white adipose tissue. Beige cells differed from white adipocytes because of their higher metabolic rate and UCP 1 protein level (Enerback et al., 2009; Petrovic et al., 2010). We reported here, in line with previous studies, that exercise training has comparable effect on the PVAT, characterized by reduced adiposity, browning and increased UCP1 level. However, whether the effects of exercise on PVAT have an impact on vascular function remains not clear. In pigs fed with high fat diet, exercise increases anticontractile effect of PVAT but has no effect on relaxing function (Reifenberg et al., 2007). Araujo et al. reported in healthy rats that exercise training impacted the phenotype of PVAT but with no consequences on vascular function (Araujo et al., 2015). In our work, we show for the first time that, in HFS rats, PVAT contributes to the beneficial effects of exercise training on vascular function. Indeed, the improvement of the endothelium-dependent vasodilatation was more obvious in presence of PVAT in HFS-Ex aorta. We also reported that eNOS from the PVAT contribute to blunt the contractile response to NE, independently of the endothelium. Finally, we observed that exercise modulates the release of deleterious vasoactive compounds as observed with the PVAT of HFS rats. PVAT exhibit a heightened proinflammatory state and reduced adipocytic differentiation under basal

conditions. It seems to be highly sensitive to the effects of high-fat feeding, which causes further reductions in adipocytes-associated gene expression. This profile led to thinking that PVAT could play a major role in development of vascular inflammation, which could contribute to atherosclerotic lesion development (Chatterjee et al., 2009). In our model, except for adiponectin, no major effects of the diet were observed on other adipokines. However, exercise training reduced the level of all adipokines and increased the level of adiponectin. The effects of exercise on adiponectin in the adipose tissue are relatively well described (Bruun et al., 2006; Berggren et al., 2005). Indeed, in obese subjects exercise increases plasma adiponectin and its release by the adipose tissue (Wang et al., 2015). However, to the best of our knowledge, this is the first time that this phenomenon is observed in the PVAT. This is of importance since, reduced adiponectin release by the PVAT has been previously shown as a key trigger of vascular dysfunction in type 2 diabetic subjects (Antonopoulos et al., 2015). The role of adiponectin on the vascular tissue is classically explained by its ability to activate the eNOS-NO pathway (Hattori et al., 2003; Xi et al., 2005) and to reduce ROS production (Motoshima et al., 2004). Interestingly, in our model, exercise training is able to prevent the reduction of eNOS and eNOS-P in PVAT of HFS rats and also to reduce ROS production in the wall of aorta with PVAT. Altogether, those results help us to understand why the PVAT secretome of HFS-Ex was less deleterious for the endothelial function than the one of sedentary HFS animals. However, the role of the eNOS expressed in the PVAT on the control of vascular function is not clear. In obese mice, PVAT eNOS is reported to contribute to global arterial oxidative stress, mainly due to its uncoupling state (Xia et al., 2016). However, in our model no difference in ROS production between Ctrl and HFS aorta was observed. This could be due to the early stage of the metabolic disease in our model, as discussed above. Thus, whether eNOS in the PVAT contributes or not to modulate the vascular function in Ctrl and HFS animals remains not clear. However, when the HFS animals

are exercised, the inhibition of eNOS expressed in the PVAT increased the contractile response to NE in endothelium-denuded aortic rings with PVAT, which clearly emphasizes the role of PVAT eNOS on the regulation of vascular tone. These results associated with the beneficial effects of exercise training on adiponectin-eNOS pathway contribute certainly to explain why the beneficial effects of exercise training were more obvious when the PVAT surrounded the aorta.

To conclude, we reported here that PVAT can be considered as an effective player of the beneficial effects of exercise on vascular function in obese animals. Indeed, in addition to its effect on the phenotype of the PVAT, exercise training also impacts the adiponectin-eNOS pathway and also the ROS production in the aortic wall. Altogether, those elements could contribute to the beneficial effects of exercise training on vascular function. This work highlights the PVAT as a potential early trigger of vascular dysfunction in metabolic diseases and that exercise training constitutes an efficient strategy to impact both vascular and PVAT eNOS-dependent signalling.

Disclosures

No authors report conflict of interest

References

- Antonopoulos, A. S. *et al.* Adiponectin as a Link Between Type 2 Diabetes and Vascular NADPH Oxidase Activity in the Human Arterial Wall: The Regulatory Role of Perivascular Adipose Tissue. *Diabetes* **64**, 2207–2219 (2015).
- Araujo, H. N. *et al.* Perivascular adipose tissue and vascular responses in healthy trained rats. *Life Sci.* (2015). doi:10.1016/j.lfs.2014.12.032
- Berg, A., Frey, I., Baumstark, M. W., Halle, M. & Keul, J. Physical activity and lipoprotein lipid disorders. *Sports Med* **17**, 6–21 (1994).
- Berggren, J. R., Hulver, M. W. & Houmard, J. A. Fat as an endocrine organ: influence of exercise. *J. Appl. Physiol.* **99**, 757–764 (2005).
- Boulé, N. G., Haddad, E., Kenny, G. P., Wells, G. A. & Sigal, R. J. Effects of exercise on glycemic control and body mass in type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of controlled clinical trials. *JAMA* **286**, 1218–1227 (2001).
- Bruun, J. M., Helge, J. W., Richelsen, B. & Stallknecht, B. Diet and exercise reduce low-grade inflammation and macrophage infiltration in adipose tissue but not in skeletal muscle in severely obese subjects. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **290**, E961–967 (2006).
- Cai, H. & Harrison, D. G. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ. Res.* **87**, 840–844 (2000).
- Chatterjee, T. K. *et al.* Proinflammatory phenotype of perivascular adipocytes: influence of high-fat feeding. *Circ. Res.* **104**, 541–549 (2009).
- Chen, H., Montagnani, M., Funahashi, T., Shimomura, I. & Quon, M. J. Adiponectin Stimulates Production of Nitric Oxide in Vascular Endothelial Cells. *J. Biol. Chem.* **278**, 45021–45026 (2003).
- Davis, M. E., Cai, H., McCann, L., Fukui, T. & Harrison, D. G. Role of c-Src in regulation of endothelial nitric oxide synthase expression during exercise training. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* **284**, H1449–H1453 (2003).
- Dimmeler, S. *et al.* Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* **399**, 601–605 (1999).
- Dubrovskaya, G., Verlohren, S., Luft, F. C. & Gollasch, M. Mechanisms of ADRF release from rat aortic adventitial adipose tissue. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **286**, H1107–1113 (2004).
- Enerbäck, S. The origins of brown adipose tissue. *N. Engl. J. Med.* **360**, 2021–2023 (2009).

- Farah, C. *et al.* Exercise-induced cardioprotection: a role for eNOS uncoupling and NO metabolites. *Basic Res. Cardiol.* **108**, 389 (2013).
- Förstermann, U. & Münzel, T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation* **113**, 1708–1714 (2006).
- Gao, Y.-J., Lu, C., Su, L.-Y., Sharma, A. M. & Lee, R. M. K. W. Modulation of vascular function by perivascular adipose tissue: the role of endothelium and hydrogen peroxide. *British Journal of Pharmacology* **151**, 323–331 (2007).
- Gao, Y.-J. *et al.* Perivascular adipose tissue promotes vasoconstriction: the role of superoxide anion. *Cardiovasc. Res.* **71**, 363–373 (2006).
- Gil-Ortega, M. *et al.* Adaptative nitric oxide overproduction in perivascular adipose tissue during early diet-induced obesity. *Endocrinology* **151**, 3299–3306 (2010).
- Gollisch, K. S. C. *et al.* Effects of exercise training on subcutaneous and visceral adipose tissue in normal- and high-fat diet-fed rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **297**, E495–504 (2009).
- Green, D. J., Spence, A., Halliwill, J. R., Cable, N. T. & Thijssen, D. H. J. Exercise and vascular adaptation in asymptomatic humans. *Exp. Physiol.* **96**, 57–70 (2011).
- Greenstein, A. S. *et al.* Local Inflammation and Hypoxia Abolish the Protective Anticontractile Properties of Perivascular Fat in Obese Patients. *Circulation* **119**, 1661–1670 (2009).
- Hadi, H. A. R., Carr, C. S. & Al Suwaidi, J. Endothelial dysfunction: cardiovascular risk factors, therapy, and outcome. *Vasc Health Risk Manag* **1**, 183–198 (2005).
- Hamilton, S. J. & Watts, G. F. Endothelial dysfunction in diabetes: pathogenesis, significance, and treatment. *Rev Diabet Stud* **10**, 133–156 (2013).
- Hattori, Y., Suzuki, M., Hattori, S. & Kasai, K. Globular adiponectin upregulates nitric oxide production in vascular endothelial cells. *Diabetologia* **46**, 1543–1549 (2003).
- Heitzer, T., Schlinzig, T., Krohn, K., Meinertz, T. & Münzel, T. Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation* **104**, 2673–2678 (2001).
- Iacobellis, G. *et al.* Influence of excess fat on cardiac morphology and function: study in uncomplicated obesity. *Obes. Res.* **10**, 767–773 (2002).
- Ignarro, L. J., Cirino, G., Casini, A. & Napoli, C. Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **34**, 879–886 (1999).

- Ketonen, J., Shi, J., Martonen, E. & Mervaala, E. Periadventitial adipose tissue promotes endothelial dysfunction via oxidative stress in diet-induced obese C57Bl/6 mice. *Circ. J.* **74**, 1479–1487 (2010).
- Lee, M. H.-H., Chen, S.-J., Tsao, C.-M. & Wu, C.-C. Perivascular Adipose Tissue Inhibits Endothelial Function of Rat Aortas via Caveolin-1. *PLOS ONE* **9**, e99947 (2014).
- Lee, Y.-C. *et al.* Role of Perivascular Adipose Tissue–Derived Methyl Palmitate in Vascular Tone Regulation and Pathogenesis of Hypertension Clinical Perspective. *Circulation* **124**, 1160–1171 (2011).
- Lozano, I. *et al.* High-fructose and high-fat diet-induced disorders in rats: impact on diabetes risk, hepatic and vascular complications. *Nutr Metab (Lond)* **13**, 15 (2016).
- Marchesi, C., Ebrahimian, T., Angulo, O., Paradis, P. & Schiffrin, E. L. Endothelial Nitric Oxide Synthase Uncoupling and Perivascular Adipose Oxidative Stress and Inflammation Contribute to Vascular Dysfunction in a Rodent Model of Metabolic Syndrome. *Hypertension* **54**, 1384–1392 (2009).
- Motoshima, H., Wu, X., Mahadev, K. & Goldstein, B. J. Adiponectin suppresses proliferation and superoxide generation and enhances eNOS activity in endothelial cells treated with oxidized LDL. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **315**, 264–271 (2004).
- Mourier, A. *et al.* Mobilization of visceral adipose tissue related to the improvement in insulin sensitivity in response to physical training in NIDDM. Effects of branched-chain amino acid supplements. *Diabetes Care* **20**, 385–391 (1997).
- Nour-Eldine, W. *et al.* Adiponectin Attenuates Angiotensin II-Induced Vascular Smooth Muscle Cell Remodeling through Nitric Oxide and the RhoA/ROCK Pathway. *Front Pharmacol* **7**, 86 (2016).
- Pedersen, B. K. & Saltin, B. Evidence for prescribing exercise as therapy in chronic disease. *Scand J Med Sci Sports* **16 Suppl 1**, 3–63 (2006).
- Petrovic, N. *et al.* Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *J. Biol. Chem.* **285**, 7153–7164 (2010).
- Reifenberger, M. S., Turk, J. R., Newcomer, S. C., Booth, F. W. & Laughlin, M. H. Perivascular fat alters reactivity of coronary artery: effects of diet and exercise. *Med Sci*

- Sports Exerc* **39**, 2125–2134 (2007).
- Rothwell, N. J. & Stock, M. J. A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis. *Nature* **281**, 31–35 (1979).
- Stanford, K. I., Middelbeek, R. J. W. & Goodyear, L. J. Exercise Effects on White Adipose Tissue: Beiging and Metabolic Adaptations. *Diabetes* **64**, 2361–2368 (2015).
- Steinberg, H. O. *et al.* Obesity/insulin resistance is associated with endothelial dysfunction. Implications for the syndrome of insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **97**, 2601–2610 (1996).
- Sutherland, L. N., Bomhof, M. R., Capozzi, L. C., Basaraba, S. A. U. & Wright, D. C. Exercise and adrenaline increase PGC-1{alpha} mRNA expression in rat adipose tissue. *J. Physiol. (Lond.)* **587**, 1607–1617 (2009).
- Teixeira de Lemos, E. *et al.* Exercise training decreases proinflammatory profile in Zucker diabetic (type 2) fatty rats. *Nutrition* **25**, 330–339 (2009).
- Thijssen, D. H. J. *et al.* Impact of inactivity and exercise on the vasculature in humans. *Eur. J. Appl. Physiol.* **108**, 845–875 (2010).
- Thompson, D., Karpe, F., Lafontan, M. & Frayn, K. Physical activity and exercise in the regulation of human adipose tissue physiology. *Physiol. Rev.* **92**, 157–191 (2012).
- Touati, S. *et al.* Exercise reverses metabolic syndrome in high-fat diet-induced obese rats. *Med Sci Sports Exerc* **43**, 398–407 (2011).
47. Vernochet, C. *et al.* Adipose-Specific Deletion of TFAM Increases Mitochondrial Oxidation and Protects Mice against Obesity and Insulin Resistance. *Cell Metabolism* **16**, 765–776 (2012).
- Walther, G. *et al.* Metabolic syndrome individuals with and without type 2 diabetes mellitus present generalized vascular dysfunction: cross-sectional study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **35**, 1022–1029 (2015).
- Wang, X., You, T., Murphy, K., Lyles, M. F. & Nicklas, B. J. Addition of Exercise Increases Plasma Adiponectin and Release from Adipose Tissue. *Med Sci Sports Exerc* **47**, 2450–2455 (2015).
- Weston, A. H. *et al.* Stimulated release of a hyperpolarizing factor (ADHF) from mesenteric artery perivascular adipose tissue: involvement of myocyte BKCa channels and adiponectin. *Br. J. Pharmacol.* **169**, 1500–1509 (2013).
- Wójcicka, G. *et al.* Differential effects of statins on endogenous H₂S formation in perivascular adipose tissue. *Pharmacol. Res.* **63**, 68–76 (2011).

- Xi, W., Satoh, H., Kase, H., Suzuki, K. & Hattori, Y. Stimulated HSP90 binding to eNOS and activation of the PI3-Akt pathway contribute to globular adiponectin-induced NO production: vasorelaxation in response to globular adiponectin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **332**, 200–205 (2005).
- Xia, N. *et al.* Uncoupling of Endothelial Nitric Oxide Synthase in Perivascular Adipose Tissue of Diet-Induced Obese MiceSignificance. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **36**, 78–85 (2016).
- Zhang, Q.-J. *et al.* Endothelial nitric oxide synthase phosphorylation in treadmill-running mice: role of vascular signalling kinases. *The Journal of Physiology* **587**, 3911–3920 (2009).
- Zhao, Y., Vanhoutte, P. M. & Leung, S. W. S. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *J. Pharmacol. Sci.* **129**, 83–94 (2015).

	Control rats	HFS rats	HFS Ex rats
Body mass (g)	639.0±12.3	640.6±20.5	554.6±17.0 [#]
Visceral fat (g)	24.9±2.4	62.2±4.8 *	39.9±4.0 [#]
Fasting glycemia (mg/dl)	116,5±3,2	137,1±6,9 *	119,8±5,1
Fasting insulinemia (µg/l)	2.67±0.46	3.66±0.46 *	3.45±0.43
AUC-IPGTT	28165±1618	40825±929 *	34566±1866 [#]
HOMA-IR	14.72±2.85	20.72±2.47	19.01±2.74
Triglycerides (mmol/l)	0.41±0.03	0.81±0.06 *	0.56±0.05 [#]

Table: Exercise enhances endothelium-dependant relaxation of aorta. AUC-IPGTT: area under curve intraperitoneal glucose tolerance test; HOMA-IR: Homeostasis model assessment estimated insulino-resistance. Data are presented as Mean ± SEM, *, p<0.05 vs control group, #, p<0.05 vs HFS group.

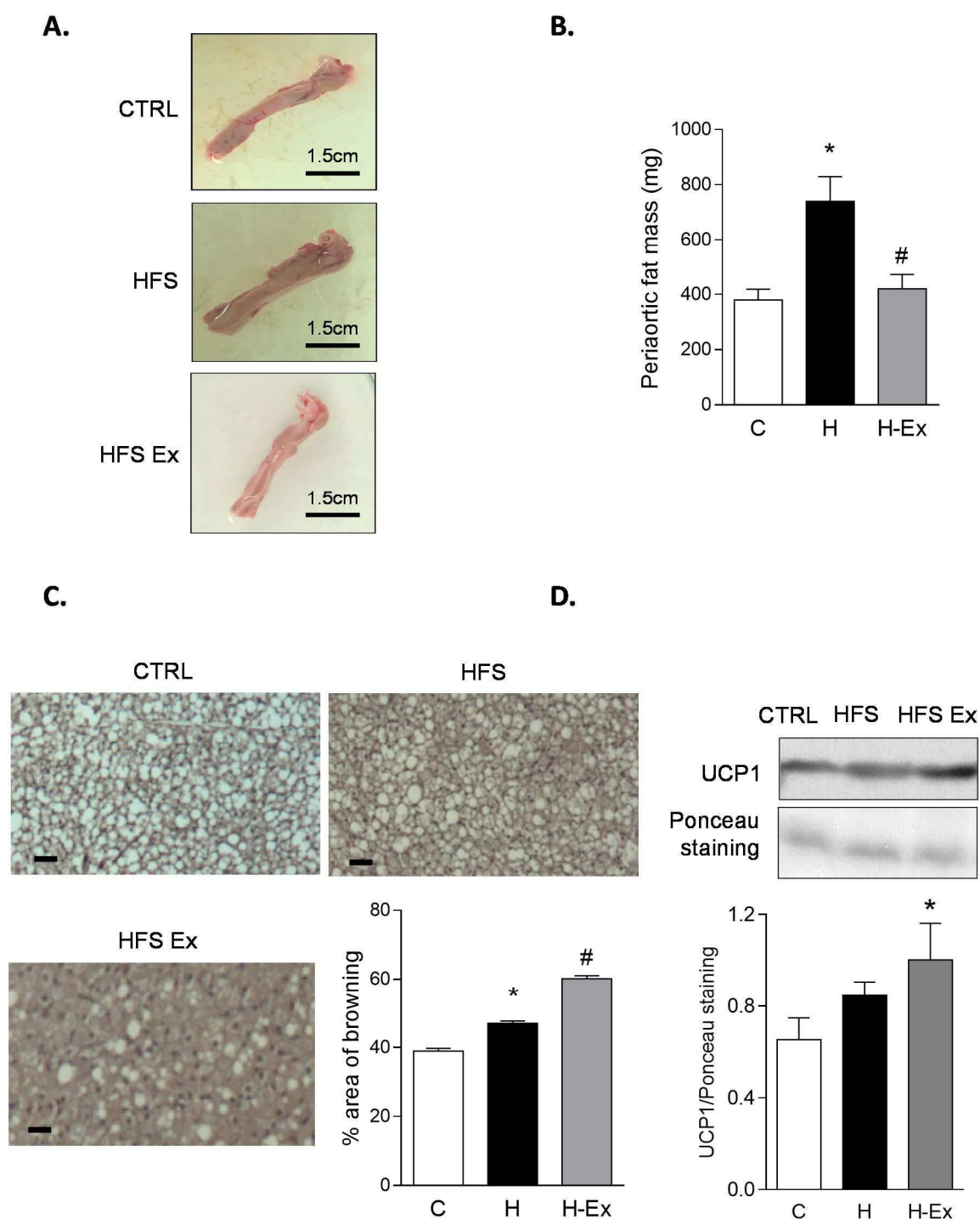


Figure 1. Exercise reduced PVAT mass and increased browning. (A) Representative pictures of aorta with PVAT from Ctrl, HFS and HFS-Ex rats. (B) Periaortic fat mass at the end of the protocol. (C) Light microscopic appearance of perivascular adipose tissue. Tissues were harvested from Ctrl, HFS and HFS-Ex rats, stained with haematoxylin-eosin, sectioned and photographed (magnification X10). Graph represent the percentage of browning area. (D) UCP1 expression measured in PVAT lysates by Western immunoblotting. Scale: 100µm. Data are presented as Mean $\pm$ SEM, *, $p < 0.05$ vs control group, #, $p < 0.05$ vs HFS group.

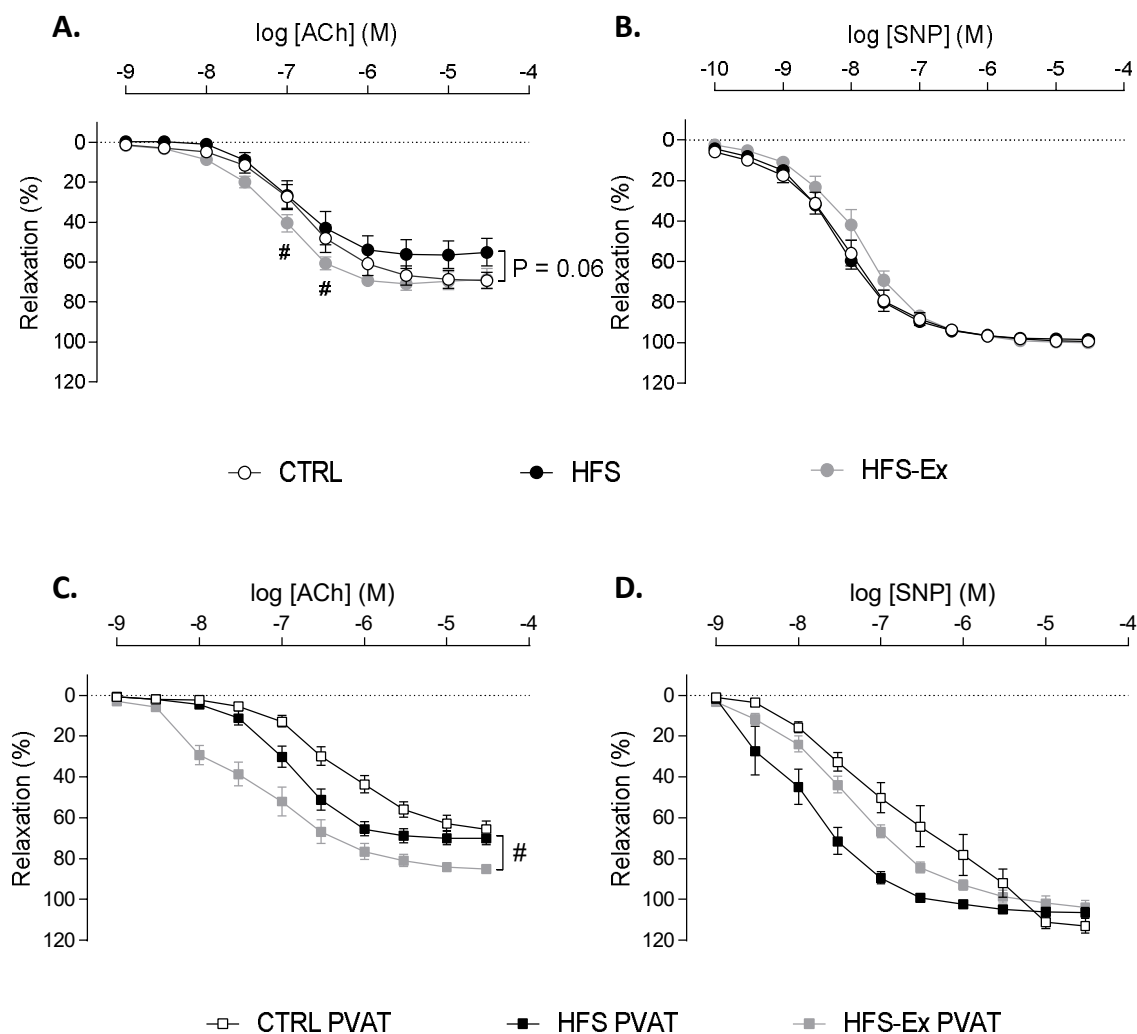


Figure 2. Exercise training altered the role of PVAT on vascular function. Dose-response curves to acetylcholine (A and C), and to sodium nitroprusside (B and D), in aortic ring preparations without PVAT (A and B), and intact aortic ring preparations (C and D). Data are presented as Mean $\pm$ SEM, #, $p < 0.05$.

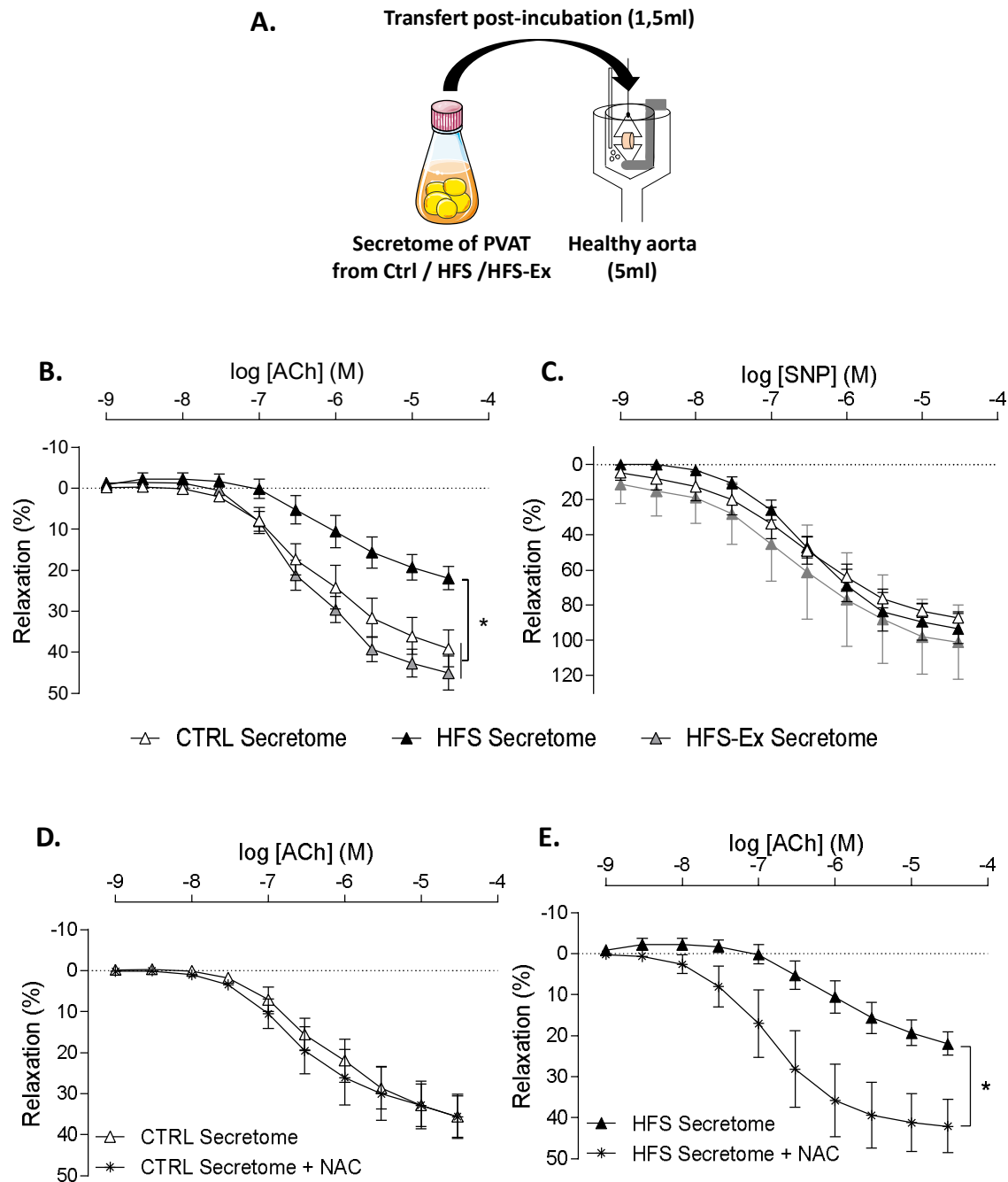
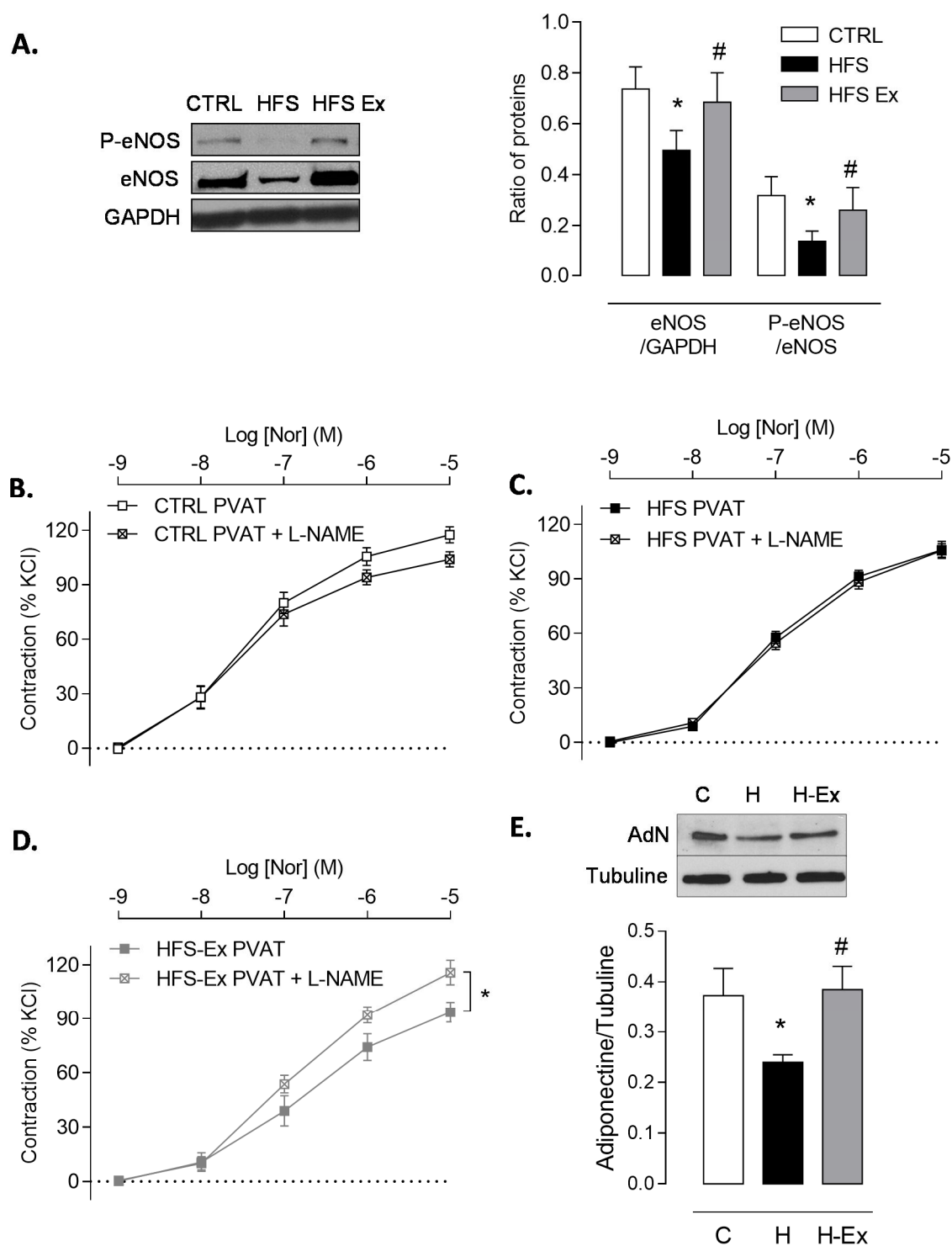


Figure 3. PVAT from exercise rats have enhanced antioxidant properties. (A) Schematic illustration of the bioassay experiments. Secretome (1.5mL) of different PVAT incubated for 30 minutes at 37°C were transferred to healthy aortic preparations without PVAT in a closed acceptor bath chamber. Dose response to acetylcholine (B) and to sodium nitroprusside (C) in healthy aortic rings without PVAT, with effect of Ctrl, HFS or HFS-Ex secretome. Dose response to acetylcholine on healthy aortic rings without PVAT, incubated with Ctrl-secretome (D) or HFS-secretome (E), pre-treated with N-acetylcystein or not. Data are presented as Mean $\pm$ SEM, *, $p < 0.05$.



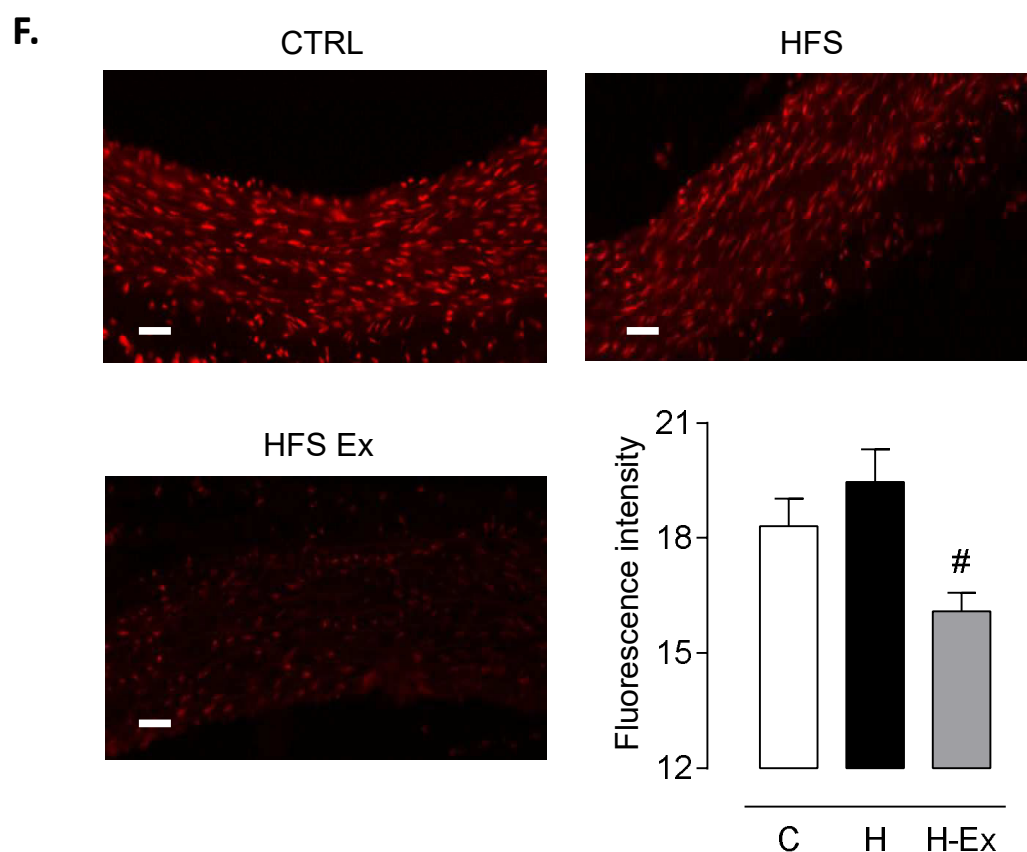
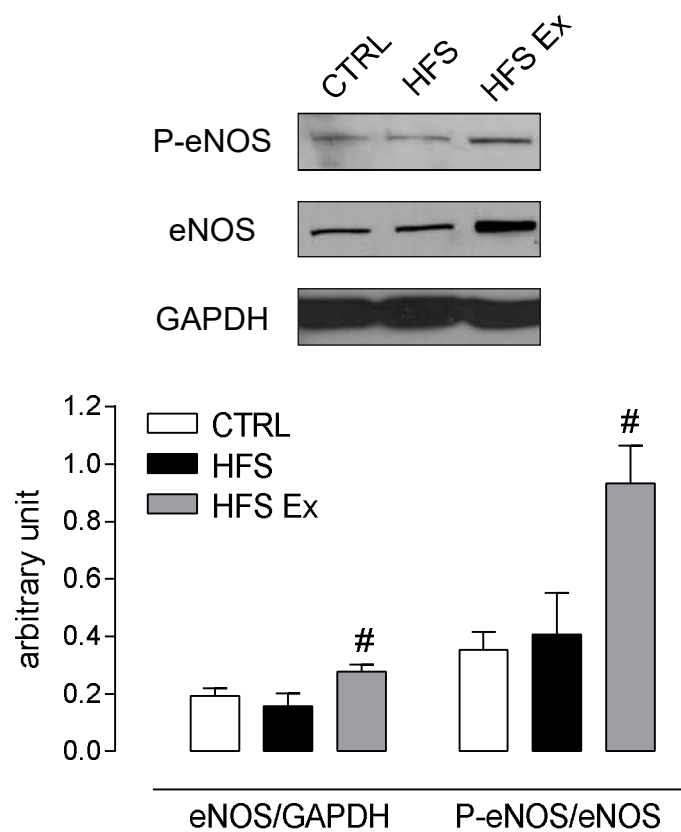
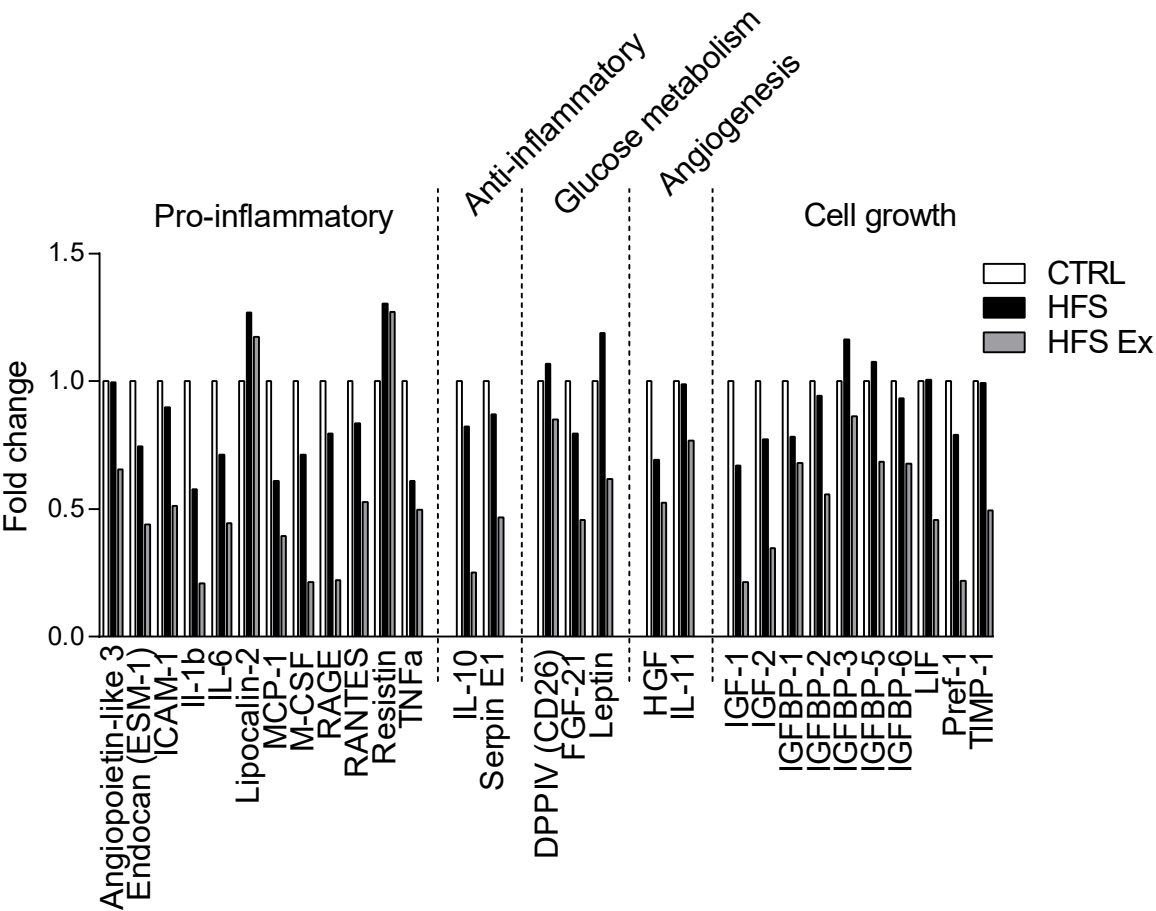


Figure 4: Exercise training impact the adiponectin-eNOS pathway. A. eNOS expression and eNOS phosphorylation at Ser 1177 (P-eNOS) measured in PVAT tissue lysates by Western immunoblotting. Dose response to noradrenaline on Ctrl (B), HFS (C), and HFS-Ex (D) aortic rings with PVAT surrounded, pre-treated or not with L-NAME. (E) Adiponectin expression measured in PVAT tissue lysates by Western immunoblotting. (F) ROS production in aortic wall with PVAT surrounded, assessed by DHE staining in Ctrl, HFS and HFS-Ex rats. Scale: 100µm. Data are presented as Mean ± SEM, *, $p < 0.05$ vs control group, #, $p < 0.05$ vs HFS group.

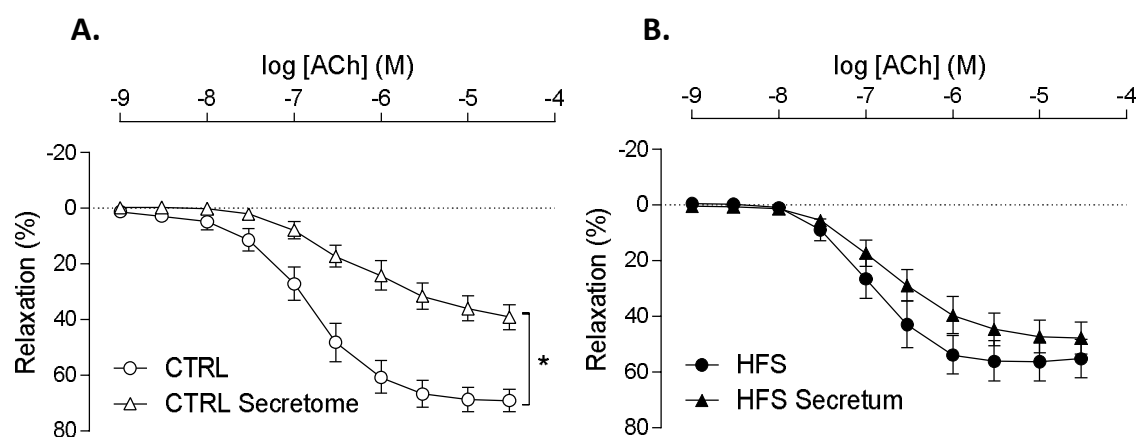
Supplemental Data



Supplemental figure 1. Exercise improves eNOS expression and activation in aorta. eNOS expression and eNOS phosphorylation at Ser 1177 (P-eNOS) measured in aortic tissue lysates by Western immunoblotting. Data are presented as Mean $\pm$ SEM, #, $p < 0.05$ vs HFS group.



Supplemental figure 2. Proteomic profile of PVAT. Adipokines profile from different PVAT lysates were measured with Rat Adipokine Array Kit®. Data are presented as fold change to Ctrl group.



Supplemental figure 3. Vascular consequences of PVAT remodelling. Dose response to acetylcholine on Ctrl (A) and HFS (B) aortic rings without PVAT surrounded, incubated or not with their corresponding PVAT-secretome. Data are presented as Mean $\pm$ SEM, *: $p < 0.05$.

DISCUSSION GÉNÉRALE

Contexte sociétal

Les premières causes de mortalité dans le monde sont les maladies cardiovasculaires ischémiques (maladies coronariennes et accidents vasculaires cérébraux principalement). Ces pathologies se développent massivement dans le cadre de troubles métaboliques associés à l'obésité, au syndrome métabolique et au diabète de type 2 (Fornoni et al., 2005). La prévalence de ces pathologies a fortement augmenté lors de ces dernières décennies, avec en cause une alimentation trop riche en lipides et en sucres ajoutés, et également une trop forte sédentarité des populations.

La modification de l'alimentation chez les populations des pays développés relève de différents facteurs sociaux-économiques qui dépassent notre propos. Cependant l'arrivée des fast food ainsi que l'augmentation de la consommation de plats industriels, peu coûteux et riches en acides gras saturés, participent à l'évolution de la prévalence de l'obésité et du syndrome métabolique (Chen et al., 2012 ; Mejova et al., 2015).

Une sensibilisation des populations au danger de ce type d'alimentation, pourrait limiter leur consommation et ainsi réduire les risques cardiovasculaires associés. Cette sensibilisation, commence par une meilleure compréhension des mécanismes d'action délétères, induits par les troubles métaboliques, liés à ces déséquilibres alimentaires, notamment sur la fonction vasculaire.

C'est pourquoi, au cours de nos différents travaux, nous avons tenté de comprendre comment la fonction vasculaire est impactée par différents désordres métaboliques au cours de stade précoces, favorisant ainsi une éventuelle intervention préventive avant l'installation de dommages irréversibles.

Cible biologique

L'intérêt scientifique est généralement porté sur la compréhension et l'explication de phénomènes responsables d'états pathologiques établis. Il semble pourtant nécessaire de tenter de comprendre l'apparition de désordres physiologiques chez des personnes asymptomatiques, afin de limiter le décours vers un état pathologie avancé.

Dans ce contexte, une partie de nos travaux s'est intéressé aux effets de la consommation de boissons sucrées sur la fonction vasculaire chez les personnes saines. La consommation de produits contenant des sucres ajoutés, est courante dans l'alimentation moderne. En effet, nous pouvons en retrouver dans toutes les préparations industrielles, et

particulièrement dans les boissons de type sodas, boissons énergétiques, eaux aromatisées, et même les jus de fruits. Ces boissons créent un apport considérable de sucres ajoutés à notre organisme, bien au-delà des besoins nutritionnels quotidiens. C'est pourquoi, nous observons une forte corrélation entre l'augmentation de la consommation de ces boissons et l'augmentation de la prévalence de l'obésité (Malik et al., 2006).

Différentes études ont révélé les dangers de ces sucres, notamment leur effet addictif, par une étude comparant la dépendance de rongeurs à la cocaïne et au sucrose (Lenoir et al., 2007). Si les animaux ont dès le départ le choix entre les deux composants, ils vont préférer le sucrose à la cocaïne. De plus, lorsqu'ils présentent du sucrose à des rongeurs dépendants de la cocaïne depuis plusieurs semaines, les animaux vont orienter leur préférence, une fois encore vers le sucrose, malgré la forte dépendance que crée le stupéfiant. Ainsi, en plus du plaisir lié au goût sucré sur les papilles, la consommation de sucre provoquerait une addiction. Cependant, d'autres études sont nécessaires afin de mettre en lumière les connexions nerveuses potentiellement impliquées, et évaluer si cette addiction est liée à la notion de plaisir, ou si la molécule de glucose est capable d'enclencher des mécanismes cellulaires au niveau du cortex cérébral, qui modifieraient la sensibilité des individus à ce composé. Une autre étude intéressante a montré que la consommation excessive de sucre chez des rongeurs femelles en gestation, prédisposait leur fœtus à développer un syndrome métabolique (Saad et al., 2016). De plus, il semblerait que l'association de produits sucrés et riches en lipides, potentialise leur consommation réciproque (Ishimoto et al., 2013).

Ces boissons sucrées contiennent du saccharose, constitué de 45% de glucose et 55% de fructose. Le fructose, un sucre simple contenu principalement dans les fruits, participe à l'élévation de la production de triglycérides, et donc à l'accumulation de masse grasse lorsqu'il est consommé en forte quantité (Jurgens et al., 2005 ; Bantle et al., 2000). Tandis que le glucose agit de manière néfaste sur la fonction vasculaire, et participe d'avantage à l'installation de dysfonctions endothéliales (Ceriello et al., 1996 ; Lorenzi et al., 1986). Ainsi, au cours de notre étude portant sur l'impact vasculaire d'une hyperglycémie aiguë, nous nous sommes particulièrement intéressés au rôle du glucose sur la fonction vasculaire.

L'altération de la fonction vasculaire s'apparente principalement à une dysfonction endothéliale, causée par un déséquilibre de production entre les agents vasoconstricteurs et vasodilatateurs. En effet, l'endothélium, qui pourrait bien être le plus important organe endocrine de l'organisme, libère différents agents responsables de la régulation de

l'homéostasie vasculaire, dont le NO qui joue un rôle prépondérant dans la relaxation endothélium-dépendante des vaisseaux. Ainsi, l'apparition de dysfonction endothéliale est généralement causée par une diminution de la biodisponibilité de NO, liée à une augmentation du stress oxydant (Rochette et al., 2013).

En plus d'être une source calorique importante, ces bombes sucrées modifient de manière transitoire la balance redox des cellules cibles de cette hyperglycémie. En effet comme nous l'avons décrit au cours ce travail de doctorat, et notamment dans une letter (Meziat et al., 2016) en réponse à deux commentaires réalisés sur notre méta-analyse (Loader et al., 2015), une forte concentration de glucose engendre une production excessive d'EOR qui entraînent une diminution de la biodisponibilité du NO. Ce phénomène est lié à une diminution du substrat de la eNOS, la L-arginine, essentielle à la production du gazotransmetteur. En effet, il a été démontré que l'hyperglycémie, *via* une forte production d'EOR, stimule l'expression d'ADMA et d'arginase, responsables de la dégradation de la L-arginine. Les EOR oxydent également le cofacteur essentiel de la eNOS, le BH₄ en BH₂, qui ne peut alors plus jouer son rôle essentiel dans le couplage entre le transfert d'électrons et la synthèse de NO. La eNOS devient alors une source potentielle d'EOR et participe à l'installation d'un stress oxydant. De plus, le NO est une molécule très réactive qui peut se coupler à l'anion superoxyde pour produire du peroxynitrite, un agent oxydant très puissant responsable de nombreux dégâts cellulaires irréversibles.

Ainsi, une hyperglycémie aiguë causée, par exemple, par la consommation d'une boisson sucrée entraîne une altération de la fonction de relaxation liée à l'endothélium, en altérant la voie du NO. Cependant, ces altérations de la capacité de relaxation sont transitoires (Mah et al., 2012), et les mécanismes déterminant le rétablissement de la fonction endothéliale, et notamment du NO ne sont pas bien décrits. Nous pouvons émettre l'hypothèse que dans un premier temps, l'insuline permet de rétablir la glycémie, permettant ainsi de limiter la stimulation de production d'EOR au niveau de la paroi vasculaire. Et dans un second temps, les mécanismes antioxydants restaurent les désordres cellulaires causés par le stress oxydant, permettant ainsi de rétablir la voie de la eNOS et donc la capacité de relaxation endothéliale des vaisseaux.

Une capacité adaptative

Un élément intéressant qui ressort de l'ensemble de ces études, est la capacité de l'endothélium à s'adapter à différents types de stress, à court ou à long terme. En effet, les

dysfonctions endothéliales causées par un stress hyperglycémique aigu, sont transitoires, et donc rapidement rétablit grâce à des mécanismes adaptatifs. En l'occurrence, la capacité de captation du glucose plasmatique par les tissus insulino-sensibles permettant de réguler rapidement la glycémie, mais également les défenses antioxydantes de l'organisme qui permettent de rétablir le déséquilibre redox cellulaire. L'endothélium produit de nombreuses enzymes antioxydantes (SOD, Catalase, glutathione peroxydase), permettant de préserver, ou du moins de restaurer, la biodisponibilité du NO. Le retour rapide de la fonction de relaxation endothéliale permet d'augmenter le flux sanguin et donc l'apport de glucose aux muscles et aux tissus adipeux, favorisant ainsi la baisse de la glycémie.

La réponse adaptative à ce type de stress définit en partie l'état de santé de la fonction vasculaire. En effet, chez des personnes insulino-résistantes ou diabétiques, ces mécanismes adaptatifs sont délétères, les tissus de stockage sont moins sensibles à la stimulation de l'insuline, et les défenses antioxydantes sont dépassées par une trop forte production d'EOR, engendrant des altérations vasculaires permanentes qui participent à l'installation de l'athérosclérose. Cette pathologie vasculaire est caractérisée par une accumulation de processus pro-oxydants et pro-inflammatoires, qui favorisent l'adhésion leucocytaire et la prolifération des cellules musculaires lisses. La formation d'AGE favorise également ce processus athérosclérotique, dont la dangerosité dépend de la rupture de la plaque d'athérome, qui peut venir obstruer des artères, et ainsi aboutir à une ischémie.

C'est pourquoi, aujourd'hui, l'évaluation de la tolérance au glucose est réalisée par un test d'hyperglycémie postprandiale, qui reflète d'avantage la capacité de l'organisme à s'adapter à un stress aigu, grâce notamment, à l'action de l'endothélium. En effet, *via* l'action de l'insuline, l'endothélium participe à la régulation de la glycémie. La stimulation de la voie du NO responsable d'un relâchement artériel, entraîne une augmentation du flux sanguin, qui permet d'augmenter la surface d'échange entre les cellules endothéliales et les molécules circulantes, favorisant ainsi la captation du glucose.

La compréhension des mécanismes biologiques demande de prendre en compte le maximum d'éléments pouvant interagir sur le phénomène étudié. Ainsi, l'étude de la fonction vasculaire ne peut se faire sans la totalité des tissus qui composent et qui participent à la régulation de l'homéostasie vasculaire.

Le modèle de rat syndrome métabolique (SMet) caractérisé au cours de l'étude 2, en accord avec certaines observations faites sur des individus obèses ou SMet (Hugget et al.,

2004 ; Agapitov et al., 2008), ne présente pas d'hypertension artérielle malgré une activité importante du SNS, et une concentration élevée de catécholamines plasmatique. De manière intéressante, notre étude révèle que ce phénomène adaptatif serait lié à une suractivation de la eNOS par un mécanisme adrénérgique, limitant ainsi l'augmentation du tonus vasculaire, et donc de la pression artérielle systémique. Ainsi, lors de phase précoce du développement du SMet, l'endothélium est capable de mettre en place des mécanismes compensatoires qui permettent de limiter les altérations liés aux désordres métaboliques induit par la pathologie. Le SNS agit également au niveau du tissu adipeux. Il régule la capacité lipolytique des adipocytes grâce à des stimulations adrénérgiques, *via* des récepteurs α -adrénérgiques anti-lipolytiques, et des récepteurs β -adrénérgiques lipolytiques. Le SNS agit également au niveau du phénotype des adipocytes, en réduisant notamment leur taille (Lee et al., 2013) et en stimulant le phénomène de « browning » au niveau des adipocytes beiges (Ye et al., 2013), *via* une activation des récepteurs β -adrénérgiques. Cependant, ces phénomènes devront être plus clairement décrits par des études ultérieures.

Depuis quelques années, il apparaît très clairement que le tissu adipeux périvasculaire, jusqu'alors ignoré, semble participer à la fonction biologique des vaisseaux. Il semble ainsi nécessaire de l'inclure dans l'évaluation des capacités d'adaptation vasculaire, au cours d'une phase d'installation de troubles métaboliques chroniques.

De manière intéressante, nos travaux révèlent qu'en présence de son PVAT, le muscle lisse de l'aorte de rats SMet est plus sensible au NO en comparaison aux rats Ctrl, alors que sans la présence du PVAT, la relaxation de l'artère NO-dépendante tend à être délétère. Plusieurs publications ont mis en évidence l'effet anti-contractile du PVAT sur des artères saines, par des mécanismes impliquant l'ouverture de canaux potassiques par des composés tels que le sulfure d'hydrogène (Wojcicka et al., 2010) ou bien le PAME (palmitic acid methyl ester) (Lee et al., 2011). D'autres travaux mettent en évidence que le PVAT pourrait stimuler la guanylate cyclase soluble par le peroxyde d'hydrogène (Gao et al., 2007). La majorité des équipes qui se sont intéressées à l'influence du PVAT sur la fonction vasculaire en condition pathologique ont utilisé des modèles d'animaux ou bien des tissus humains dans des états avancés d'obésité et/ou de diabète de type 2 (Virdis et al., 2014 ; Meijer et al., 2013 ; Ma et al., 2010 ; Galvez et al., 2006). Cependant, Gil Ortega et al. montrent sur des animaux soumis à un régime *high fat* court (8 semaines), une augmentation de la production de NO au

sein du PVAT-HF (Gil-Ortega et al., 2010). Ce phénomène semblerait expliqué par le rôle de la leptine.

Ainsi, lors de la phase précoce de l'installation de pathologie métabolique telle que l'obésité, le phénotype et le profil sécrétoire du PVAT semble se modifier afin de préserver la fonction de relaxation vasculaire. Nous pouvons imaginer que lors de cette phase d'adaptation, la masse du PVAT étant plus importante, les adipocytes ont potentiellement une capacité de production et de sécrétion plus élevée. Ainsi, une quantité plus importante d'agents tels que le PAME, l' H_2S , l' H_2O_2 ou la leptine, peuvent être libérés et stimuler d'avantage la relaxation artérielle, permettant ainsi de préserver le tonus artériel.

De plus, Soltis et Cassis, semblent montrer que le PVAT absorbe les catécholamines, limitant ainsi leur effet pro-contractile. Ceci pourrait expliquer l'absence d'hypertension artérielle chez certains sujets atteints d'obésité ou de syndrome métabolique, dont le PVAT plus épais, pourrait bloquer l'action des catécholamines (Soltis et al., 1991).

Pour mieux évaluer les effets propres des agents vasoactifs produits nous avons utilisé le secrétome du PVAT de nos différents animaux. De manière très intéressante, lorsque l'on met en contact un PVAT de rat SMet a priori non délétère, avec une aorte saine, la capacité de relaxation de l'artère est altérée, et ce *via* un mécanisme a priori, stress oxydant dépendant. Ces résultats démontrent la capacité de l'artère, à s'adapter face à un stress chronique métabolique, et au-delà d'une adaptation endothéliale, on s'aperçoit que la première cible semble être le PVAT. Cette hypothèse est appuyée par la « brownisation » du tissu après les 15 semaines de régime HFS, qui semble témoigner d'une augmentation du métabolisme du tissu *via* une capacité thermogénique plus importante, permettant de transformer une plus grande quantité de substrat en énergie thermique. Malgré cette transformation phénotypique, les sécrétions du PVAT aortique de rat HFS sont délétères pour une artère saine, suggérant que la communication interne entre le PVAT et les tissus artériels est assez complexe, et que les mécanismes d'adaptation ne sont pas seulement liés à la transformation du PVAT. D'ailleurs, lorsque l'on utilise le secrétome du PVAT Ctrl sur une artère Ctrl, la relaxation est diminuée de moitié par rapport à la capacité de relaxation de l'artère avec le PVAT laissé intact autour. L'isolation du secrétome est essentielle à la compréhension des mécanismes impliqués dans l'effet vasoactif du PVAT sur la fonction vasculaire. Cependant la séparation des deux tissus peut altérer la communication. En effet, au niveau des petits vaisseaux, le PVAT s'imbrique dans le tissu artériel, mais la structure est plus complexe pour les gros vaisseaux, où l'adventice forme une barrière entre le tissu artériel et le PVAT. Pour

communiquer avec le tissu sous-jacent, le PVAT utilise le *vasa vasorum*, un complexe artériel composé de petites artérioles et de capillaires (Brown et al., 2014 ; Ahmed et al., 2004). Ainsi, la séparation du PVAT de son tissu artériel au niveau aortique par exemple, annihile les liens entre les composantes vasculaires, et peut limiter l'action de certaines substances vasoactives possédant une demi-vie limitée. L'utilisation de lits artériels perfusés, tel que le lit artériel mésentérique, pourrait être une bonne stratégie permettant d'évaluer la stimulation de l'endothélium ou du PVAT de manière plus spécifique, en préservant les liens entre les différents tissus.

La proximité du PVAT avec le tissu artériel, et sa capacité pro-oxydative et pro-inflammatoire, sont d'un grand intérêt pour la compréhension des mécanismes à l'origine de dysfonction vasculaires, et offrent un large panel d'explorations futures.

L'exercice : une stratégie intéressante pour lutter contre les désordres métaboliques quotidiens.

L'exercice physique est aujourd'hui reconnu pour ses capacités à prévenir et corriger l'apparition de certains états pathologiques (Pedersen et al., 2015). L'OMS a d'ailleurs mis au point en 2010, les « *Recommandations mondiales en matière d'activité physique pour la santé* » afin de préconiser une prévention primaire des maladies non-transmissibles par l'exercice physique sur l'ensemble des populations. On estime que l'inactivité serait responsable de 6 à 10% des décès liés à des pathologies cardiovasculaires (Lee et al., 2012). En effet, la sédentarité est un facteur de risque indépendant du développement d'altérations métaboliques ou cardiovasculaires (Hammer et al., 2012). Ainsi, l'exercice physique est une stratégie de prise en charge globale, très intéressante pour traiter/limiter les désordres métaboliques qui caractérisent le syndrome métabolique (Martin-Cordero et al., 2011 ; Golbidi et al., 2012). De plus, il est bien démontré aujourd'hui que la pratique régulière d'exercice physique entraîne des adaptations vasculaires bénéfiques qui limitent la rigidité artérielle et les dysfonctions endothéliales liées au vieillissement (Santos-Parker et al., 2014). Ces adaptations sont majoritairement associées à l'augmentation de la protection contre le stress oxydant et les phénomènes pro-inflammatoires, qui participent à la réduction de l'épaisseur de la paroi artérielle (Santos-Parker et al., 2014 ; Ashor et al., 2014). Ces améliorations de la fonction vasculaire sont également associées à une augmentation de la

capacité de relaxation des artères, grâce à une stimulation de la voie du NO (Maiorana et al., 2003).

En accord avec la littérature, nos travaux démontrent que l'exercice permet de protéger la fonction vasculaire en amont ou bien pendant l'installation de désordre métabolique. En effet, nous avons montré qu'un protocole d'entraînement modéré permet de limiter les effets néfastes d'un stress hyperglycémique aigu sur la fonction endothéliale. Nous ne pouvons pas parler ici de correction de l'effet délétère de l'hyperglycémie aiguë, puisque ce stress altère significativement la relaxation endothélium-dépendante de nos animaux entraînés en comparaison à la réponse en normoglycémie. Cependant, l'exercice physique potentialise la réponse vasculaire, et la capacité de relaxation endothélium-dépendante est identique chez un animal sédentaire en condition de normoglycémie et un animal entraîné en hyperglycémie. Bien que les capacités de potentialisation des défenses antioxydantes de l'exercice physique sur la fonction vasculaire, ainsi que sur la voie du NO soient des mécanismes potentiellement explicatifs de ce phénomène, d'autres explorations doivent être menées pour le confirmer.

Une stratégie de prévention secondaire a été utilisée sur des animaux développant un syndrome métabolique. Chez ces animaux, l'exercice a permis d'améliorer la fonction vasculaire mais dans sa globalité, c'est-à-dire en prenant en compte l'implication vasoactive du PVAT. D'ailleurs, l'exercice dans ce modèle, semble impacter plus particulièrement le phénotype et le métabolisme du PVAT, plutôt que le tissu artériel (endothélium et muscle lisse vasculaire). Les effets de l'exercice physique sur le tissu adipeux sont aujourd'hui bien décrits, et montrent des effets bénéfiques principalement sur le tissu adipeux sous-cutané abdominal. Une étude menée sur des rats sains, n'a montré aucun impact de l'exercice sur la capacité vasoactive du PVAT, malgré une diminution de la masse de celui-ci dans le groupe de rat entraîné (Araujo et al., 2013). A notre connaissance, deux études seulement, menées par la même équipe, ont évalué ce phénomène en condition pathologique, chez des porcs atteints de dyslipidémie, mais ils ne montrent pas d'amélioration de la fonction coronarienne par l'exercice physique *via* le PVAT. Pourtant, la capacité de l'exercice physique à améliorer la fonction vasculaire, ainsi que le métabolisme et le phénotype du tissu adipeux, en font une stratégie préventive/thérapeutique de choix. Il semblerait intéressant d'étudier le tissu adipeux périvasculaire humain, prélevé chez des personnes obèses, après un protocole de réhabilitation par l'exercice physique. Ce nouvel acteur offre de nouvelles perspectives dans la compréhension de la fonction vasculaire, et pourrait constituer un lien intéressant entre l'obésité ou le syndrome métabolique, et le développement de complications vasculaires.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Ces travaux de doctorat ont permis de mettre en valeurs le rôle clé de la fonction endothéliale et du couple eNOS/Stress oxydant, dans l'adaptation de la réponse vasculaire à différents troubles de l'homéostasie, qu'ils soient métaboliques aigu (boisson sucrée) ou chronique (régime de type « Western »). En effet, dans nos travaux, nous avons pu mettre en avant qu'un simple stress hyperglycémique aigu peut avoir des conséquences fonctionnelles sur la vasomotricité endothélium-dépendante. Néanmoins, en nous appuyant sur la littérature abondante, rapportant des altérations vasculaires endothéliales persistantes chez les sujets souffrant de désordres métaboliques tels que le diabète de type 2 ou le syndrome métabolique, nous interprétons cette dysfonction endothéliale transitoire associée à l'hyperglycémie, comme un élément précurseur de l'installation d'une pathologie vasculaire chronique. Ceci, néanmoins, reste à démontrer. En effet, cette diminution de la réponse de l'endothélium au cours d'un stress aigu est observée sur quelques territoires seulement et pourrait finalement être un élément adaptatif permettant une meilleure distribution sanguine à d'autres territoires corporels, tel que la circulation splanchnique. Il semble donc hâtif de conclure de manière définitive, sur le lien entre cette diminution de la fonction endothéliale au cours d'un stress hyperglycémique, et l'installation d'une pathologie vasculaire persistante. De nouveaux travaux, visant à multiplier ce type de stress et d'en observer les conséquences progressives sur la fonction vasculaire, semblent essentiels afin de pouvoir tirer des conclusions plus fines.

Il ne semble donc pas évident que la fonction vasculaire soit dangereusement impactée par ce type de stress. En effet, comme nous avons pu le montrer dans les études n°2 et n°3, celle-ci possède une forte capacité d'adaptation, lui permettant, même face à un stress récurrent (régime High Fat High Sucrose) de mettre en place un certain nombre de mécanismes régulateurs, aboutissant à une normalisation de ses capacités de réponses physiologiques. Ainsi, dans l'étude n°2, une amélioration de l'activation de la eNOS à un stress adrénérgique semble pouvoir réguler la pression artérielle en dépit de l'hyperactivation sympathique. Dans l'étude n°3, une bio-communication qui reste à élucider entre le PVAT et la musculature lisse du vaisseau, semble contribuer à une amélioration de la sensibilité au NO et ainsi à un maintien des capacités vasomotrices artérielles, en dépit de l'apparition d'une légère dysfonction endothéliale. Une des limites de ce travail de doctorat, est clairement que notre modèle de rat nourrit avec un régime HFS n'a développé qu'un état peu avancé de la pathologie métabolique. Néanmoins, ce qui peut être considéré comme une limite, nous a aussi permis d'étudier des phénomènes physiologiques ne pouvant être observés que dans la

phase précoce de ce type de maladie, et ainsi faire apparaître un certain nombre de mécanismes de compensation, que nous n'aurions certainement pas pu observer à un stade plus avancé. Néanmoins, si ceci semble évident au regard de la littérature scientifique, ces hypothèses doivent être confirmées expérimentalement.

Un élément essentiel de ce travail a aussi été de confirmer le rôle relativement protecteur de l'exercice physique. Comme déjà largement décrit dans la littérature, celui-ci semble pouvoir agir sur le bon fonctionnement du système cardiovasculaire, notamment *via* son action sur l'endothélium artériel et la biodisponibilité du NO. Dans ce travail, nous avons apporté un nouvel élément, en montrant que l'exercice est non seulement capable d'impacter la voie de la eNOS au niveau de l'endothélium vasculaire, mais aussi au niveau du PVAT. Par ailleurs, il semble, à partir de notre travail, que le PVAT puisse aussi constituer une cible privilégiée des effets bénéfiques de l'exercice sur l'homéostasie vasculaire. Cependant, comment le PVAT communique avec l'endothélium artériel et avec le reste du vaisseau, demeure néanmoins une zone d'ombre.

Ainsi, pour conclure, bien que la découverte du rôle de l'endothélium artériel dans la régulation de la fonction vasculaire ne soit pas très récente (Zalthen et al., 1978), la complexité de son rôle et de son impact sur la santé cardiovasculaire, le maintiennent en première ligne dans la compréhension, la modulation et le traitement potentiel de nombreuses maladies cardiovasculaires. La découverte plus récente et moins documentée de son interaction potentielle avec le PVAT, ajoute encore un peu de complexité au schéma de départ. Cependant, ce PVAT contribue à mieux comprendre le fonctionnement de l'endothélium vasculaire, et apparaît comme une potentielle nouvelle cible thérapeutique.

BIBLIOGRAPHIE



- Adams V, Linke A, Kränkel N, et al (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. doi: 10.1161/01.CIR.0000154560.88933.7E
- Agapitov AV, Correia ML de G, Sinkey CA, Haynes WG (2008) Dissociation Between Sympathetic Nerve Traffic and Sympathetically Mediated Vascular Tone in Normotensive Human Obesity. *Hypertension* 52:687–695. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.109603
- Ago T, Kuroda J, Kamouchi M, et al (2011) Pathophysiological Roles of NADPH Oxidase/Nox Family Proteins in the Vascular System. *Circulation Journal* 75:1791–1800. doi: 10.1253/circj.CJ-11-0388
- Ahmed SR, Johansson BL, Karlsson MG, et al (2004) Human saphenous vein and coronary bypass surgery: ultrastructural aspects of conventional and “no-touch” vein graft preparations. *Histol Histopathol* 19:421–433.
- Alberti KGMM, Eckel RH, Grundy SM, et al (2009) Harmonizing the Metabolic Syndrome. *Circulation* 120:1640–1645. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.192644
- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 357:593–615.
- Alvarez GE, Beske SD, Ballard TP, Davy KP (2002) Sympathetic neural activation in visceral obesity. *Circulation* 106:2533–2536.
- Antonopoulos AS, Margaritis M, Coutinho P, et al (2015) Adiponectin as a Link Between Type 2 Diabetes and Vascular NADPH Oxidase Activity in the Human Arterial Wall: The Regulatory Role of Perivascular Adipose Tissue. *Diabetes* 64:2207–2219. doi: 10.2337/db14-1011
- Apovian CM, Bigornia S, Mott M, et al (2008) Adipose macrophage infiltration is associated with insulin resistance and vascular endothelial dysfunction in obese subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28:1654–1659. doi: 10.1161/ATVBAHA.108.170316
- Araujo HN, Valgas da Silva CP, Sponton ACS, et al (2015) Perivascular adipose tissue and vascular responses in healthy trained rats. *Life Sci*. doi: 10.1016/j.lfs.2014.12.032
- Arita Y, Kihara S, Ouchi N, et al (2012) Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. 1999. *Biochem Biophys Res Commun* 425:560–564. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.08.024
- Arvola P, Wu X, Kähönen M, et al (1999) Exercise enhances vasorelaxation in experimental obesity associated hypertension. *Cardiovasc Res* 43:992–1002.



Ballinger SW, Patterson C, Knight-Lozano CA, et al (2002) Mitochondrial integrity and

- function in atherogenesis. *Circulation* 106:544–549.
- Barrière E, Tazi KA, Pessione F, et al (2001) Role of small-conductance Ca^{2+} -dependent K^{+} channels in in vitro nitric oxide-mediated aortic hyporeactivity to alpha-adrenergic vasoconstriction in rats with cirrhosis. *J Hepatol* 35:350–357.
- Basta G, Schmidt AM, De Caterina R (2004) Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. *Cardiovasc Res* 63:582–592. doi: 10.1016/j.cardiores.2004.05.001
- Battault S, Singh F, Gayraud S, et al (2016) Endothelial function does not improve with high-intensity continuous exercise training in SHR: implications of eNOS uncoupling. *Hypertens Res* 39:70–78. doi: 10.1038/hr.2015.114
- Bedford MT, Clarke SG (2009) Protein arginine methylation in mammals: who, what, and why. *Mol Cell* 33:1–13. doi: 10.1016/j.molcel.2008.12.013
- Bełtowski J (2006) Role of leptin in blood pressure regulation and arterial hypertension. *J Hypertens* 24:789–801. doi: 10.1097/01.hjh.0000222743.06584.66
- Benjamin N, Dutton JA, Ritter JM (1991) Human vascular smooth muscle cells inhibit platelet aggregation when incubated with glyceryl trinitrate: evidence for generation of nitric oxide. *Br J Pharmacol* 102:847–850.
- Berg A, Frey I, Baumstark MW, et al (1994) Physical activity and lipoprotein lipid disorders. *Sports Med* 17:6–21.
- Berg AH, Scherer PE (2005) Adipose Tissue, Inflammation, and Cardiovascular Disease. *Circulation Research* 96:939–949. doi: 10.1161/01.RES.0000163635.62927.34
- Berggren JR, Hulver MW, Houmard JA (2005) Fat as an endocrine organ: influence of exercise. *J Appl Physiol* 99:757–764. doi: 10.1152/japplphysiol.00134.2005
- Berry CE, Hare JM (2004) Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J Physiol (Lond)* 555:589–606. doi: 10.1113/jphysiol.2003.055913
- Berul CI, Maguire CT, Gehrman J, Reddy S (2000) Progressive atrioventricular conduction block in a mouse myotonic dystrophy model. *J Interv Card Electrophysiol* 4:351–358.
- Beske SD, Alvarez GE, Ballard TP, Davy KP (2002) Reduced cardiopulmonary baroreflex gain in visceral obesity: implications for the metabolic syndrome. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282:H630–635. doi: 10.1152/ajpheart.00642.2001
- Bivalacqua TJ, Armstrong JS, Biggerstaff J, et al (2003) Gene transfer of extracellular SOD to the penis reduces $\text{O}^{\cdot -}$ and improves erectile function in aged rats. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 284:H1408–H1421. doi: 10.1152/ajpheart.00770.2002
- Blankenberg S, Rupprecht HJ, Bickel C, et al (2003) Glutathione peroxidase 1 activity and cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 349:1605–1613. doi: 10.1056/NEJMoa030535
- Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, et al (1994) Nitric oxide directly activates calcium-

- dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* 368:850–853. doi: 10.1038/368850a0
- Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A (2003) Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:168–175.
- Boo YC, Jo H (2003) Flow-dependent regulation of endothelial nitric oxide synthase: role of protein kinases. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 285:C499–C508. doi: 10.1152/ajpcell.00122.2003
- Boo YC, Sorescu G, Boyd N, et al (2002) Shear stress stimulates phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase at Ser1179 by Akt-independent mechanisms: role of protein kinase A. *J Biol Chem* 277:3388–3396. doi: 10.1074/jbc.M108789200
- Bossy-Wetzel E, Lipton SA (2003) Nitric oxide signaling regulates mitochondrial number and function. *Cell Death Differ* 10:757–760. doi: 10.1038/sj.cdd.4401244
- Boström P, Wu J, Jedrychowski MP, et al (2012) A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature* 481:463–468. doi: 10.1038/nature10777
- Boulbou MS, Koukoulis GN, Makri ED, et al (2005) Circulating adhesion molecules levels in type 2 diabetes mellitus and hypertension. *Int J Cardiol* 98:39–44. doi: 10.1016/j.ijcard.2003.07.037
- Boulé NG, Haddad E, Kenny GP, et al (2001) Effects of exercise on glycemic control and body mass in type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of controlled clinical trials. *JAMA* 286:1218–1227.
- Boulé NG, Kenny GP, Haddad E, et al (2003) Meta-analysis of the effect of structured exercise training on cardiorespiratory fitness in Type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia* 46:1071–1081. doi: 10.1007/s00125-003-1160-2
- Boveris A, Cadenas E (1975) Mitochondrial production of superoxide anions and its relationship to the antimycin insensitive respiration. *FEBS Lett* 54:311–314.
- Bradley RL, Jeon JY, Liu F-F, Maratos-Flier E (2008) Voluntary exercise improves insulin sensitivity and adipose tissue inflammation in diet-induced obese mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295:E586–594. doi: 10.1152/ajpendo.00309.2007
- Brandes RP, Kreuzer J (2005) Vascular NADPH oxidases: molecular mechanisms of activation. *Cardiovasc Res* 65:16–27. doi: 10.1016/j.cardiores.2004.08.007
- Brandes RP, Schröder K (2008) Differential vascular functions of Nox family NADPH oxidases. *Curr Opin Lipidol* 19:513–518. doi: 10.1097/MOL.0b013e32830c91e3
- Britton KA, Pedley A, Massaro JM, et al (2012) Prevalence, distribution, and risk factor correlates of high thoracic periaortic fat in the Framingham Heart Study. *J Am Heart Assoc* 1:e004200. doi: 10.1161/JAHA.112.004200
- Brown CM, Dulloo AG, Montani J-P (2008) Sugary drinks in the pathogenesis of obesity and cardiovascular diseases. *Int J Obes (Lond)* 32 Suppl 6:S28–34. doi: 10.1038/ijo.2008.204

- Brown NK, Zhou Z, Zhang J, et al (2014) Perivascular Adipose Tissue in Vascular Function and Disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 34:1621–1630. doi: 10.1161/ATVBAHA.114.303029
- Brownlee M (2001) Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414:813–820. doi: 10.1038/414813a
- Bruun JM, Helge JW, Richelsen B, Stallknecht B (2006) Diet and exercise reduce low-grade inflammation and macrophage infiltration in adipose tissue but not in skeletal muscle in severely obese subjects. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290:E961–967. doi: 10.1152/ajpendo.00506.2005
- Bunker AK, Laughlin MH (2010) Influence of exercise and perivascular adipose tissue on coronary artery vasomotor function in a familial hypercholesterolemic porcine atherosclerosis model. *J Appl Physiol* 108:490–497. doi: 10.1152/japplphysiol.00999.2009
- Busetto L, Digito M, Dalla Montá P, et al (1993) Omental and epigastric adipose tissue lipolytic activity in human obesity. Effect of abdominal fat distribution and relationship with hyperinsulinemia. *Horm Metab Res* 25:365–371. doi: 10.1055/s-2007-1002121



- Cadenas E, Davies KJ (2000) Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med* 29:222–230.
- Cai H, Harrison DG (2000) Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 87:840–844.
- Cao L, Choi EY, Liu X, et al (2011) White to brown fat phenotypic switch induced by genetic and environmental activation of a hypothalamic-adipocyte axis. *Cell Metab* 14:324–338. doi: 10.1016/j.cmet.2011.06.020
- Cardoso CG, Gomides RS, Queiroz ACC, et al (2010) Acute and chronic effects of aerobic and resistance exercise on ambulatory blood pressure. *Clinics (Sao Paulo)* 65:317–325. doi: 10.1590/S1807-59322010000300013
- Cawthorn WP, Sethi JK (2008) TNF- α and adipocyte biology. *FEBS Lett* 582:117–131. doi: 10.1016/j.febslet.2007.11.051
- Ceriello A, Taboga C, Tonutti L, et al (2002) Evidence for an independent and cumulative effect of postprandial hypertriglyceridemia and hyperglycemia on endothelial dysfunction and oxidative stress generation: effects of short- and long-term simvastatin treatment. *Circulation* 106:1211–1218.
- Chang L, Villacorta L, Li R, et al (2012) Loss of Perivascular Adipose Tissue on Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Deletion in Smooth Muscle Cells Impairs

- Intravascular Thermoregulation and Enhances Atherosclerosis Clinical Perspective. *Circulation* 126:1067–1078. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.104489
- Channon K (2004) Tetrahydrobiopterin: Regulator of Endothelial Nitric Oxide Synthase in Vascular Disease. *Trends in Cardiovascular Medicine* 14:323–327. doi: 10.1016/j.tcm.2004.10.003
- Charkoudian N, Joyner MJ, Barnes SA, et al (2006) Relationship between muscle sympathetic nerve activity and systemic hemodynamics during nitric oxide synthase inhibition in humans. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291:H1378–1383. doi: 10.1152/ajpheart.00234.2006
- Chatterjee TK, Stoll LL, Denning GM, et al (2009) Proinflammatory phenotype of perivascular adipocytes: influence of high-fat feeding. *Circ Res* 104:541–549. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.182998
- Chen C-A, Wang T-Y, Varadharaj S, et al (2010) S-glutathionylation uncouples eNOS and regulates its cellular and vascular function. *Nature* 468:1115–1118. doi: 10.1038/nature09599
- Chen D-D, Chen L-Y, Xie J-B, et al (2014) Tetrahydrobiopterin regulation of eNOS redox function. *Curr Pharm Des* 20:3554–3562.
- Chen H, Montagnani M, Funahashi T, et al (2003) Adiponectin Stimulates Production of Nitric Oxide in Vascular Endothelial Cells. *J Biol Chem* 278:45021–45026. doi: 10.1074/jbc.M307878200
- Chen Hi H–., Chiang I-P, Jen CJ (1996) Exercise Training Increases Acetylcholine-Stimulated Endothelium-Derived Nitric Oxide Release in Spontaneously Hypertensive Rats. *J Biomed Sci* 3:454–460.
- Cheng F, Torzewski M, Degreif A, et al (2013) Impact of Glutathione Peroxidase-1 Deficiency on Macrophage Foam Cell Formation and Proliferation: Implications for Atherogenesis. *PLOS ONE* 8:e72063. doi: 10.1371/journal.pone.0072063
- Chin-Dusting JPF, Willems L, Kaye DM (2007) l-Arginine transporters in cardiovascular disease: A novel therapeutic target. *Pharmacology & Therapeutics* 116:428–436. doi: 10.1016/j.pharmthera.2007.08.001
- Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, et al (2003) The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *JAMA* 289:2560–2572. doi: 10.1001/jama.289.19.2560
- Chouchani ET, Methner C, Nadtochiy SM, et al (2013) Cardioprotection by S-nitrosation of a cysteine switch on mitochondrial complex I. *Nat Med* 19:753–759. doi: 10.1038/nm.3212
- Chow W-S, Cheung BMY, Tso AWK, et al (2007) Hypoadiponectinemia as a predictor for the development of hypertension: a 5-year prospective study. *Hypertension* 49:1455–1461. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.086835
- Christiansen T, Paulsen SK, Bruun JM, et al (2010) Exercise training versus diet-induced

- weight-loss on metabolic risk factors and inflammatory markers in obese subjects: a 12-week randomized intervention study. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 298:E824–E831. doi: 10.1152/ajpendo.00574.2009
- Christ-Roberts CY, Pratipanawatr T, Pratipanawatr W, et al (2004) Exercise training increases glycogen synthase activity and GLUT4 expression but not insulin signaling in overweight nondiabetic and type 2 diabetic subjects. *Metab Clin Exp* 53:1233–1242.
- Chughtai HL, Morgan TM, Rocco M, et al (2010) Renal sinus fat and poor blood pressure control in middle-aged and elderly individuals at risk for cardiovascular events. *Hypertension* 56:901–906. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.157370
- Clementi E, Nisoli E (2005) Nitric oxide and mitochondrial biogenesis: a key to long-term regulation of cellular metabolism. *Comp Biochem Physiol, Part A Mol Integr Physiol* 142:102–110. doi: 10.1016/j.cbpb.2005.04.022
- Cornelissen VA, Fagard RH (2005) Effect of resistance training on resting blood pressure: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Hypertens* 23:251–259.
- Cornwell TL, Pryzwansky KB, Wyatt TA, Lincoln TM (1991) Regulation of sarcoplasmic reticulum protein phosphorylation by localized cyclic GMP-dependent protein kinase in vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol* 40:923–931.
- Corson MA, James NL, Latta SE, et al (1996) Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress. *Circ Res* 79:984–991.
- Crabtree MJ, Channon KM (2011) Synthesis and recycling of tetrahydrobiopterin in endothelial function and vascular disease. *Nitric Oxide* 25:81–88. doi: 10.1016/j.niox.2011.04.004
- Crabtree MJ, Smith CL, Lam G, et al (2008) Ratio of 5,6,7,8-tetrahydrobiopterin to 7,8-dihydrobiopterin in endothelial cells determines glucose-elicited changes in NO vs. superoxide production by eNOS. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294:H1530–1540. doi: 10.1152/ajpheart.00823.2007



- da Silva CA, Ribeiro JP, Canto JCAU, et al (2012) High-intensity aerobic training improves endothelium-dependent vasodilation in patients with metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 95:237–245. doi: 10.1016/j.diabres.2011.09.034
- Davis ME, Cai H, Drummond GR, Harrison DG (2001) Shear stress regulates endothelial nitric oxide synthase expression through c-Src by divergent signaling pathways. *Circ Res* 89:1073–1080.
- Davis ME, Cai H, McCann L, et al (2003) Role of c-Src in regulation of endothelial nitric oxide synthase expression during exercise training. *American Journal of Physiology -*

- Heart and Circulatory Physiology 284:H1449–H1453. doi: 10.1152/ajpheart.00918.2002
- Dawson J, Walters M (2006) Uric acid and xanthine oxidase: future therapeutic targets in the prevention of cardiovascular disease? *Br J Clin Pharmacol* 62:633–644.
- De Glisezinski I, Crampes F, Harant I, et al (1998) Endurance training changes in lipolytic responsiveness of obese adipose tissue. *Am J Physiol* 275:E951–956.
- Deedwania PC, Gupta R (2006) Management issues in the metabolic syndrome. *J Assoc Physicians India* 54:797–810.
- Demircan S, Yazici M, Diraman E, et al (2008) The effect of glucose-insulin-potassium treatment on myocardial oxidative stress in patients with acute coronary syndromes undergoing percutaneous coronary intervention. *Coron Artery Dis* 19:99–104. doi: 10.1097/MCA.0b013e3282f27c34
- Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, et al (1999) Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 399:601–605. doi: 10.1038/21224
- Dora KA, Doyle MP, Duling BR (1997) Elevation of intracellular calcium in smooth muscle causes endothelial cell generation of NO in arterioles. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:6529–6534.
- Dreifalder M, Souza D, Bodin L, et al (2013) The Vasa Vasorum and Associated Endothelial Nitric Oxide Synthase is More Important for Saphenous Vein Than Arterial Bypass Grafts. *ANGIOLOGY* 64:293–299. doi: 10.1177/0003319712443729
- Drexler H, Lu W (1992) Endothelial dysfunction of hindquarter resistance vessels in experimental heart failure. *Am J Physiol* 262:H1640–1645.
- Drummond GR, Cai H, Davis ME, et al (2000) Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by hydrogen peroxide. *Circ Res* 86:347–354.
- Dubrovskaya G, Verlohren S, Luft FC, Gollasch M (2004) Mechanisms of ADRF release from rat aortic adventitial adipose tissue. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286:H1107–1113. doi: 10.1152/ajpheart.00656.2003
- Duerrschmidt N, Stielow C, Müller G, et al (2006) NO-mediated regulation of NAD(P)H oxidase by laminar shear stress in human endothelial cells. *J Physiol (Lond)* 576:557–567. doi: 10.1113/jphysiol.2006.111070



- Elizalde M, Rydén M, van Harmelen V, et al (2000) Expression of nitric oxide synthases in subcutaneous adipose tissue of nonobese and obese humans. *J Lipid Res* 41:1244–1251.

- Enerbäck S (2009) The origins of brown adipose tissue. *N Engl J Med* 360:2021–2023. doi: 10.1056/NEJMcibr0809610
- Ervin RB (2009) Prevalence of metabolic syndrome among adults 20 years of age and over, by sex, age, race and ethnicity, and body mass index: United States, 2003–2006. *Natl Health Stat Report* 1–7.
- Esler M, Lambert E, Schlaich M (2010) Point: Chronic activation of the sympathetic nervous system is the dominant contributor to systemic hypertension. *J Appl Physiol* 109:1996–1998; discussion 2016. doi: 10.1152/japplphysiol.00182.2010
- 
- Fagherazzi G, Vilier A, Saes Sartorelli D, et al (2013) Consumption of artificially and sugar-sweetened beverages and incident type 2 diabetes in the Etude Epidemiologique auprès des femmes de la Mutuelle Générale de l'Éducation Nationale-Européenne Prospective Investigation into Cancer and Nutrition cohort. *Am J Clin Nutr* 97:517–523. doi: 10.3945/ajcn.112.050997
- Farah C, Kleindienst A, Bolea G, et al (2013) Exercise-induced cardioprotection: a role for eNOS uncoupling and NO metabolites. *Basic Res Cardiol* 108:389. doi: 10.1007/s00395-013-0389-2
- Fehm HL, Kern W, Peters A (2006) The selfish brain: competition for energy resources. *Prog Brain Res* 153:129–140. doi: 10.1016/S0079-6123(06)53007-9
- Feldman BJ, Streeper RS, Farese RV, Yamamoto KR (2006) Myostatin modulates adipogenesis to generate adipocytes with favorable metabolic effects. *PNAS* 103:15675–15680. doi: 10.1073/pnas.0607501103
- Félétou M, Vanhoutte PM (2006) Endothelium-derived hyperpolarizing factor: where are we now? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:1215–1225. doi: 10.1161/01.ATV.0000217611.81085.c5
- Felix JVC, Michelini LC (2007) Training-induced pressure fall in spontaneously hypertensive rats is associated with reduced angiotensinogen mRNA expression within the nucleus tractus solitarii. *Hypertension* 50:780–785. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.094474
- Ferrannini E (2005) Insulin and blood pressure: connected on a circumference? *Hypertension* 45:347–348. doi: 10.1161/01.HYP.0000155464.44905.6c
- Ferrannini E, Natali A, Capaldo B, et al (1997) Insulin resistance, hyperinsulinemia, and blood pressure: role of age and obesity. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). *Hypertension* 30:1144–1149.
- Fésüs G, Dubrovskaya G, Gorzelniak K, et al (2007) Adiponectin is a novel humoral vasodilator. *Cardiovascular Research* 75:719–727. doi:

10.1016/j.cardiores.2007.05.025

- Feyter HMD, Praet SF, Broek NM van den, et al (2007) Exercise Training Improves Glycemic Control in Long-Standing Insulin-Treated Type 2 Diabetic Patients. *Diabetes Care* 30:2511–2513. doi: 10.2337/dc07-0183
- Fitzgibbons TP, Czech MP (2014) Epicardial and perivascular adipose tissues and their influence on cardiovascular disease: basic mechanisms and clinical associations. *J Am Heart Assoc* 3:e000582. doi: 10.1161/JAHA.113.000582
- Fitzgibbons TP, Kogan S, Aouadi M, et al (2011) Similarity of mouse perivascular and brown adipose tissues and their resistance to diet-induced inflammation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 301:H1425–1437. doi: 10.1152/ajpheart.00376.2011
- Flammer AJ, Anderson T, Celermajer DS, et al (2012) The Assessment of Endothelial Function. *Circulation* 126:753–767. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.093245
- Fleming I (2009) Molecular mechanisms underlying the activation of eNOS. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 459:793–806. doi: 10.1007/s00424-009-0767-7
- Floras JS, Ponikowski P (2015) The sympathetic/parasympathetic imbalance in heart failure with reduced ejection fraction. *Eur Heart J* 36:1974–1982b. doi: 10.1093/eurheartj/ehv087
- Fornoni A, Raij L (2005) Metabolic syndrome and endothelial dysfunction. *Curr Hypertens Rep* 7:88–95.
- Förstermann U, Münzel T (2006) Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation* 113:1708–1714. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.602532
- Förstermann U, Sessa WC (2012) Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J* 33:829–837, 837a–837d. doi: 10.1093/eurheartj/ehr304
- Frisbee JC (2006) Impaired hemorrhage tolerance in the obese Zucker rat model of metabolic syndrome. *J Appl Physiol* 100:465–473. doi: 10.1152/japplphysiol.01062.2005
- Fu WJ, Haynes TE, Kohli R, et al (2005) Dietary L-arginine supplementation reduces fat mass in Zucker diabetic fatty rats. *J Nutr* 135:714–721.
- Fukai T, Siegfried MR, Ushio-Fukai M, et al (2000) Regulation of the vascular extracellular superoxide dismutase by nitric oxide and exercise training. *J Clin Invest* 105:1631–1639. doi: 10.1172/JCI9551
- Fukai T, Ushio-Fukai M (2011) Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases. *Antioxidants & Redox Signaling* 15:1583–1606. doi: 10.1089/ars.2011.3999
- Fulton D, Gratton J-P, McCabe TJ, et al (1999) Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* 399:597–601. doi: 10.1038/21218
- Furchgott RF, Zawadzki JV (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288:373–376.



- Gadegbeku CA, Dhandayuthapani A, Sadler ZE, Egan BM (2002) Raising lipids acutely reduces baroreflex sensitivity. *Am J Hypertens* 15:479–485.
- Gaede PH, Jepsen PV, Larsen JNB, et al (2003) [The Steno-2 study. Intensive multifactorial intervention reduces the occurrence of cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes]. *Ugeskr Laeg* 165:2658–2661.
- Gao Y-J, Lu C, Su L-Y, et al (2007) Modulation of vascular function by perivascular adipose tissue: the role of endothelium and hydrogen peroxide. *British Journal of Pharmacology* 151:323–331. doi: 10.1038/sj.bjp.0707228
- Gao Y-J, Takemori K, Su L-Y, et al (2006) Perivascular adipose tissue promotes vasoconstriction: the role of superoxide anion. *Cardiovascular Research* 71:363–373. doi: 10.1016/j.cardiores.2006.03.013
- Gaudiot N, Ribière C, Jaubert AM, Giudicelli Y (2000) Endogenous nitric oxide is implicated in the regulation of lipolysis through antioxidant-related effect. *Am J Physiol, Cell Physiol* 279:C1603-1610.
- Gehrmann J, Hammer PE, Maguire CT, et al (2000) Phenotypic screening for heart rate variability in the mouse. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279:H733-740.
- Ghosh AK, Vaughan DE (2012) PAI-1 in tissue fibrosis. *J Cell Physiol* 227:493–507. doi: 10.1002/jcp.22783
- Gil-Ortega M, Somoza B, Huang Y, et al (2015) Regional differences in perivascular adipose tissue impacting vascular homeostasis. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 26:367–375. doi: 10.1016/j.tem.2015.04.003
- Gil-Ortega M, Stucchi P, Guzmán-Ruiz R, et al (2010) Adaptative nitric oxide overproduction in perivascular adipose tissue during early diet-induced obesity. *Endocrinology* 151:3299–3306. doi: 10.1210/en.2009-1464
- Glisezinski I de, Moro C, Pillard F, et al (2003) Aerobic training improves exercise-induced lipolysis in SCAT and lipid utilization in overweight men. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 285:E984–E990. doi: 10.1152/ajpendo.00152.2003
- Golbidi S, Mesdaghinia A, Laher I (2012) Exercise in the Metabolic Syndrome. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2012:e349710. doi: 10.1155/2012/349710
- Goldhammer E, Ben-Sira D, Zaid G, et al (2007) Paraoxonase activity following exercise-based cardiac rehabilitation program. *J Cardiopulm Rehabil Prev* 27:151–154. doi: 10.1097/01.HCR.0000270691.09258.b1
- Goldstein DS, McCarty R, Polinsky RJ, Kopin IJ (1983) Relationship between plasma

- norepinephrine and sympathetic neural activity. *Hypertension* 5:552–559.
- Gollisch KSC, Brandauer J, Jessen N, et al (2009) Effects of exercise training on subcutaneous and visceral adipose tissue in normal- and high-fat diet-fed rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297:E495–504. doi: 10.1152/ajpendo.90424.2008
- Gow AJ, Stamler JS (1998) Reactions between nitric oxide and haemoglobin under physiological conditions. *Nature* 391:169–173. doi: 10.1038/34402
- Graham DA, Rush JWE (2004) Exercise training improves aortic endothelium-dependent vasorelaxation and determinants of nitric oxide bioavailability in spontaneously hypertensive rats. *J Appl Physiol* 96:2088–2096. doi: 10.1152/japplphysiol.01252.2003
- Grasser EK, Dulloo A, Montani J-P (2014a) Cardiovascular responses to the ingestion of sugary drinks using a randomised cross-over study design: Does glucose attenuate the blood pressure-elevating effect of fructose? *Br J Nutr* 112:183–192. doi: 10.1017/S0007114514000622
- Grasser EK, Yepuri G, Dulloo AG, Montani J-P (2014b) Cardio- and cerebrovascular responses to the energy drink Red Bull in young adults: a randomized cross-over study. *Eur J Nutr* 53:1561–1571. doi: 10.1007/s00394-014-0661-8
- Grassi G (2006) Sympathetic overdrive and cardiovascular risk in the metabolic syndrome. *Hypertens Res* 29:839–847. doi: 10.1291/hypres.29.839
- Grassi G, Seravalle G (2006) Autonomic imbalance and metabolic syndrome: unravelling interactions, mechanisms and outcomes. *J Hypertens* 24:47–49.
- Grassi G, Seravalle G, Cattaneo BM, et al (1995) Sympathetic Activation and Loss of Reflex Sympathetic Control in Mild Congestive Heart Failure. *Circulation* 92:3206–3211. doi: 10.1161/01.CIR.92.11.3206
- Grassi G, Seravalle G, Trevano FQ, et al (2007) Neurogenic abnormalities in masked hypertension. *Hypertension* 50:537–542. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.092528
- Green DJ, O'Driscoll G, Joyner MJ, Cable NT (2008) Exercise and cardiovascular risk reduction: Time to update the rationale for exercise? *Journal of Applied Physiology* 105:766–768. doi: 10.1152/japplphysiol.01028.2007
- Green DJ, Spence A, Halliwill JR, et al (2011) Exercise and vascular adaptation in asymptomatic humans. *Exp Physiol* 96:57–70. doi: 10.1113/expphysiol.2009.048694
- Greenstein AS, Khavandi K, Withers SB, et al (2009) Local Inflammation and Hypoxia Abolish the Protective Anticontractile Properties of Perivascular Fat in Obese Patients. *Circulation* 119:1661–1670. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.821181
- Grundey SM, Brewer HB, Cleeman JJ, et al (2004) Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation* 109:433–438. doi: 10.1161/01.CIR.0000111245.75752.C6

- Gu P, Xu A (2013) Interplay between adipose tissue and blood vessels in obesity and vascular dysfunction. *Rev Endocr Metab Disord* 14:49–58. doi: 10.1007/s11154-012-9230-8
- Gündüz F, Koçer G, Ulker S, et al (2011) Exercise training enhances flow-mediated dilation in spontaneously hypertensive rats. *Physiol Res* 60:589–597.
- Guzik TJ, Sadowski J, Guzik B, et al (2006) Coronary Artery Superoxide Production and Nox Isoform Expression in Human Coronary Artery Disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 26:333–339. doi: 10.1161/01.ATV.0000196651.64776.51



- Haack KKV, Zucker IH (2015) Central mechanisms for exercise training-induced reduction in sympatho-excitation in chronic heart failure. *Auton Neurosci* 188:44–50. doi: 10.1016/j.autneu.2014.10.015
- Haastrup AT, Stepniakowski KT, Goodfriend TL, Egan BM (1998) Intralipid enhances alpha1-adrenergic receptor mediated pressor sensitivity. *Hypertension* 32:693–698.
- Hadi HAR, Carr CS, Al Suwaidi J (2005) Endothelial dysfunction: cardiovascular risk factors, therapy, and outcome. *Vasc Health Risk Manag* 1:183–198.
- Hajer GR, Haeften TW van, Visseren FLJ (2008) Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *European Heart Journal* 29:2959–2971. doi: 10.1093/eurheartj/ehn387
- Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, et al (1995) Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 269:543–546.
- Hambrecht R, Adams V, Erbs S, 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. doi: 10.1161/01.CIR.0000074229.93804.5C
- Hamer M, Stamatakis E (2012) Low-Dose Physical Activity Attenuates Cardiovascular Disease Mortality in Men and Women With Clustered Metabolic Risk Factors. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes* 5:494–499. doi: 10.1161/CIRCOUTCOMES.112.965434
- Hamilton SJ, Watts GF (2013) Endothelial dysfunction in diabetes: pathogenesis, significance, and treatment. *Rev Diabet Stud* 10:133–156. doi: 10.1900/RDS.2013.10.133
- Harrison D, Griendling KK, Landmesser U, et al (2003) Role of oxidative stress in atherosclerosis. *Am J Cardiol* 91:7A–11A.
- Hattori Y, Suzuki M, Hattori S, Kasai K (2003) Globular adiponectin upregulates nitric oxide production in vascular endothelial cells. *Diabetologia* 46:1543–1549. doi: 10.1007/s00125-003-1224-3
- Haynes WG, Morgan DA, Walsh SA, et al (1997) Receptor-mediated regional sympathetic

- nerve activation by leptin. *J Clin Invest* 100:270–278.
- Haynes WG, Noon JP, Walker BR, Webb DJ (1993) Inhibition of nitric oxide synthesis increases blood pressure in healthy humans. *J Hypertens* 11:1375–1380.
- Heise T, Magnusson K, Heinemann L, Sawicki PT (1998) Insulin resistance and the effect of insulin on blood pressure in essential hypertension. *Hypertension* 32:243–248.
- Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K, et al (2001) Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation* 104:2673–2678.
- Henricson J, Tesselaar E, Persson K, et al (2007) Assessment of microvascular function by study of the dose-response effects of iontophoretically applied drugs (acetylcholine and sodium nitroprusside)--methods and comparison with in vitro studies. *Microvasc Res* 73:143–149. doi: 10.1016/j.mvr.2006.10.004
- Higashi Y, Noma K, Yoshizumi M, Kihara Y (2009) Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circ J* 73:411–418.
- Higashi Y, Sasaki S, Kurisu S, et al (1999a) Regular aerobic exercise augments endothelium-dependent vascular relaxation in normotensive as well as hypertensive subjects: role of endothelium-derived nitric oxide. *Circulation* 100:1194–1202.
- Higashi Y, Sasaki S, Sasaki N, et al (1999b) Daily aerobic exercise improves reactive hyperemia in patients with essential hypertension. *Hypertension* 33:591–597.
- Hink U, Tsilimingas N, Wendt M, Münzel T (2003) Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus: therapeutic implications. *Treat Endocrinol* 2:293–304.
- Hirata M, Suzuki M, Ishii R, et al (2011) Genetic Defect in Phospholipase C δ 1 Protects Mice From Obesity by Regulating Thermogenesis and Adipogenesis. *Diabetes* 60:1926–1937. doi: 10.2337/db10-1500
- Hogarth AJ, Mackintosh AF, Mary DASG (2006) The Sympathetic Drive After Acute Myocardial Infarction in Hypertensive Patients*. *Am J Hypertens* 19:1070–1076. doi: 10.1016/j.amjhyper.2006.03.015
- Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, et al (1995) Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 95:2409–2415. doi: 10.1172/JCI117936
- Hotamisligil GS, Budavari A, Murray D, Spiegelman BM (1994) Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity-diabetes. Central role of tumor necrosis factor- α . *J Clin Invest* 94:1543–1549.
- Hu FB, Malik VS (2010) Sugar-sweetened beverages and risk of obesity and type 2 diabetes: epidemiologic evidence. *Physiol Behav* 100:47–54. doi: 10.1016/j.physbeh.2010.01.036
- Huang C, Huang J, Tian Y, et al (2014) Sugar sweetened beverages consumption and risk of coronary heart disease: a meta-analysis of prospective studies. *Atherosclerosis*

234:11–16. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2014.01.037

Hug C, Wang J, Ahmad NS, et al (2004) T-cadherin is a receptor for hexameric and high-molecular-weight forms of Acrp30/adiponectin. PNAS 101:10308–10313. doi: 10.1073/pnas.0403382101

Huggett RJ, Burns J, Mackintosh AF, Mary DASG (2004) Sympathetic neural activation in nondiabetic metabolic syndrome and its further augmentation by hypertension. Hypertension 44:847–852. doi: 10.1161/01.HYP.0000147893.08533.d8

Hulver MW, Zheng D, Tanner CJ, et al (2002) Adiponectin is not altered with exercise training despite enhanced insulin action. Am J Physiol Endocrinol Metab 283:E861–865. doi: 10.1152/ajpendo.00150.2002



Iacobellis G, Ribaudo MC, Leto G, et al (2002) Influence of excess fat on cardiac morphology and function: study in uncomplicated obesity. Obes Res 10:767–773. doi: 10.1038/oby.2002.104

Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, et al (1987) Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. Proc Natl Acad Sci USA 84:9265–9269.

Ignarro LJ, Cirino G, Casini A, Napoli C (1999) Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. J Cardiovasc Pharmacol 34:879–886.

IJzerman RG, de Jongh RT, Beijl M a. M, et al (2003) Individuals at increased coronary heart disease risk are characterized by an impaired microvascular function in skin. Eur J Clin Invest 33:536–542.

Ishibashi J, Seale P (2010) Medicine. Beige can be slimming. Science 328:1113–1114. doi: 10.1126/science.1190816

Ishii T, Yamakita T, Yamagami K, et al (2001) Effect of exercise training on serum leptin levels in type 2 diabetic patients. Metab Clin Exp 50:1136–1140. doi: 10.1053/meta.2001.26745



Jankovic A, Korac A, Buzadzic B, et al (2016) Targeting the NO/superoxide ratio in adipose tissue: relevance to obesity and diabetes management. British Journal of Pharmacology n/a-n/a. doi: 10.1111/bph.13498

Jerez S, Scacchi F, Sierra L, et al (2012) Vascular hyporeactivity to angiotensin II and noradrenaline in a rabbit model of obesity. J Cardiovasc Pharmacol 59:49–57. doi:

10.1097/FJC.0b013e318235156a

- Jin Z-G, Wong C, Wu J, Berk BC (2005) Flow shear stress stimulates Gab1 tyrosine phosphorylation to mediate protein kinase B and endothelial nitric-oxide synthase activation in endothelial cells. *J Biol Chem* 280:12305–12309. doi: 10.1074/jbc.M500294200
- Jobgen WS, Fried SK, Fu WJ, et al (2006) Regulatory role for the arginine–nitric oxide pathway in metabolism of energy substrates. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 17:571–588. doi: 10.1016/j.jnutbio.2005.12.001
- Jones CJ, DeFily DV, Patterson JL, Chilian WM (1993) Endothelium-dependent relaxation competes with alpha 1- and alpha 2-adrenergic constriction in the canine epicardial coronary microcirculation. *Circulation* 87:1264–1274.
- Joyner MJ, Green DJ (2009) Exercise protects the cardiovascular system: effects beyond traditional risk factors. *J Physiol (Lond)* 587:5551–5558. doi: 10.1113/jphysiol.2009.179432
- Joyner MJ, Nauss LA, Warner MA, Warner DO (1992) Sympathetic modulation of blood flow and O₂ uptake in rhythmically contracting human forearm muscles. *Am J Physiol* 263:H1078–1083.



- Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, et al (2006) Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest* 116:1784–1792. doi: 10.1172/JCI29126
- Kaur J (2014) A comprehensive review on metabolic syndrome. *Cardiol Res Pract* 2014:943162. doi: 10.1155/2014/943162
- Kelly DP, Scarpulla RC (2004) Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. *Genes Dev* 18:357–368. doi: 10.1101/gad.1177604
- Ketonen J, Shi J, Martonen E, Mervaala E (2010) Periadventitial adipose tissue promotes endothelial dysfunction via oxidative stress in diet-induced obese C57Bl/6 mice. *Circ J* 74:1479–1487.
- Khan BV, Harrison DG, Olbrych MT, et al (1996) Nitric oxide regulates vascular cell adhesion molecule 1 gene expression and redox-sensitive transcriptional events in human vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:9114–9119.
- Kishi T (2012) Heart failure as an autonomic nervous system dysfunction. *J Cardiol* 59:117–122. doi: 10.1016/j.jjcc.2011.12.006
- Kobayashi S, Maesato K, Moriya H, et al (2005) Insulin resistance in patients with chronic kidney disease. *American Journal of Kidney Diseases* 45:275–280. doi: 10.1053/j.ajkd.2004.09.034

- Kobzik L, Reid MB, Bredt DS, Stamler JS (1994) Nitric oxide in skeletal muscle. *Nature* 372:546–548. doi: 10.1038/372546a0
- Koppenol WH (1998) The basic chemistry of nitrogen monoxide and peroxynitrite. *Free Radic Biol Med* 25:385–391.
- Kosteli A, Sugaru E, Haemmerle G, et al (2010) Weight loss and lipolysis promote a dynamic immune response in murine adipose tissue. *J Clin Invest* 120:3466–3479. doi: 10.1172/JCI42845
- Kumagai K, Reid IA (1994) Angiotensin II exerts differential actions on renal nerve activity and heart rate. *Hypertension* 24:451–456.
- Kunsch C, Medford RM (1999) Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature. *Circ Res* 85:753–766.



- Lafontan M, Berlan M (2003) Do regional differences in adipocyte biology provide new pathophysiological insights? *Trends in Pharmacological Sciences* 24:276–283. doi: 10.1016/S0165-6147(03)00132-9
- Lafontan M, Langin D (2009) Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. *Progress in Lipid Research* 48:275–297. doi: 10.1016/j.plipres.2009.05.001
- Lambert GW, Straznicki NE, Lambert EA, et al (2010) Sympathetic nervous activation in obesity and the metabolic syndrome--causes, consequences and therapeutic implications. *Pharmacol Ther* 126:159–172. doi: 10.1016/j.pharmthera.2010.02.002
- Lamboleay M, Pittet P, Koenigsberger M, et al (2005) Evidence for signaling via gap junctions from smooth muscle to endothelial cells in rat mesenteric arteries: possible implication of a second messenger. *Cell Calcium* 37:311–320. doi: 10.1016/j.ceca.2004.11.004
- Lancet Diabetes Endocrinology (2015) Sugar intake: lowering the bar. *Lancet Diabetes Endocrinol* 3:305. doi: 10.1016/S2213-8587(15)00102-3
- Landmesser U, Spiekermann S, Preuss C, et al (2007) Angiotensin II induces endothelial xanthine oxidase activation: role for endothelial dysfunction in patients with coronary disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:943–948. doi: 10.1161/01.ATV.0000258415.32883.bf
- Lastra G, Manrique C, Sowers JR (2006) Obesity, Cardiometabolic Syndrome, and Chronic Kidney Disease: The Weight of the Evidence. *Advances in Chronic Kidney Disease* 13:365–373. doi: 10.1053/j.ackd.2006.07.011
- Lauer N, Suvorava T, Rüther U, et al (2005) Critical involvement of hydrogen peroxide in exercise-induced up-regulation of endothelial NO synthase. *Cardiovascular Research* 65:254–262. doi: 10.1016/j.cardiores.2004.09.010
- Lavrencic A, Salobir BG, Keber I (2000) Physical training improves flow-mediated dilation

- in patients with the polymetabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:551–555.
- Lee KY, Yamamoto Y, Boucher J, et al (2013) Shox2 is a molecular determinant of depot-specific adipocyte function. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:11409–11414. doi: 10.1073/pnas.1310331110
- Lee MH-H, Chen S-J, Tsao C-M, Wu C-C (2014) Perivascular Adipose Tissue Inhibits Endothelial Function of Rat Aortas via Caveolin-1. *PLOS ONE* 9:e99947. doi: 10.1371/journal.pone.0099947
- Lee Y-C, Chang H-H, Chiang C-L, et al (2011) Role of Perivascular Adipose Tissue-Derived Methyl Palmitate in Vascular Tone Regulation and Pathogenesis of Hypertension Clinical Perspective. *Circulation* 124:1160–1171. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.027375
- Lehman SJ, Massaro JM, Schlett CL, et al (2010) Peri-aortic fat, cardiovascular disease risk factors, and aortic calcification: the Framingham Heart Study. *Atherosclerosis* 210:656–661. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2010.01.007
- Li C, Wang Z, Wang C, et al (2015) Perivascular Adipose Tissue-Derived Adiponectin Inhibits Collar-Induced Carotid Atherosclerosis by Promoting Macrophage Autophagy. *PLOS ONE* 10:e0124031. doi: 10.1371/journal.pone.0124031
- Li FYL, Cheng KKY, Lam KSL, et al (2011) Cross-talk between adipose tissue and vasculature: role of adiponectin. *Acta Physiol (Oxf)* 203:167–180. doi: 10.1111/j.1748-1716.2010.02216.x
- Li H, Jamal J, Plaza C, et al (2014) Structures of human constitutive nitric oxide synthases. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 70:2667–2674. doi: 10.1107/S1399004714017064
- Li P-L, Zhang Y (2013) Cross talk between ceramide and redox signaling: implications for endothelial dysfunction and renal disease. *Handb Exp Pharmacol* 171–197. doi: 10.1007/978-3-7091-1511-4_9
- Li Y, Huang TT, Carlson EJ, et al (1995) Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat Genet* 11:376–381. doi: 10.1038/ng1295-376
- Li Y-L, Ding Y, Agnew C, Schultz HD (2008) Exercise training improves peripheral chemoreflex function in heart failure rabbits. *Journal of Applied Physiology* 105:782–790. doi: 10.1152/jappphysiol.90533.2008
- Libby P, DiCarli M, Weissleder R (2010a) The vascular biology of atherosclerosis and imaging targets. *J Nucl Med* 51 Suppl 1:33S–37S. doi: 10.2967/jnumed.109.069633
- Libby P, Okamoto Y, Rocha VZ, Folco E (2010b) Inflammation in atherosclerosis: transition from theory to practice. *Circ J* 74:213–220.
- Liggett SB, Cresci S, Kelly RJ, et al (2008) A GRK5 polymorphism that inhibits beta-adrenergic receptor signaling is protective in heart failure. *Nat Med* 14:510–517. doi: 10.1038/nm1750

- Lira FS, Rosa JC, Yamashita AS, et al (2009) Endurance training induces depot-specific changes in IL-10/TNF- α ratio in rat adipose tissue. *Cytokine* 45:80–85. doi: 10.1016/j.cyto.2008.10.018
- Liu R, Li B, Flanagan SW, et al (2002) Increased mitochondrial antioxidative activity or decreased oxygen free radical propagation prevent mutant SOD1-mediated motor neuron cell death and increase amyotrophic lateral sclerosis-like transgenic mouse survival. *J Neurochem* 80:488–500.
- Loader J, Montero D, Lorenzen C, et al (2015) Acute Hyperglycemia Impairs Vascular Function in Healthy and Cardiometabolic Diseased Subjects: Systematic Review and Meta-Analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 35:2060–2072. doi: 10.1161/ATVBAHA.115.305530
- Löhn M, Dubrovskaya G, Lauterbach B, et al (2002) Periadventitial fat releases a vascular relaxing factor. *FASEB J* 16:1057–1063. doi: 10.1096/fj.02-0024com
- Lönnqvist F, Arner P, Nordfors L, Schalling M (1995) Overexpression of the obese (ob) gene in adipose tissue of human obese subjects. *Nat Med* 1:950–953.
- Loschen G, Azzi A (1975) On the formation of hydrogen peroxide and oxygen radicals in heart mitochondria. *Recent Adv Stud Cardiac Struct Metab* 7:3–12.
- Lozano I, Van der Werf R, Bietiger W, et al (2016) High-fructose and high-fat diet-induced disorders in rats: impact on diabetes risk, hepatic and vascular complications. *Nutr Metab (Lond)* 13:15. doi: 10.1186/s12986-016-0074-1
- Lu C, Zhao AX, Gao Y-J, Lee RMKW (2011) Modulation of vein function by perivascular adipose tissue. *European Journal of Pharmacology* 657:111–116. doi: 10.1016/j.ejphar.2010.12.028
- Lubos E, Loscalzo J, Handy DE (2010) Glutathione Peroxidase-1 in Health and Disease: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. *Antioxidants & Redox Signaling* 15:1957–1997. doi: 10.1089/ars.2010.3586
- Luquet S, Gaudel C, Holst D, et al (2005) Roles of PPAR delta in lipid absorption and metabolism: a new target for the treatment of type 2 diabetes. *Biochim Biophys Acta* 1740:313–317. doi: 10.1016/j.bbadis.2004.11.011



- Ma L, Ma S, He H, et al (2010) Perivascular fat-mediated vascular dysfunction and remodeling through the AMPK/mTOR pathway in high-fat diet-induced obese rats. *Hypertens Res* 33:446–453. doi: 10.1038/hr.2010.11
- Maeda N, Takahashi M, Funahashi T, et al (2001) PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes* 50:2094–2099.

- Maenhaut N, Boydens C, Van de Voorde J (2010) Hypoxia enhances the relaxing influence of perivascular adipose tissue in isolated mice aorta. *Eur J Pharmacol* 641:207–212. doi: 10.1016/j.ejphar.2010.05.058
- Mah E, Bruno RS (2012) Postprandial hyperglycemia on vascular endothelial function: mechanisms and consequences. *Nutr Res* 32:727–740. doi: 10.1016/j.nutres.2012.08.002
- Mah E, Noh SK, Ballard KD, et al (2011) Postprandial hyperglycemia impairs vascular endothelial function in healthy men by inducing lipid peroxidation and increasing asymmetric dimethylarginine:arginine. *J Nutr* 141:1961–1968. doi: 10.3945/jn.111.144592
- Maiorana A, O'Driscoll G, Taylor R, Green D (2003) Exercise and the nitric oxide vasodilator system. *Sports Med* 33:1013–1035.
- Malik VS, Popkin BM, Bray GA, et al (2010) Sugar-sweetened beverages and risk of metabolic syndrome and type 2 diabetes: a meta-analysis. *Diabetes Care* 33:2477–2483. doi: 10.2337/dc10-1079
- Malliani A (1999) The Pattern of Sympathovagal Balance Explored in the Frequency Domain. *News Physiol Sci* 14:111–117.
- Mancia G, Bousquet P, Elghozi JL, et al (2007) The sympathetic nervous system and the metabolic syndrome. *J Hypertens* 25:909–920. doi: 10.1097/HJH.0b013e328048d004
- Marcell TJ, McAuley KA, Traustadóttir T, Reaven PD (2005) Exercise training is not associated with improved levels of C-reactive protein or adiponectin. *Metab Clin Exp* 54:533–541. doi: 10.1016/j.metabol.2004.11.008
- Marchesi C, Ebrahimian T, Angulo O, et al (2009) Endothelial Nitric Oxide Synthase Uncoupling and Perivascular Adipose Oxidative Stress and Inflammation Contribute to Vascular Dysfunction in a Rodent Model of Metabolic Syndrome. *Hypertension* 54:1384–1392. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.138305
- Martínez-Ruiz A, Villanueva L, Orduña CG de, et al (2005) S-nitrosylation of Hsp90 promotes the inhibition of its ATPase and endothelial nitric oxide synthase regulatory activities. *PNAS* 102:8525–8530. doi: 10.1073/pnas.0407294102
- Mauriège P, Després JP, Prud'homme D, et al (1991) Regional variation in adipose tissue lipolysis in lean and obese men. *J Lipid Res* 32:1625–1633.
- Mauro CR, Ilonzo G, Nguyen BT, et al (2013) Attenuated adiposopathy in perivascular adipose tissue compared with subcutaneous human adipose tissue. *The American Journal of Surgery* 206:241–244. doi: 10.1016/j.amjsurg.2012.07.032
- Mehebi N, Jaubert A-M, Sabourault D, et al (2005) Leptin-induced nitric oxide production in white adipocytes is mediated through PKA and MAP kinase activation. *Am J Physiol, Cell Physiol* 289:C379–387. doi: 10.1152/ajpcell.00320.2004
- Meijer RI, Bakker W, Alta C-LAF, et al (2013) Perivascular Adipose Tissue Control of Insulin-Induced Vasoreactivity in Muscle Is Impaired in db/db Mice. *Diabetes*

- 62:590–598. doi: 10.2337/db11-1603
- Melikian N, Seddon MD, Casadei B, et al (2009) Neuronal Nitric Oxide Synthase and Human Vascular Regulation. *Trends in Cardiovascular Medicine* 19:256–262. doi: 10.1016/j.tcm.2010.02.007
- Melikian N, Wheatcroft SB, Ogah OS, et al (2007) Asymmetric dimethylarginine and reduced nitric oxide bioavailability in young Black African men. *Hypertension* 49:873–877. doi: 10.1161/01.HYP.0000258405.25330.80
- Mimura J, Yuasa F, Yuyama R, et al (2005) The effect of residential exercise training on baroreflex control of heart rate and sympathetic nerve activity in patients with acute myocardial infarction*. *Chest* 127:1108–1115. doi: 10.1378/chest.127.4.1108
- Minato K, Shiroya Y, Nakae Y, Kondo T The effect of chronic exercise on the rat pancreas. *International Journal of Pancreatology* 27:151–156. doi: 10.1385/IJGC:27:2:151
- Mitchell GF, Parise H, Vita JA, et al (2004) Local shear stress and brachial artery flow-mediated dilation: the Framingham Heart Study. *Hypertension* 44:134–139. doi: 10.1161/01.HYP.0000137305.77635.68
- Miyazaki H, Oh-ishi S, Ookawara T, et al Strenuous endurance training in humans reduces oxidative stress following exhausting exercise. *Eur J Appl Physiol* 84:1–6. doi: 10.1007/s004210000342
- Monnier L, Mas E, Ginet C, et al (2006) Activation of oxidative stress by acute glucose fluctuations compared with sustained chronic hyperglycemia in patients with type 2 diabetes. *JAMA* 295:1681–1687. doi: 10.1001/jama.295.14.1681
- Mora S, Cook N, Buring JE, et al (2007) Physical activity and reduced risk of cardiovascular events: potential mediating mechanisms. *Circulation* 116:2110–2118. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.729939
- Moro MA, Russel RJ, Celtek S, et al (1996) cGMP mediates the vascular and platelet actions of nitric oxide: confirmation using an inhibitor of the soluble guanylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:1480–1485.
- Morris DL, Rui L (2009) Recent advances in understanding leptin signaling and leptin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297:E1247-1259. doi: 10.1152/ajpendo.00274.2009
- Motoshima H, Wu X, Mahadev K, Goldstein BJ (2004) Adiponectin suppresses proliferation and superoxide generation and enhances eNOS activity in endothelial cells treated with oxidized LDL. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 315:264–271. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.01.049
- Mourier A, Gautier JF, De Kerviler E, et al (1997) Mobilization of visceral adipose tissue related to the improvement in insulin sensitivity in response to physical training in NIDDM. Effects of branched-chain amino acid supplements. *Diabetes Care* 20:385–391.
- Muniyappa R, Sowers JR (2013) Role of insulin resistance in endothelial dysfunction. *Rev*

Endocr Metab Disord 14:5–12. doi: 10.1007/s11154-012-9229-1

- Murray CI, Gebbska MA, Haile A, et al (2008) Abstract 3379: cGMP Specific Phosphodiesterase Type 5A Activity is Regulated by S-nitrosylation at Cys 181. Circulation 118:S_415-S_415.
- Myers J, Hadley D, Oswald U, et al (2007) Effects of exercise training on heart rate recovery in patients with chronic heart failure. Am Heart J 153:1056–1063. doi: 10.1016/j.ahj.2007.02.038
- W*
- Nara M, Kanda T, Tsukui S, et al (1999) Running exercise increases tumor necrosis factor- α secreting from mesenteric fat in insulin-resistant rats. Life Sciences 65:237–244. doi: 10.1016/S0024-3205(99)00242-8
- Nassis GP, Papantakou K, Skenderi K, et al (2005) Aerobic exercise training improves insulin sensitivity without changes in body weight, body fat, adiponectin, and inflammatory markers in overweight and obese girls. Metab Clin Exp 54:1472–1479. doi: 10.1016/j.metabol.2005.05.013
- Navarro A, Gomez C, López-Cepero JM, Boveris A (2004) Beneficial effects of moderate exercise on mice aging: survival, behavior, oxidative stress, and mitochondrial electron transfer. American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology 286:R505–R511. doi: 10.1152/ajpregu.00208.2003
- Nedergaard J, Cannon B (2014) The Browning of White Adipose Tissue: Some Burning Issues. Cell Metab 20:396–407. doi: 10.1016/j.cmet.2014.07.005
- Nguyen Dinh Cat A, Montezano AC, Burger D, Touyz RM (2012) Angiotensin II, NADPH Oxidase, and Redox Signaling in the Vasculature. Antioxidants & Redox Signaling 19:1110–1120. doi: 10.1089/ars.2012.4641
- Nicklas BJ, Rogus EM, Goldberg AP (1997) Exercise blunts declines in lipolysis and fat oxidation after dietary-induced weight loss in obese older women. Am J Physiol 273:E149-155.
- Nilsson GE, Tenland T, Oberg PA (1980) Evaluation of a laser Doppler flowmeter for measurement of tissue blood flow. IEEE Trans Biomed Eng 27:597–604. doi: 10.1109/TBME.1980.326582
- Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, et al (2000) Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. Nature 404:787–790. doi: 10.1038/35008121
- Nisoli E, Clementi E, Carruba MO, Moncada S (2007) Defective mitochondrial biogenesis: a hallmark of the high cardiovascular risk in the metabolic syndrome? Circ Res 100:795–806. doi: 10.1161/01.RES.0000259591.97107.6c

- Niu XF, Smith CW, Kubes P (1994) Intracellular oxidative stress induced by nitric oxide synthesis inhibition increases endothelial cell adhesion to neutrophils. *Circ Res* 74:1133–1140.
- Noguchi K, Matsuzaki T, Sakanashi M, et al (2015) Effect of caffeine contained in a cup of coffee on microvascular function in healthy subjects. *J Pharmacol Sci* 127:217–222. doi: 10.1016/j.jphs.2015.01.003
- Nojiri H, Shimizu T, Funakoshi M, et al (2006) Oxidative stress causes heart failure with impaired mitochondrial respiration. *J Biol Chem* 281:33789–33801. doi: 10.1074/jbc.M602118200
- Nonogaki K (2000) New insights into sympathetic regulation of glucose and fat metabolism. *Diabetologia* 43:533–549. doi: 10.1007/s001250051341
- Notarius CF, Millar PJ, Floras JS (2015) Muscle sympathetic activity in resting and exercising humans with and without heart failure. *Appl Physiol Nutr Metab* 40:1107–1115. doi: 10.1139/apnm-2015-0289
- Nour-Eldine W, Ghantous CM, Zibara K, et al (2016) Adiponectin Attenuates Angiotensin II-Induced Vascular Smooth Muscle Cell Remodeling through Nitric Oxide and the RhoA/ROCK Pathway. *Front Pharmacol* 7:86. doi: 10.3389/fphar.2016.00086



- Oates PJ (2002) Polyol pathway and diabetic peripheral neuropathy. *Int Rev Neurobiol* 50:325–392.
- O'Connor L, Imamura F, Lentjes MAH, et al (2015) Prospective associations and population impact of sweet beverage intake and type 2 diabetes, and effects of substitutions with alternative beverages. *Diabetologia* 58:1474–1483. doi: 10.1007/s00125-015-3572-1
- O'Neill S, O'Driscoll L (2015) Metabolic syndrome: a closer look at the growing epidemic and its associated pathologies. *Obes Rev* 16:1–12. doi: 10.1111/obr.12229
- Oswal A, Yeo G (2010) Leptin and the Control of Body Weight: A Review of Its Diverse Central Targets, Signaling Mechanisms, and Role in the Pathogenesis of Obesity. *Obesity* 18:221–229. doi: 10.1038/oby.2009.228
- Ouchi N, Ohishi M, Kihara S, et al (2003) Association of hypoadiponectinemia with impaired vasoreactivity. *Hypertension* 42:231–234. doi: 10.1161/01.HYP.0000083488.67550.B8
- Ouedraogo R, Wu X, Xu S-Q, et al (2006) Adiponectin suppression of high-glucose-induced reactive oxygen species in vascular endothelial cells: evidence for involvement of a cAMP signaling pathway. *Diabetes* 55:1840–1846. doi: 10.2337/db05-1174
- Owen MK, Witzmann FA, McKenney ML, et al (2013) Perivascular adipose tissue potentiates contraction of coronary vascular smooth muscle: influence of obesity.

Circulation 128:9–18. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.001238

Ozkor MA, Rahman AM, Murrow JR, et al (2014) Differences in vascular nitric oxide and endothelium-derived hyperpolarizing factor bioavailability in blacks and whites. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34:1320–1327. doi: 10.1161/ATVBAHA.113.303136

Oztasan N, Taysi S, Gumustekin K, et al (2004) Endurance training attenuates exercise-induced oxidative stress in erythrocytes in rat. *Eur J Appl Physiol* 91:622–627. doi: 10.1007/s00421-003-1029-6



Padilla J, Jenkins NT, Vieira-Potter VJ, Laughlin MH (2013) Divergent phenotype of rat thoracic and abdominal perivascular adipose tissues. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 304:R543–R552. doi: 10.1152/ajpregu.00567.2012

Palm F, Onozato ML, Luo Z, Wilcox CS (2007) Dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH): expression, regulation, and function in the cardiovascular and renal systems. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 293:H3227–H3245. doi: 10.1152/ajpheart.00998.2007

Panza JA, Epstein SE, Quyyumi AA (1991) Circadian variation in vascular tone and its relation to alpha-sympathetic vasoconstrictor activity. *N Engl J Med* 325:986–990. doi: 10.1056/NEJM199110033251402

Paolisso G, Manzella D, Rizzo MR, et al (2000) Elevated plasma fatty acid concentrations stimulate the cardiac autonomic nervous system in healthy subjects. *Am J Clin Nutr* 72:723–730.

Park J, Choi HJ, Lee S, et al (2000) Rac-related GTP-binding protein in elicitor-induced reactive oxygen generation by suspension-cultured soybean cells. *Plant Physiol* 124:725–732.

Patel KP, Zheng H (2012) Central neural control of sympathetic nerve activity in heart failure following exercise training. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 302:H527–537. doi: 10.1152/ajpheart.00676.2011

Pautz A, Art J, Hahn S, et al (2010) Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Nitric Oxide* 23:75–93. doi: 10.1016/j.niox.2010.04.007

Payne GA, Bohlen HG, Dincer UD, et al (2009) Periadventitial adipose tissue impairs coronary endothelial function via PKC-beta-dependent phosphorylation of nitric oxide synthase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297:H460–465. doi: 10.1152/ajpheart.00116.2009

Payne GA, Borbouse L, Kumar S, et al (2010) Epicardial Perivascular Adipose-Derived Leptin Exacerbates Coronary Endothelial Dysfunction in Metabolic Syndrome via a

- Protein Kinase C- β Pathway. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 30:1711–1717. doi: 10.1161/ATVBAHA.110.210070
- Pedersen BK, Saltin B (2006) Evidence for prescribing exercise as therapy in chronic disease. *Scand J Med Sci Sports* 16 Suppl 1:3–63. doi: 10.1111/j.1600-0838.2006.00520.x
- Pepino MY (2015) Metabolic effects of non-nutritive sweeteners. *Physiol Behav* 152:450–455. doi: 10.1016/j.physbeh.2015.06.024
- Pescatello LS, Franklin BA, Fagard R, et al (2004) American College of Sports Medicine position stand. Exercise and hypertension. *Med Sci Sports Exerc* 36:533–553.
- Petrovic N, Walden TB, Shabalina IG, et al (2010) Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *J Biol Chem* 285:7153–7164. doi: 10.1074/jbc.M109.053942
- Piazza M, Guillemette JG, Dieckmann T (2015) Dynamics of Nitric Oxide Synthase–Calmodulin Interactions at Physiological Calcium Concentrations. *Biochemistry* 54:1989–2000. doi: 10.1021/bi501353s
- Pierpont GL, Stolpman DR, Gornick CC (2000) Heart rate recovery post-exercise as an index of parasympathetic activity. *J Auton Nerv Syst* 80:169–174.
- Pilon G, Dallaire P, Marette A (2004) Inhibition of inducible nitric-oxide synthase by activators of AMP-activated protein kinase: a new mechanism of action of insulin-sensitizing drugs. *J Biol Chem* 279:20767–20774. doi: 10.1074/jbc.M401390200
- Polak J, Klimcakova E, Moro C, et al (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. *Metab Clin Exp* 55:1375–1381. doi: 10.1016/j.metabol.2006.06.008
- Police SB, Thatcher SE, Charnigo R, et al (2009) Obesity Promotes Inflammation in Periaortic Adipose Tissue and Angiotensin II-Induced Abdominal Aortic Aneurysm Formation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 29:1458–1464. doi: 10.1161/ATVBAHA.109.192658
- Potenza MA, Addabbo F, Montagnani M (2009a) Vascular actions of insulin with implications for endothelial dysfunction. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297:E568–577. doi: 10.1152/ajpendo.00297.2009
- Potenza MA, Addabbo F, Montagnani M (2009b) Vascular actions of insulin with implications for endothelial dysfunction. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 297:E568–E577. doi: 10.1152/ajpendo.00297.2009
- Procopio C, Andreozzi F, Laratta E, et al (2009) Leptin-Stimulated Endothelial Nitric-Oxide Synthase via an Adenosine 5'-Monophosphate-Activated Protein Kinase/Akt Signaling Pathway Is Attenuated by Interaction with C-Reactive Protein. *Endocrinology* 150:3584–3593. doi: 10.1210/en.2008-0921

Q

- Qi C, Pekala PH (2000) Tumor Necrosis Factor- α -Induced Insulin Resistance in Adipocytes. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 223:128–135. doi: 10.1111/j.1525-1373.2000.22318.x

R

- Radomski MW, Moncada S (1993) Regulation of vascular homeostasis by nitric oxide. *Thromb Haemost* 70:36–41.
- Ranallo RF, Rhodes EC (1998) Lipid metabolism during exercise. *Sports Med* 26:29–42.
- Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA (1963) The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* 1:785–789.
- Rao GH, Krishnamurthi S, Raj L, White JG (1990) Influence of nitric oxide on agonist-mediated calcium mobilization in platelets. *Biochem Med Metab Biol* 43:271–275.
- Ravi K, Brennan LA, Levic S, et al (2004) S-nitrosylation of endothelial nitric oxide synthase is associated with monomerization and decreased enzyme activity. *PNAS* 101:2619–2624. doi: 10.1073/pnas.0300464101
- Reaven GM (1988) Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 37:1595–1607.
- Rebolledo A, Rebolledo OR, Marra CA, et al (2010) Early alterations in vascular contractility associated to changes in fatty acid composition and oxidative stress markers in perivascular adipose tissue. *Cardiovascular Diabetology* 9:65. doi: 10.1186/1475-2840-9-65
- Reifenberger MS, Turk JR, Newcomer SC, et al (2007) Perivascular fat alters reactivity of coronary artery: effects of diet and exercise. *Med Sci Sports Exerc* 39:2125–2134. doi: 10.1249/mss.0b013e318156e9df
- Rengo G, Pagano G, Parisi V, et al (2014) Changes of plasma norepinephrine and serum N-terminal pro-brain natriuretic peptide after exercise training predict survival in patients with heart failure. *Int J Cardiol* 171:384–389. doi: 10.1016/j.ijcard.2013.12.024
- Reseland JE, Anderssen SA, Solvoll K, et al (2001) Effect of long-term changes in diet and

- exercise on plasma leptin concentrations. *Am J Clin Nutr* 73:240–245.
- Ribiere C, Jaubert AM, Gaudiot N, et al (1996) White adipose tissue nitric oxide synthase: a potential source for NO production. *Biochem Biophys Res Commun* 222:706–712. doi: 10.1006/bbrc.1996.0824
- Richterova B, Stich V, Moro C, et al (2004) Effect of endurance training on adrenergic control of lipolysis in adipose tissue of obese women. *J Clin Endocrinol Metab* 89:1325–1331. doi: 10.1210/jc.2003-031001
- Ristow M, Zarse K, Oberbach A, et al (2009) Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:8665–8670. doi: 10.1073/pnas.0903485106
- Rittig K, Staib K, Machann J, et al (2008) Perivascular fatty tissue at the brachial artery is linked to insulin resistance but not to local endothelial dysfunction. *Diabetologia* 51:2093–2099. doi: 10.1007/s00125-008-1128-3
- Roque FR, Hernanz R, Salaices M, Briones AM (2013) Exercise training and cardiometabolic diseases: focus on the vascular system. *Curr Hypertens Rep* 15:204–214. doi: 10.1007/s11906-013-0336-5
- Ross R (1999) Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J* 138:S419–420.
- Rossi M, Maurizio S, Carpi A (2005) Skin blood flow motion response to insulin iontophoresis in normal subjects. *Microvascular Research* 70:17–22. doi: 10.1016/j.mvr.2005.05.001
- Rothwell NJ, Stock MJ (1979) A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis. *Nature* 281:31–35.
- Roustit M, Blaise S, Millet C, Cracowski JL (2010) Reproducibility and methodological issues of skin post-occlusive and thermal hyperemia assessed by single-point laser Doppler flowmetry. *Microvasc Res* 79:102–108. doi: 10.1016/j.mvr.2010.01.001
- Roustit M, Cracowski J-L (2013) Assessment of endothelial and neurovascular function in human skin microcirculation. *Trends Pharmacol Sci* 34:373–384. doi: 10.1016/j.tips.2013.05.007
- Roy D, Perreault M, Marette A (1998) Insulin stimulation of glucose uptake in skeletal muscles and adipose tissues in vivo is NO dependent. *Am J Physiol* 274:E692–699.



- Sakurai T, Izawa T, Kizaki T, et al (2009) Exercise training decreases expression of inflammation-related adipokines through reduction of oxidative stress in rat white adipose tissue. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 379:605–609. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.12.127
- Sakurai T, Takei M, Ogasawara J, et al (2005) Exercise Training Enhances Tumor Necrosis

- Factor- α -Induced Expressions of Anti-Apoptotic Genes without Alterations in Caspase-3 Activity in Rat Epididymal Adipocytes. *The Japanese Journal of Physiology* 55:181–189. doi: 10.2170/jjphysiol.R2096
- Sander M, Chavoshan B, Victor RG (1999) A large blood pressure-raising effect of nitric oxide synthase inhibition in humans. *Hypertension* 33:937–942.
- Sato Y, Nagasaki M, Nakai N, Fushimi T (2003) Physical exercise improves glucose metabolism in lifestyle-related diseases. *Exp Biol Med* (Maywood) 228:1208–1212.
- Scherrer U, Sartori C (1997) Insulin as a vascular and sympathoexcitatory hormone: implications for blood pressure regulation, insulin sensitivity, and cardiovascular morbidity. *Circulation* 96:4104–4113.
- Schlaich MP, Lambert E, Kaye DM, et al (2004) Sympathetic augmentation in hypertension: role of nerve firing, norepinephrine reuptake, and Angiotensin neuromodulation. *Hypertension* 43:169–175. doi: 10.1161/01.HYP.0000103160.35395.9E
- Schlossmann J, Ammendola A, Ashman K, et al (2000) Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase I β . *Nature* 404:197–201. doi: 10.1038/35004606
- Schwartz RS, Shuman WP, Larson V, et al (1991) The effect of intensive endurance exercise training on body fat distribution in young and older men. *Metab Clin Exp* 40:545–551.
- Schwarz PM, Kleinert H, Förstermann U (1999) Potential functional significance of brain-type and muscle-type nitric oxide synthase I expressed in adventitia and media of rat aorta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:2584–2590.
- Sebai M, Lu S, Xiang L, Hester RL (2011) Improved functional vasodilation in obese Zucker rats following exercise training. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 301:H1090-1096. doi: 10.1152/ajpheart.00233.2011
- Seddon M, Melikian N, Dworakowski R, et al (2009) Effects of Neuronal Nitric Oxide Synthase on Human Coronary Artery Diameter and Blood Flow In Vivo. *Circulation* 119:2656–2662. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.822205
- Seddon MD, Chowienzyk PJ, Brett SE, et al (2008) Neuronal Nitric Oxide Synthase Regulates Basal Microvascular Tone in Humans In Vivo. *Circulation* 117:1991–1996. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.744540
- Segal SS (1992) Communication Among Endothelial and Smooth Muscle Cells Coordinates Blood Flow Control During Exercise. *Physiology* 7:152–156.
- Segal SS, Kurjiaka DT (1995) Coordination of blood flow control in the resistance vasculature of skeletal muscle. *Med Sci Sports Exerc* 27:1158–1164.
- Seligman BGS, Polanczyk CA, Santos ASB, et al (2011) Intensive practical lifestyle intervention improves endothelial function in metabolic syndrome independent of weight loss: a randomized controlled trial. *Metab Clin Exp* 60:1736–1740. doi: 10.1016/j.metabol.2011.05.006
- Serné EH, IJzerman RG, Gans ROB, et al (2002) Direct evidence for insulin-induced

- capillary recruitment in skin of healthy subjects during physiological hyperinsulinemia. *Diabetes* 51:1515–1522.
- Shima K, Zhu M, Noma Y, et al (1997) Exercise training in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rat, a model of spontaneous non-insulin-dependent diabetes mellitus: effects on the B-cell mass, insulin content and fibrosis in the pancreas. *Diabetes Res Clin Pract* 35:11–19.
- Shimabukuro M, Higa N, Asahi T, et al (2003) Hypoadiponectinemia is closely linked to endothelial dysfunction in man. *J Clin Endocrinol Metab* 88:3236–3240. doi: 10.1210/jc.2002-021883
- Shimomura I, Matsuda M, Hammer RE, et al (2000) Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice. *Mol Cell* 6:77–86.
- Shulman GI (2000) Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 106:171–176. doi: 10.1172/JCI10583
- Shyy JY-J, Chien S (2002) Role of integrins in endothelial mechanosensing of shear stress. *Circ Res* 91:769–775.
- Sigal RJ, Kenny GP, Wasserman DH, Castaneda-Sceppa C (2004) Physical activity/exercise and type 2 diabetes. *Diabetes Care* 27:2518–2539.
- Silva BR, Pernomian L, Grando MD, Bendhack LM (2014) Phenylephrine activates eNOS Ser 1177 phosphorylation and nitric oxide signaling in renal hypertensive rat aorta. *Eur J Pharmacol* 738:192–199. doi: 10.1016/j.ejphar.2014.05.040
- Simmerman HK, Jones LR (1998) Phospholamban: protein structure, mechanism of action, and role in cardiac function. *Physiol Rev* 78:921–947.
- Sindler AL, Delp MD, Reyes R, et al (2009) Effects of ageing and exercise training on eNOS uncoupling in skeletal muscle resistance arterioles. *J Physiol (Lond)* 587:3885–3897. doi: 10.1113/jphysiol.2009.172221
- Singh GM, Micha R, Khatibzadeh S, et al (2015) Estimated Global, Regional, and National Disease Burdens Related to Sugar-Sweetened Beverage Consumption in 2010. *Circulation* 132:639–666. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.114.010636
- Singh JP, Kandala J, Camm AJ (2014) Non-pharmacological modulation of the autonomic tone to treat heart failure. *Eur Heart J* 35:77–85. doi: 10.1093/eurheartj/eh436
- Skalicky J, Muzakova V, Kandar R, et al (2008) Evaluation of oxidative stress and inflammation in obese adults with metabolic syndrome. *Clin Chem Lab Med* 46:499–505. doi: 10.1515/CCLM.2008.096
- Skrapari I, Tentolouris N, Perrea D, et al (2007) Baroreflex sensitivity in obesity: relationship with cardiac autonomic nervous system activity. *Obesity (Silver Spring)* 15:1685–1693. doi: 10.1038/oby.2007.201
- Smith CJ, Sun D, Hoegler C, et al (1996) Reduced gene expression of vascular endothelial NO synthase and cyclooxygenase-1 in heart failure. *Circ Res* 78:58–64.

- Soltis EE, Cassis LA (1991) Influence of perivascular adipose tissue on rat aortic smooth muscle responsiveness. *Clin Exp Hypertens A* 13:277–296.
- Souza EG, De Lorenzo A, Huguenin G, et al (2014) Impairment of systemic microvascular endothelial and smooth muscle function in individuals with early-onset coronary artery disease: studies with laser speckle contrast imaging. *Coron Artery Dis* 25:23–28. doi: 10.1097/MCA.0000000000000055
- Sowers JR (2002) Hypertension, angiotensin II, and oxidative stress. *N Engl J Med* 346:1999–2001. doi: 10.1056/NEJMe020054
- Sriram K, Laughlin JG, Rangamani P, Tartakovsky DM (2016) Shear-Induced Nitric Oxide Production by Endothelial Cells. *Biophysical Journal* 111:208–221. doi: 10.1016/j.bpj.2016.05.034
- Stallknecht B, Vinten J, Ploug T, Galbo H (1991) Increased activities of mitochondrial enzymes in white adipose tissue in trained rats. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 261:E410–E414.
- Stamler JS, Meissner G (2001) Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. *Physiol Rev* 81:209–237.
- Stanford KI, Middelbeek RJW, Goodyear LJ (2015) Exercise Effects on White Adipose Tissue: Beiging and Metabolic Adaptations. *Diabetes* 64:2361–2368. doi: 10.2337/db15-0227
- Stas SN, El-Atat FA, Sowers JR (2004) Pathogenesis of hypertension in diabetes. *Rev Endocr Metab Disord* 5:221–225. doi: 10.1023/B:REMD.0000032410.75638.da
- Steinberg HO, Chaker H, Leaming R, et al (1996) Obesity/insulin resistance is associated with endothelial dysfunction. Implications for the syndrome of insulin resistance. *J Clin Invest* 97:2601–2610. doi: 10.1172/JCI118709
- Straub AC, Billaud M, Johnstone SR, et al (2011) Compartmentalized connexin 43 s-nitrosylation/denitrosylation regulates heterocellular communication in the vessel wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31:399–407. doi: 10.1161/ATVBAHA.110.215939
- Straub AC, Butcher JT, Billaud M, et al (2014) Hemoglobin α /eNOS coupling at myoendothelial junctions is required for nitric oxide scavenging during vasoconstriction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34:2594–2600. doi: 10.1161/ATVBAHA.114.303974
- Straznicki NE, Lambert EA, Lambert GW, et al (2005) Effects of dietary weight loss on sympathetic activity and cardiac risk factors associated with the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 90:5998–6005. doi: 10.1210/jc.2005-0961
- Sun J, Xu Y, Dai Z, Sun Y (2009) Intermittent high glucose enhances proliferation of vascular smooth muscle cells by upregulating osteopontin. *Mol Cell Endocrinol* 313:64–69. doi: 10.1016/j.mce.2009.08.019
- Sun X, Hou N, Han F, et al (2013) Effect of high free fatty acids on the anti-contractile

- response of perivascular adipose tissue in rat aorta. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 63:169–174. doi: 10.1016/j.yjmcc.2013.07.018
- Sutherland LN, Bomhof MR, Capozzi LC, et al (2009) Exercise and adrenaline increase PGC-1 α mRNA expression in rat adipose tissue. *J Physiol (Lond)* 587:1607–1617. doi: 10.1113/jphysiol.2008.165464
- Suzuki K, Olah G, Modis K, et al (2011) Hydrogen sulfide replacement therapy protects the vascular endothelium in hyperglycemia by preserving mitochondrial function. *PNAS* 108:13829–13834. doi: 10.1073/pnas.1105121108
- Szasz T, Bomfim GF, Webb RC (2013) The influence of perivascular adipose tissue on vascular homeostasis. *Vasc Health Risk Manag* 9:105–116. doi: 10.2147/VHRM.S33760



- Tan KCB, Xu A, Chow WS, et al (2004) Hypoadiponectinemia Is Associated with Impaired Endothelium-Dependent Vasodilation. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 89:765–769. doi: 10.1210/jc.2003-031012
- Tanaka T, Nakatani K, Morioka K, et al (2003) Nitric oxide stimulates glucose transport through insulin-independent GLUT4 translocation in 3T3-L1 adipocytes. *Eur J Endocrinol* 149:61–67.
- Tankersley CG, Campen M, Bierman A, et al (2004) Particle effects on heart-rate regulation in senescent mice. *Inhal Toxicol* 16:381–390. doi: 10.1080/08958370490439551
- Tanoue A, Koba M, Miyawaki S, et al (2002a) Role of the α 1D-adrenergic receptor in the development of salt-induced hypertension. *Hypertension* 40:101–106.
- Tanoue A, Nasa Y, Koshimizu T, et al (2002b) The α (1D)-adrenergic receptor directly regulates arterial blood pressure via vasoconstriction. *J Clin Invest* 109:765–775. doi: 10.1172/JCI14001
- Tarvainen MP, Niskanen J-P, Lipponen JA, et al (2014) Kubios HRV--heart rate variability analysis software. *Comput Methods Programs Biomed* 113:210–220. doi: 10.1016/j.cmpb.2013.07.024
- Tedesco L, Valerio A, Dossena M, et al (2010) Cannabinoid receptor stimulation impairs mitochondrial biogenesis in mouse white adipose tissue, muscle, and liver: the role of eNOS, p38 MAPK, and AMPK pathways. *Diabetes* 59:2826–2836. doi: 10.2337/db09-1881
- Teixeira de Lemos E, Reis F, Baptista S, et al (2009) Exercise training decreases proinflammatory profile in Zucker diabetic (type 2) fatty rats. *Nutrition* 25:330–339. doi: 10.1016/j.nut.2008.08.014
- Tentolouris N, Liatis S, Katsilambros N (2006) Sympathetic system activity in obesity and

- metabolic syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 1083:129–152. doi: 10.1196/annals.1367.010
- Tesfamariam B, Weisbrod RM, Cohen RA (1987) Endothelium inhibits responses of rabbit carotid artery to adrenergic nerve stimulation. *Am J Physiol* 253:H792-798.
- Thijssen DHJ, Black MA, Pyke KE, et al (2011) Assessment of flow-mediated dilation in humans: a methodological and physiological guideline. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 300:H2-12. doi: 10.1152/ajpheart.00471.2010
- Thijssen DHJ, Maiorana AJ, O'Driscoll G, et al (2010) Impact of inactivity and exercise on the vasculature in humans. *Eur J Appl Physiol* 108:845–875. doi: 10.1007/s00421-009-1260-x
- Thireau J, Aimond F, Poisson D, et al (2010) New insights into sexual dimorphism during progression of heart failure and rhythm disorders. *Endocrinology* 151:1837–1845. doi: 10.1210/en.2009-1184
- Thireau J, Karam S, Roberge S, et al (2014) B-adrenergic blockade combined with subcutaneous B-type natriuretic peptide: a promising approach to reduce ventricular arrhythmia in heart failure? *Heart* 100:833–841. doi: 10.1136/heartjnl-2013-305167
- Thireau J, Poisson D, Zhang BL, et al (2008a) Increased heart rate variability in mice overexpressing the Cu/Zn superoxide dismutase. *Free Radic Biol Med* 45:396–403. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.04.020
- Thireau J, Zhang BL, Poisson D, Babuty D (2008b) Heart rate variability in mice: a theoretical and practical guide. *Exp Physiol* 93:83–94. doi: 10.1113/expphysiol.2007.040733
- Thomas EL, Brynes AE, McCarthy J, et al (2000) Preferential loss of visceral fat following aerobic exercise, measured by magnetic resonance imaging. *Lipids* 35:769–776.
- Tilg H, Moschen AR (2006) Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 6:772–783. doi: 10.1038/nri1937
- Tominaga M, Eguchi H, Manaka H, et al (1999) Impaired glucose tolerance is a risk factor for cardiovascular disease, but not impaired fasting glucose. The Funagata Diabetes Study. *Diabetes Care* 22:920–924.
- Touati S, Meziri F, Devaux S, et al (2011) Exercise reverses metabolic syndrome in high-fat diet-induced obese rats. *Med Sci Sports Exerc* 43:398–407. doi: 10.1249/MSS.0b013e3181eeb12d
- Townsend N, Nichols M, Scarborough P, Rayner M (2015) Cardiovascular disease in Europe — epidemiological update 2015. *European Heart Journal* ehv428. doi: 10.1093/eurheartj/ehv428
- Trevellin E, Scorzeto M, Olivieri M, et al (2014) Exercise Training Induces Mitochondrial Biogenesis and Glucose Uptake in Subcutaneous Adipose Tissue Through eNOS-Dependent Mechanisms. *Diabetes* 63:2800–2811. doi: 10.2337/db13-1234
- Tripodskiadis F, Parissis JT, Starling RC, et al (2009) Current drugs and medical treatment algorithms in the management of acute decompensated heart failure. *Expert Opin*

- Investig Drugs 18:695–707. doi: 10.1517/13543780902922660
- Tsuchida A, Yamauchi T, Ito Y, et al (2004) Insulin/Foxo1 pathway regulates expression levels of adiponectin receptors and adiponectin sensitivity. *J Biol Chem* 279:30817–30822. doi: 10.1074/jbc.M402367200
- Tuomilehto J, Lindström J, Eriksson JG, et al (2001) Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *N Engl J Med* 344:1343–1350. doi: 10.1056/NEJM200105033441801
- Tuttle JL, Falcone JC (2001) Nitric oxide release during alpha1-adrenoceptor-mediated constriction of arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281:H873–881.



- Vallance P, Leiper J (2004) Cardiovascular Biology of the Asymmetric Dimethylarginine:Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase Pathway. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 24:1023–1030. doi: 10.1161/01.ATV.0000128897.54893.26
- Verlohren S, Dubrovskaja G, Tsang S-Y, et al (2004) Visceral periaortic adipose tissue regulates arterial tone of mesenteric arteries. *Hypertension* 44:271–276. doi: 10.1161/01.HYP.0000140058.28994.ec
- Vernochet C, Mourier A, Bezy O, et al (2012) Adipose-Specific Deletion of TFAM Increases Mitochondrial Oxidation and Protects Mice against Obesity and Insulin Resistance. *Cell Metabolism* 16:765–776. doi: 10.1016/j.cmet.2012.10.016
- Vieira VJ, Valentine RJ, Wilund KR, et al (2009) Effects of exercise and low-fat diet on adipose tissue inflammation and metabolic complications in obese mice. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 296:E1164–E1171. doi: 10.1152/ajpendo.00054.2009
- Villarroya F, Peyrou M, Giral M (2016) Transcriptional regulation of the uncoupling protein-1 gene. *Biochimie*. doi: 10.1016/j.biochi.2016.09.017
- Virdis A, Duranti E, Rossi C, et al (2015) Tumour necrosis factor-alpha participates on the endothelin-1/nitric oxide imbalance in small arteries from obese patients: role of perivascular adipose tissue. *European Heart Journal* 36:784–794. doi: 10.1093/eurheartj/ehu072
- Vollmer RR (1996) Selective neural regulation of epinephrine and norepinephrine cells in the adrenal medulla -- cardiovascular implications. *Clin Exp Hypertens* 18:731–751.



- Wagner R, Machann J, Lehmann R, et al (2012) Exercise-induced albuminuria is associated with perivascular renal sinus fat in individuals at increased risk of type 2 diabetes. *Diabetologia* 55:2054–2058. doi: 10.1007/s00125-012-2551-z
- Walther G, Obert P, Dutheil F, et al (2015) Metabolic syndrome individuals with and without type 2 diabetes mellitus present generalized vascular dysfunction: cross-sectional study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 35:1022–1029. doi: 10.1161/ATVBAHA.114.304591
- Wang X, You T, Murphy K, et al (2015) Addition of Exercise Increases Plasma Adiponectin and Release from Adipose Tissue. *Med Sci Sports Exerc* 47:2450–2455. doi: 10.1249/MSS.0000000000000670
- Weiss EP, Arif H, Villareal DT, et al (2008) Endothelial function after high-sugar-food ingestion improves with endurance exercise performed on the previous day. *Am J Clin Nutr* 88:51–57.
- Wen Y, Skidmore JC, Porter-Turner MM, et al (2002) Relationship of glycation, antioxidant status and oxidative stress to vascular endothelial damage in diabetes. *Diabetes Obes Metab* 4:305–308.
- Weston AH, Egner I, Dong Y, et al (2013) Stimulated release of a hyperpolarizing factor (ADHF) from mesenteric artery perivascular adipose tissue: involvement of myocyte BKCa channels and adiponectin. *Br J Pharmacol* 169:1500–1509. doi: 10.1111/bph.12157
- Widder JD, Chen W, Li L, et al (2007) Regulation of Tetrahydrobiopterin Biosynthesis by Shear Stress. *Circulation Research* 101:830–838. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.107.153809
- Woerdeman J, Meijer RI, Eringa EC, et al (2016) Insulin Sensitivity Determines Effects of Insulin and Meal Ingestion on Systemic Vascular Resistance in Healthy Subjects. *Microcirculation* 23:62–68. doi: 10.1111/micc.12258
- Wójcicka G, Jamroz-Wiśniewska A, Atanasova P, et al (2011) Differential effects of statins on endogenous H₂S formation in perivascular adipose tissue. *Pharmacol Res* 63:68–76. doi: 10.1016/j.phrs.2010.10.011
- Wolf AM, Wolf D, Rumpold H, et al (2004) Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 323:630–635. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.08.145
- Woodman CR, Muller JM, Laughlin MH, Price EM (1997) Induction of nitric oxide synthase mRNA in coronary resistance arteries isolated from exercise-trained pigs. *Am J Physiol* 273:H2575-2579.
- Wray DW, Ueberoi A, Lawrenson L, Richardson RS (2005) Heterogeneous limb vascular responsiveness to shear stimuli during dynamic exercise in humans. *J Appl Physiol* 99:81–86. doi: 10.1152/jappphysiol.01285.2004
- Wu G, Collins JK, Perkins-Veazie P, et al (2007) Dietary supplementation with watermelon pomace juice enhances arginine availability and ameliorates the metabolic syndrome

in Zucker diabetic fatty rats. *J Nutr* 137:2680–2685.

Wu G, Morris SM (1998) Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J* 336 (Pt 1):1–17.

Wu J, Boström P, Sparks LM, et al (2012) Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* 150:366–376. doi: 10.1016/j.cell.2012.05.016



Xi B, Huang Y, Reilly KH, et al (2015) Sugar-sweetened beverages and risk of hypertension and CVD: a dose-response meta-analysis. *Br J Nutr* 113:709–717. doi: 10.1017/S0007114514004383

Xi W, Satoh H, Kase H, et al (2005) Stimulated HSP90 binding to eNOS and activation of the PI3-Akt pathway contribute to globular adiponectin-induced NO production: vasorelaxation in response to globular adiponectin. *Biochem Biophys Res Commun* 332:200–205. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.04.111

Xia N, Horke S, Habermeier A, et al (2016) Uncoupling of Endothelial Nitric Oxide Synthase in Perivascular Adipose Tissue of Diet-Induced Obese Mice Significance. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 36:78–85. doi: 10.1161/ATVBAHA.115.306263

Xiang L, Naik J, Hester RL (2005) Exercise-induced increase in skeletal muscle vasodilatory responses in obese Zucker rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288:R987–991. doi: 10.1152/ajpregu.00702.2004

Xu A, Vanhoutte PM (2012) Adiponectin and adipocyte fatty acid binding protein in the pathogenesis of cardiovascular disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 302:H1231–1240. doi: 10.1152/ajpheart.00765.2011



Yang A-L, Lo C-W, Lee J-T, Su C-T (2011) Enhancement of vasorelaxation in hypertension following high-intensity exercise. *Chin J Physiol* 54:87–95.

Yang H, Roberts LJ, Shi MJ, et al (2004) Retardation of Atherosclerosis by Overexpression of Catalase or Both Cu/Zn-Superoxide Dismutase and Catalase in Mice Lacking Apolipoprotein E. *Circulation Research* 95:1075–1081. doi: 10.1161/01.RES.0000149564.49410.0d

Yang H, Zhou L, Wang Z, et al (2009) Overexpression of antioxidant enzymes in ApoE-deficient mice suppresses benzo(a)pyrene-accelerated atherosclerosis. *Atherosclerosis* 207:51–58. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2009.03.052

- Ye L, Wu J, Cohen P, et al (2013) Fat cells directly sense temperature to activate thermogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:12480–12485. doi: 10.1073/pnas.1310261110
- You T, Murphy KM, Lyles MF, et al (2006) Addition of aerobic exercise to dietary weight loss preferentially reduces abdominal adipocyte size. *Int J Obes (Lond)* 30:1211–1216. doi: 10.1038/sj.ijo.0803245
- Young CN, Fisher JP, Gallagher KM, et al (2009) Inhibition of nitric oxide synthase evokes central sympatho-excitation in healthy humans. *J Physiol (Lond)* 587:4977–4986. doi: 10.1113/jphysiol.2009.177204



- Zahlten RN, Hagler HK, Nejtek ME, Day CJ (1978) Morphological characterization of Kupffer and endothelial cells of rat liver isolated by counterflow elutriation. *Gastroenterology* 75:80–87.
- Zhang H, Zhao J, Yu H, Guo D (2016) Genistein ameliorated endothelial nitric oxidase synthase uncoupling by stimulating sirtuin-1 pathway in ox-LDL-injured HUVECs. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 42:118–124. doi: 10.1016/j.etap.2016.01.011
- Zhang K, Zucker IH, Patel KP (1998) Altered number of diaphorase (NOS) positive neurons in the hypothalamus of rats with heart failure. *Brain Res* 786:219–225.
- Zhang Q-J, McMillin SL, Tanner JM, et al (2009) Endothelial nitric oxide synthase phosphorylation in treadmill-running mice: role of vascular signalling kinases. *The Journal of Physiology* 587:3911–3920. doi: 10.1113/jphysiol.2009.172916
- Zhao Y, Vanhoutte PM, Leung SWS (2015) Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *J Pharmacol Sci* 129:83–94. doi: 10.1016/j.jphs.2015.09.002
- Zheng F, Lu W, Jia C, et al (2010) Relationships between glucose excursion and the activation of oxidative stress in patients with newly diagnosed type 2 diabetes or impaired glucose regulation. *Endocrine* 37:201–208. doi: 10.1007/s12020-009-9296-6
- Zhu M, Wen M, Sun X, et al (2015) Propofol protects against high glucose-induced endothelial apoptosis and dysfunction in human umbilical vein endothelial cells. *Anesth Analg* 120:781–789. doi: 10.1213/ANE.0000000000000616
- Zhu W, Cheng KKY, Vanhoutte PM, et al (2008) Vascular effects of adiponectin: molecular mechanisms and potential therapeutic intervention. *Clinical Science* 114:361–374. doi: 10.1042/CS20070347
- Zouhal H, Lemoine-Morel S, Mathieu M-E, et al (2013) Catecholamines and obesity: effects of exercise and training. *Sports Med* 43:591–600. doi: 10.1007/s40279-013-0039-8

ANNEXES

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <http://www.researchgate.net/publication/279299201>

Acute Hyperglycemia Impairs Vascular Function in Healthy and Cardiometabolic Diseased Subjects: Systematic Review and Meta-Analysis

ARTICLE in ARTERIOSCLEROSIS THROMBOSIS AND VASCULAR BIOLOGY · JUNE 2015

Impact Factor: 6 · DOI: 10.1161/ATVBAHA.115.305530 · Source: PubMed

CITATION

1

READS

21

8 AUTHORS, INCLUDING:



Christian Lorenzen

Australian Catholic University

28 PUBLICATIONS 103 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Cindy Meziat

Université d'Avignon et des Pays du Vaucl...

6 PUBLICATIONS 1 CITATION

[SEE PROFILE](#)



Cyril Reboul

Université d'Avignon et des Pays du Vaucl...

27 PUBLICATIONS 281 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Guillaume Walther

Université d'Avignon et des Pays du Vaucl...

44 PUBLICATIONS 347 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)

Acute Hyperglycemia Impairs Vascular Function in Healthy and Cardiometabolic Diseased Subjects

Systematic Review and Meta-Analysis

Jordan Loader, David Montero, Christian Lorenzen, Rani Watts, Cindy Méziat, Cyril Reboul, Simon Stewart, Guillaume Walther

Objectives—Controversy exists over the effect of acute hyperglycemia on vascular function. In this systematic review, we compared the effect of acute hyperglycemia on endothelial and vascular smooth muscle functions across healthy and cardiometabolic diseased subjects.

Approach and Results—A systematic search of MEDLINE, EMBASE, and Web of Science from inception until July 2014 identified articles evaluating endothelial or vascular smooth muscle function during acute hyperglycemia and normoglycemia. Meta-analyses compared the standardized mean difference (SMD) in endothelial and vascular smooth muscle functions between acute hyperglycemia and normoglycemia. Subgroup analyses and metaregression identified sources of heterogeneity. Thirty-nine articles (525 healthy and 540 cardiometabolic subjects) were analyzed. Endothelial function was decreased (39 studies; $n=1065$; SMD, -1.25 ; 95% confidence interval, -1.52 to -0.98 ; $P<0.01$), whereas vascular smooth muscle function was preserved (6 studies; $n=144$; SMD, -0.07 ; 95% confidence interval, -0.30 to 0.16 ; $P=0.55$) during acute hyperglycemia compared with normoglycemia. Significant heterogeneity was detected among endothelial function studies ($P<0.01$). A subgroup analysis revealed that endothelial function was decreased in the macrocirculation (30 studies; $n=884$; SMD, -1.40 ; 95% confidence interval, -1.68 to -1.12 ; $P<0.01$) but not in the microcirculation (9 studies; $n=181$; SMD, -0.63 ; 95% confidence interval, -1.36 to 0.11 ; $P=0.09$). Similar results were observed according to health status. Macrovascular endothelial function was inversely associated with age, blood pressure, and low-density lipoprotein cholesterol and was positively associated with the postocclusion interval of vascular assessment.

Conclusions—To our knowledge, this is the first systematic review and meta-analysis of its kind. In healthy and diseased subjects, we found evidence for macrovascular but not microvascular endothelial dysfunction during acute hyperglycemia. (*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015;35:2060-2072. DOI: 10.1161/ATVBAHA.115.305530.)

Key Words: cardiovascular diseases ■ hyperglycemia ■ meta-analysis ■ microcirculation ■ nitric oxide ■ vascular

The prevalence of type 2 diabetes mellitus represents a major public health issue, directly affecting an estimated 312 million people worldwide.¹ This burden is projected to worsen due, in part, to increasingly sedentary lifestyles and unhealthy dietary habits predominantly characterized by an excess consumption of added sugars.²⁻⁴ Habitual consumption of added sugars, most commonly in the form of sugar-sweetened beverages, is strongly associated with an increased risk in developing type 2 diabetes mellitus, as well as metabolic syndrome and obesity.⁵⁻⁸ In addition, consumption of added sugars has been linked to an increased risk of developing cardiovascular disease (CVD), which is the leading cause of mortality among those with cardiometabolic disease.^{1,9,10}

Consumption of excess added sugars leads to acute hyperglycemia, which is considered a better predictor of future CVD events than fasting glycemia in healthy and diabetic populations.^{11,12} Indeed, such acute hyperglycemic stress has also been proposed to contribute to vascular dysfunction,¹³ which represents one of the main precursors to CVD.¹⁴

In normal vascular function, the endothelium and vascular smooth muscle (VSM) cells continuously interact to regulate vasodilation and vasoconstriction, maintaining optimal organ perfusion and vascular tone.^{15,16} During acute hyperglycemia, increased oxidative stress has been proposed as a key trigger of vascular dysfunction by reducing nitric oxide (NO) production or NO bioavailability.^{15,17,18} Furthermore, animal and

Received on: February 25, 2015; final version accepted on: June 16, 2015.

From the Avignon University, LAPEC EA4278, Avignon, France (J.L., C.M., C.R., G.W.); School of Exercise Science (J.L., C.L., R.W., G.W.) and The Mary MacKillop Institute for Health Research (S.S.), Australian Catholic University, Melbourne, Victoria, Australia; and Zürich Center for Integrative Human Physiology (ZIHP), University of Zürich, Zürich, Switzerland (D.M.).

The online-only Data Supplement is available with this article at <http://atvb.ahajournals.org/lookup/suppl/doi:10.1161/ATVBAHA.115.305530/-/DC1>.

Correspondence to Guillaume Walther, PhD, Avignon University, Faculty of Sciences, LAPEC EA4278, 33 rue Louis Pasteur, 84000 Avignon, France. E-mail guillaume.walther@univ-avignon.fr

© 2015 American Heart Association, Inc.

Arterioscler Thromb Vasc Biol is available at <http://atvb.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/ATVBAHA.115.305530

Nonstandard Abbreviations and Acronyms

CI	confidence interval
CVD	cardiovascular disease
NO	nitric oxide
SMD	standardized mean difference
VSM	vascular smooth muscle

in vitro studies suggest that acute hyperglycemia may also impair VSM function by disrupting VSM cell apoptosis, causing subsequent VSM cell proliferation and desensitization to NO.^{19–21} However, whether endothelial and VSM functions are transiently impaired during acute hyperglycemia in humans is unclear because of discrepant results. Given this, we conducted a systematic review and meta-analysis of available studies comparing endothelial function alone or in combination with VSM function during acute hyperglycemia in healthy and cardiometabolic diseased individuals. To our knowledge, this represents the first systematic review and meta-analysis to assess the effect of acute hyperglycemia on vascular function.

Materials and Methods

Materials and methods are available in the online-only Data Supplement.

Results

Study Selection and Characteristics

A flowchart of study selection is shown in Figure 1. The systematic search resulted in the inclusion of 39 from 394 potential articles.^{22–60} Fourteen of these articles reported vascular data for multiple subgroups of a given or diverse health status; thus, they were assessed as individual studies.^{22,25–28,31,37,38,45,52,56–59} The main characteristics and clinical data for these studies are shown in Tables 1 and 2, respectively. Three potentially relevant studies were not available for full text reading and thus could not be included.^{61–63} All studies assessed endothelial or VSM function during acute hyperglycemia and normoglycemia in a total of 1065 individuals classified as healthy (n=525), obese (n=72), impaired glucose tolerance (n=104), type 2 diabetes mellitus (n=229), hypertensive (n=94), metabolic syndrome (n=30), or type 1 diabetic mellitus (n=11).

Quality Assessment and Potential Bias

The quality of the studies was moderate-to-high. The mean score was 9.4 ± 1.5 of possible 12 points (Table 1). The quality of evidence for outcomes demonstrating the effect of acute hyperglycemia on vascular function was low-to-moderate (Table 3). As for the evaluation of potential bias, the funnel plot (Figure 2), Begg and Mazumdar rank correlation test, and the Egger regression test suggested the presence of publication bias or other biases for the standardized mean difference (SMD) in endothelial function in the studies included in the meta-analysis ($P < 0.01$ and $P < 0.01$, respectively). There was no evidence of publication or other biases when assessing the SMD in VSM function in the studies included in the meta-analysis.

Endothelial Function

After data pooling, endothelial function was significantly decreased during acute hyperglycemia compared with normoglycemia (39 studies; n=1065; SMD, -1.25 ; 95% confidence interval [CI], -1.52 to -0.98 ; $P < 0.01$; Figure 3). There was no difference between health groups in the SMD in endothelial function ($P = 0.13$), but significant heterogeneity was detected ($I^2 = 87\%$; $P < 0.01$). Subgroup analysis of the SMD in endothelial function revealed that macrovascular function was significantly decreased during acute hyperglycemia compared with normoglycemia (30 studies; n=884; SMD, -1.40 ; 95% CI, -1.68 to -1.12 ; $P < 0.01$), whereas no significant decrease was found in the studies that assessed microvascular endothelial function (9 studies; n=181; SMD, -0.63 ; 95% CI, -1.36 to 0.11 ; $P = 0.09$). Heterogeneity was detected in the SMD in endothelial function for both macrovascular ($I^2 = 84\%$; $P < 0.01$) and microvascular function studies ($I^2 = 90\%$; $P < 0.01$). Of note, the heterogeneity about microvascular endothelial function was primarily explained ($\approx 40\%$) by a single study,³⁰ and the exclusion of such study did not significantly alter the pooled effect size (8 studies; n=147; SMD, -0.18 ; 95% CI, -0.53 to 0.17 ; $P = 0.30$).

VSM Function

After data pooling, VSM function was preserved during acute hyperglycemia versus normoglycemia (6 studies; n=144; SMD, -0.07 ; 95% CI, -0.30 to 0.16 ; $P = 0.55$; Figure 4). There was no significant difference between health groups in the SMD in VSM function ($P = 0.49$), and no heterogeneity was observed ($I^2 = 0\%$; $P = 0.85$). Because of limited data availability, it was not possible to analyze macro-VSM and micro-VSM function separately.

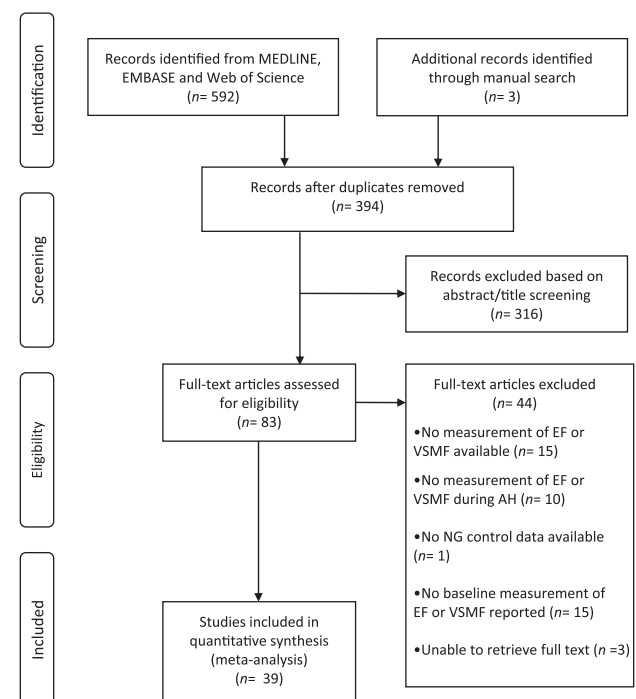


Figure 1. Flow diagram of the study selection process. AH indicates acute hyperglycemia; EF, endothelial function; NG, normoglycemia; and VSMF, vascular smooth muscle function.

Table 1. Main Characteristics of Studies Included in the Meta-Analysis

Study, Year of Publication	Study Design	Health Status	Medication	Quality Score (0–12)	Vascular Region	Inducing AH		Vascular EF During AH	VSMF During AH
						Method	Dose		
Grasser et al, ³⁴ 2014	RCT	Healthy	None	9	Micro	Energy drink	Sucrose/ glucose, 39.1 g	↑ ACh	NA
Nakayama et al, ⁴³ 2013	OBS	Healthy	None	6	Macro	Sugar drink	Maltose, 75 g	↓ FMD	NA
Mah et al, ⁴² 2013	RCT	Healthy	None	11	Macro	OGTT	Glucose, 75 g	↓ FMD	NA
Wang et al A, ⁵² 2013	RCT	Healthy	None	9	Macro	OGTT	Glucose, 75 g	↓ FMD	NA
Zhang et al A, ⁵⁹ 2013	RCT	Healthy	None	10	Macro	OGTT	Glucose, 75 g	↓ FMD	NA
De Marchi et al, ³⁰ 2012	RCT	Healthy	None	8	Micro	OGTT	Glucose, 75 g	↓ ACh	↔ SNP
Grassi et al, ³⁵ 2012	RCT	Healthy	None	9	Macro	OGTT	Glucose, 75 g	↓ FMD	NA
Suzuki et al, ⁴⁹ 2012	OBS	Healthy	None	8	Macro	OGTT	Glucose, 75 g	↓ FMD	NA
Ceriello et al A, ²⁸ 2011	RCT	Healthy	None	6	Macro	OGTT	Glucose, 75 g	↓ FMD	NA
Mah et al, ⁴¹ 2011	RCT	Healthy	None	11	Macro	OGTT	Glucose, 75 g	↓ FMD	NA
Watanabe et al, ⁵³ 2011	OBS	Healthy	None	11	Macro	OGTT	Glucose 75 g	↓ FMD	NA
Baynard et al A, ²⁵ 2009	OBS	Healthy	3 statin, 1 hydrochlorothiazide, 1 angiotensin II receptor blocker, 1 ACE inhibitor	9	Macro	Test meal	Carbohydrate, 80 g	↓ FMD	NA
Ceriello et al (1) A, ²⁷ 2008	OBS	Healthy	None	8	Macro	IV infusion	Glucose, 15 mmol/L	↓ FMD	NA
Ceriello et al (2) A, ²⁶ 2008	RCT	Healthy	None	8	Macro	IV infusion	Glucose, 15 mmol/L	↓ FMD	NA
Natali et al A, ⁴⁵ 2008	OBS	Healthy	Unknown	11	Micro	OGTT	Glucose, 75 g	↔ ACh	↓ SNP
Weiss et al, ⁵⁴ 2008	RCT	Healthy	None	10	Macro	Candy/sugar drink	Carbohydrate, 101 g	↓ FMD	NA
Xiang et al (1) A, ⁵⁷ 2008	RCT	Healthy	None	11	Macro	OGTT	Glucose, 75 g	↔ FMD	NA
Xiang et al (2) A, ⁵⁶ 2008	OBS	Healthy	None	11	Macro	OGTT	Glucose, 75 g	↓ FMD	↔ NMD
Xiang et al (2) B, ⁵⁶ 2008	OBS	Healthy	None	11	Macro	OGTT	Glucose, 75 g	↔ FMD	↔ NMD
Dengel et al A, ³¹ 2007	OBS	Healthy	None	11	Macro	OGTT	Glucose, 75 g	↑ FMD	NA
Zhu et al, ⁶⁰ 2007	RCT	Healthy	None	7	Macro	OGTT	Glucose, 75 g	↓ FMD	NA
Arora et al A, ²² 2006	OBS	Healthy	None	10	Micro	OGTT	Glucose 75 g	↓ PORH	NA
Fujimoto et al, ³³ 2006	OBS	Healthy	None	10	Macro	OGTT	Glucose, 75 g	↓ FMD	NA
Tushuizen et al, ⁵¹ 2006	RCT	Healthy	None	11	Macro	Test meal	Carbohydrate, 55 g	↓ FMD	NA
Napoli et al, ⁴⁴ 2004	RCT	Healthy	None	6	Micro	Test meal	Carbohydrate, 60 g	↔ ACh	↔ SNP
Siafrikas et al, ⁴⁷ 2004	RCT	Healthy	None	9	Macro	OGTT	Glucose, 75 g	↔ FMD	NA
Ihleman et al, ³⁶ 2003	RCT	Healthy	None	7	Micro	OGTT	Glucose, 75 g	↓ Serotonin	↓ SNP
Bagg et al, ²³ 2000	RCT	Healthy	None	9	Macro	IV infusion	Dextrose, 10% 238 mL	↔ FMD	NA
Title et al, ⁵⁰ 2000	RCT	Healthy	None	11	Macro	OGTT	Glucose, 75 g	↓ FMD	NA
Kawano et al A, ³⁸ 1999	OBS	Healthy	None	10	Macro	OGTT	Glucose, 75 g	↔ FMD	NA
Williams et al, ⁵⁵ 1998	OBS	Healthy	None	10	Micro	IV infusion	Glucose, 16.7 mmol/L	↔ Metacholine	NA
Lavi et al, ⁴⁰ 2009	RCT	Obese	None	8	Macro	Sugar drink	Glucose, 50 g	↓ FMD	NA
Dengel et al B, ³¹ 2007	OBS	Obese	None	11	Macro	OGTT	Glucose, 75 g	↑ FMD	NA
Wang et al B, ⁵² 2013	RCT	IGT	None	9	Macro	OGTT	Glucose, 75 g	↓ FMD	NA
Natali et al B, ⁴⁵ 2008	OBS	IGT	Unknown	11	Micro	OGTT	Glucose, 75 g	↔ ACh	↓ SNP
Xiang et al (1) B, ⁵⁷ 2008	RCT	IGT	None	11	Macro	OGTT	Glucose, 75 g	↓ FMD	NA
Arora et al B, ²² 2006	OBS	IGT	None	10	Micro	OGTT	Glucose, 75 g	↓ PORH	NA
Kawano et al B, ³⁸ 1999	OBS	IGT	None	10	Macro	OGTT	Glucose, 75 g	↓ FMD	NA
Wang et al C, ⁵² 2013	RCT	T2DM	None	9	Macro	OGTT	Glucose 75 g	↓ FMD	NA

(Continued)

Table 1. Continued

Study, Year of Publication	Study Design	Health Status	Medication	Quality Score (0–12)	Vascular Region	Inducing AH		Vascular EF During AH	VSMF During AH
						Method	Dose		
Ceriello et al B, ²⁸ 2011	RCT	T2DM	6 metformin discontinued 4 wk before 5 excluded ACE inhibitors	6	Macro	OGTT	Glucose 75 g	↓ FMD	NA
Chittari et al, ²⁹ 2011	OBS	T2DM	17 oral agents	10	Macro	OGTT	Glucose, 75 g	↓ FMD	NA
Kato et al A, ³⁷ 2010	RCT	T2DM	None	9	Macro	Cookie	Carbohydrate, 75 g	↓ FMD	NA
Kato et al B, ³⁷ 2010	RCT	T2DM	None	9	Macro	Cookie	Carbohydrate, 75 g	↓ FMD	NA
Kato et al C, ³⁷ 2010	RCT	T2DM	None	9	Macro	Cookie	Carbohydrate, 75 g	↓ FMD	NA
Ceriello et al (1) B, ²⁷ 2008	OBS	T2DM	None	8	Macro	IV infusion	Glucose 15, mmol/L	↓ FMD	NA
Ceriello et al (2) B, ²⁶ 2008	RCT	T2DM	None	8	Macro	IV infusion	Glucose 15, mmol/L	↓ FMD	NA
Ceriello et al (2) C, ²⁶ 2008	RCT	T2DM	None	8	Macro	IV infusion	Glucose 10, mmol/L	↓ FMD	NA
Ceriello et al (2) D, ²⁶ 2008	RCT	T2DM	None	8	Macro	IV infusion	Glucose 10, mmol/L	↓ FMD	NA
Natali et al C, ⁴⁵ 2008	OBS	T2DM	Unknown	11	Micro	OGTT	Glucose, 75 g	↔ ACh	↓ SNP
Stirban et al, ⁴⁸ 2006	RCT	T2DM	13 insulin, 11 aspirin, 9 ACE inhibitors, 1 angiotensin receptor blocker, 6 hydroxymethylglutaryl-CoA inhibitors, 5 β -blockers, 5 diuretics, 3 calcium channel blockers	11	Macro	Test meal	Carbohydrate, 48 g	↓ FMD	NA
Kim et al, ³⁹ 2003	OBS	T2DM	None	9	Micro	IV infusion	Glucose, 12/mg/kg per min	↓ PORH	NA
Kawano et al C, ³⁸ 1999	OBS	T2DM	None	10	Macro	OGTT	Glucose, 75 g	↓ FMD	NA
Shige et al, ⁴⁶ 1999	OBS	T2DM	None	8	Macro	Test meal	Sucrose, 75 g	↓ FMD	↔ NMD
Zhang et al B, ⁵⁹ 2013	RCT	Hypertensive	None	10	Macro	OGTT	Glucose, 75 g	↓ FMD	NA
Zhang et al A, ⁵⁸ 2012	RCT	Hypertensive	None	11	Macro	OGTT	Glucose, 75 g	↓ FMD	NA
Zhang et al B, ⁵⁸ 2012	RCT	Hypertensive	None	11	Macro	OGTT	Glucose, 75 g	↓ FMD	NA
Ballard et al, ²⁴ 2013	RCT	MetS	None	11	Macro	Rice milk	Mixed sugars, 23 g	↓ FMD	NA
Baynard et al B, ²⁵ 2009	OBS	MetS	3 metformin, 2 sulfonylurea, 4 statin	11	Macro	Test meal	Carbohydrate, 80 g	↓ FMD	NA
Dye et al, ³² 2012	OBS	T1DM	Insulin monotherapy	9	Micro	IV infusion	Dextrose, 200 mg/dL	↓ PORH	NA

Some studies presented multiple health groups comparing normoglycemia and acute hyperglycemia vascular function and were therefore evaluated as individual studies (distinguished by A, B, C, or D). Authors who published multiple studies in a single year were distinguished by (1) or (2). ↓ indicates significant decrease of vascular function during acute hyperglycemia compared with normoglycemia; ↔, no significant difference in vascular function between acute hyperglycemia and normoglycemia; ↑, significant increase of vascular function during acute hyperglycemia compared with normoglycemia; ACE, angiotensin-converting enzyme; ACh, acetylcholine; AH, acute hyperglycemia; EF, endothelial function; FMD, flow-mediated dilation; IGT, impaired glucose tolerance; IV, intravenous; MetS, metabolic syndrome; NA, vascular data not available; NMD, nitroglycerin-mediated dilation; OBS, observational study; OGTT, oral glucose tolerance test; PORH, postocclusive reactive hyperemia; RCT, randomized controlled trial; SNP, sodium nitroprusside; T1DM, type 1 diabetic mellitus; T2DM, type 2 diabetic mellitus; and VSMF, vascular smooth muscle function.

Metaregression Analyses

The SMD in macrovascular endothelial function was inversely associated with age ($\beta=-0.03$; $P<0.01$), systolic blood pressure ($\beta=-0.04$; $P<0.01$), diastolic blood pressure ($\beta=-0.05$; $P<0.01$), mean arterial pressure

($\beta=-0.05$; $P<0.01$), and low-density lipoprotein cholesterol ($\beta=-0.93$; $P<0.01$; Figure 5). In turn, the SMD in macrovascular endothelial function was positively associated with the postocclusion interval of vascular assessment ($\beta=0.36$; $P=0.01$).

Table 2. Clinical Data for Each Study Included in This Meta-Analysis

Study, Year of Publication	Health Status	n (%)	Age, y	BMI, kg/m ²	Blood Pressure, mm Hg			Fasting Plasma Insulin, pmol/L	Fasting Plasma Glucose, mmol/L	HbA _{1c} , %	Cholesterol, mmol/L			Triglycerides, mmol/L
					SBP	DBP	MAP				Total	HDL	LDL	
Grasser et al, ³⁴ 2014	Healthy	25 (48)	22.5±3	23.3±10	114±10	87±5	96±7	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Nakayama et al, ⁴³ 2013	Healthy	23 (0)	44±10	23±2.1	111±8	71±6	84±7	NA	5.1±0.4	NA	NA	NA	NA	NA
Mah et al, ⁴² 2013	Healthy	16 (0)	21.8±3.2	24.8±NA	117±4	79±4	92±4	142.5±94.4	5.3±0.4	NA	3.7±0.8	NA	NA	3.3±5
Wang et al A, ⁵² 2013	Healthy	33 (64)	51.36±7.15	24.76±3.6	NA	NA	NA	NA	5.4±0.5	6±0.3	5.5±0.6	1.4±0.4	3.7±0.6	1.5±0.5
Zhang et al A, ⁵⁹ 2013	Healthy	31 (48)	47.87±10.95	23.9±2.1	124±8	79±5	94±6	NA	4.8±1.1	NA	4.7±0.4	1.4±0.3	2.9±0.4	1.3±0.3
De Marchi et al, ³⁰ 2012	Healthy	34 (50)	32.4±3.5	19±3	119±4	79±9	92±7	34.8±6.6	5.1±0.6	NA	4.3±0.7	1.5±0.2	NA	1.5±0.1
Grassi et al, ³⁵ 2012	Healthy	12 (58)	28±2.7	23.2±4.2	NA	NA	NA	NA	4.2±0.4	NA	NA	1.5±0.4	2.5±0.4	0.7±0.3
Suzuki et al, ⁴⁹ 2012	Healthy	14 (57)	33.4±11.9	20.7±2.3	106±9	64±6	78±7	NA	4.8±0.6	5.4±0.3	5±0.6	1.7±0.4	2.7±0.5	0.8±0.4
Ceriello et al A, ²⁸ 2011	Healthy	12 (50)	50.5±8.66	28.5±10.7	117±19	78±8	91±11	73.4±15.2	4.5±1.4	4.8±0.7	4.5±2.1	1.4±0.7	2.5±1	0.9±0.7
Mah et al, ⁴¹ 2011	Healthy	16 (0)	21.6±3.2	28.7±NA	117±4	79±4	92±4	147±96	5.3±0.4	NA	3.6±0.7	NA	NA	NA
Watanabe et al, ⁵³ 2011	Healthy	14 (43)	33.4±11.9	20.7±2.3	106±9	64±6	78±7	29.7±11.9	4.7±0.4	NA	5±0.6	1.7±0.4	2.7±0.5	0.8±0.4
Baynard et al A, ²⁵ 2009	Healthy	10 (NA)	53±3.32	32.7±3.5	117±13	72±3	87±6	NA	4.6±0.3	5.2±0.4	5.2±1	1.3±0.3	3.2±0.95	1±0.3
Ceriello et al (1) A, ²⁷ 2008	Healthy	22 (45)	50.5±11.73	28.5±14.5	117±26	78±10	91±15	NA	4.5±1.4	4.8±0.9	4.5±2.8	1.4±0.9	2.5±1.4	0.9±0.9
Ceriello et al (2) A, ²⁶ 2008	Healthy	10 (40)	50.3±8.22	27.5±9.8	115±14	76±11	89±12	NA	4.5±1	4.8±0.6	4.8±1.9	1.4±1.6	2.4±1.3	0.9±1.6
Natali et al A, ⁴⁵ 2008	Healthy	20 (70)	49±8.94	27.9±4	129±13	78±9	95±10	NA	5.3±NA	5.6±0.5	4.9±0.9	1.2±0.2	3.3±0.8	1.1±0.5
Weiss et al, ⁵⁴ 2008	Healthy	13 (62)	48±17	24±2.2	114±14	66±7	82±10	NA	5.5±1.4	NA	NA	NA	NA	NA
Xiang et al (1) A, ⁵⁷ 2008	Healthy	26 (46)	50±6	24.2±2.3	114±7	72±6	86±7	NA	4.6±0.5	NA	4.4±0.9	1.2±0.1	1.9±0.7	1.4±1.2
Xiang et al (2) A, ⁵⁶ 2008	Healthy	17 (41)	39±12.37	24.1±6.6	115±20	68±12	84±15	NA	5.1±1.7	5.1±0.4	4.7±2.7	1.2±0.7	1.9±2.4	1.4±3.8
Xiang et al (2) B, ⁵⁶ 2008	Healthy	15 (47)	40±11.62	23.7±7.4	111±20	24±7	53±12	NA	4.6±1.9	4.8±0.8	4.5±1.9	1.2±0.7	1.9±1.8	1.4±3
Dengel et al A, ³¹ 2007	Healthy	15 (53)	11.3±1.55	17.5±1.9	110±12	59±8	76±9	41.2±15.1	4.8±0.3	NA	3.8±0.8	1.2±0.3	2.3±0.6	0.8±0.4
Zhu et al, ⁶⁰ 2007	Healthy	11 (0)	22.6±2.3	22.5±1.5	113±7	79±6	90±6	NA	5.2±0.2	NA	4±0.8	1.4±0.2	2.1±0.6	0.9±0.3
Arora et al A, ²² 2006	Healthy	10 (0)	27±NA	22.4±NA	122±NA	68±NA	86±NA	NA	4.8±NA	NA	4.1±NA	1.8±NA	2.2±NA	1.1±NA
Fujimoto et al, ³³ 2006	Healthy	10 (0)	30±2	NA	111±12	65±8	80±9	NA	5.1±0.6	NA	4.3±0.7	1.2±0.3	NA	1.2±0.7
Tushuizen et al, ⁵¹ 2006	Healthy	17 (0)	25.4±3	23.6±1.8	116±8	75±7	89±7	33±10	4.8±0.3	5.1±0.2	4±0.6	1.4±0.2	2.2±0.6	0.8±0.3
Napoli et al, ⁴⁴ 2004	Healthy	10 (40)	23±3.16	23.6±1.9	124±6	60±3	81±4	NA	5±NA	NA	NA	NA	NA	NA
Siafarikas et al, ⁴⁷ 2004	Healthy	32 (66)	19.1±1.7	22.9±4.2	NA	NA	NA	NA	NA	5±0.3	4±0.8	1.3±0.4	2.2±0.7	1.2±0.7
Ihleman et al, ³⁶ 2003	Healthy	10 (40)	53±6.96	22.7±1.9	144±17	75±11	98±13	NA	NA	5.2±0.3	5.2±0.6	1.7±0.3	3.2±0.6	0.8±0.3
Bagg et al, ²³ 2000	Healthy	10 (20)	26±6	22±2	111±10	65±8	80±9	34.2±11.4	5.2±0.3	NA	4.7±1	NA	NA	NA
Title et al, ⁵⁰ 2000	Healthy	10 (40)	25.5±3.1	24±3	118±8	72±7	87±7	NA	5.3±0.7	NA	5.1±1.1	1.3±0.1	3.3±0.9	1.2±0.5
Kawano et al A, ³⁸ 1999	Healthy	17 (35)	52.6±7.42	NA	NA	NA	NA	51.6±9.9	5±0.3	NA	4.9±0.4	1.2±0.1	3±0.4	1.5±0.2

(Continued)

Table 2. Continued

Study, Year of Publication	Health Status	n (% Women)	Age, y	BMI, kg/m ²	Blood Pressure, mm Hg			Fasting Plasma Insulin, pmol/L	Fasting Plasma Glucose, mmol/L	HbA _{1c} , %	Cholesterol, mmol/L			Triglycerides, mmol/L
					SBP	DBP	MAP				Total	HDL	LDL	
Williams et al, ⁵⁵ 1998	Healthy	10 (30)	33±6.32	NA	NA	NA	NA	NA	3.9±1.2	3.6±0.6	4.2±0.7	1.1±0.2	2.6±0.7	1±0.4
Lavi et al, ⁴⁰ 2009	Obese	56 (0)	47.9±5.8	32.1±4.3	134±13	82±6	99±8	NA	5.4±0.2	NA	5.1±0.7	1.1±0.2	3.2±0.7	1.7±0.9
Dengel et al B, ³¹ 2007	Obese	16 (56)	10.1±1.6	19.3±6.4	120±12	65±8	83±9	61.6±33.2	4.8±0.2	NA	4.2±0.6	1.1±0.2	2.6±0.5	1±0.6
Wang et al B, ⁵² 2013	IGT	33 (64)	52.88±9.2	27.8±3.1	NA	NA	NA	NA	6.1±0.5	6.5±0	5.5±1	1.2±0.3	3.1±0.8	1.8±0.9
Natali et al B, ⁴⁵ 2008	IGT	16 (63)	52±20	29.5±4.8	122±12	79±8	93±9	NA	5.7±NA	5.9±1.2	5.6±1.4	1.3±0.5	3.7±1.3	1.3±0.6
Xiang et al (1) B, ⁵⁷ 2008	IGT	21 (48)	51±6	24.8±3.1	110±8	72±6	85±7	NA	5.9±0.9	NA	5.2±1.1	1.2±0.2	2.3±0.7	2±1.1
Arora et al B, ²² 2006	IGT	10 (0)	65±NA	23.2±NA	134±NA	72±NA	93±NA	NA	5.3±NA	NA	4.3±NA	1.2±NA	2.1±NA	2.6±NA
Kawano et al B, ³⁸ 1999	IGT	24 (38)	58.5±7.84	NA	NA	NA	NA	66±11.8	5.8±0.8	NA	5.3±1	1.1±0.1	3.4±0.5	1.7±0.2
Wang et al C, ⁵² 2013	T2DM	43 (42)	53.4±8.99	25.7±2.9	NA	NA	NA	NA	7.5±1.2	7.4±0.1	5.8±1.7	1.2±0.3	3.2±0.7	2.2±1.2
Ceriello et al B, ²⁸ 2011	T2DM	16 (44)	51.3±10.4	29.5±13.2	123±26	80±14	95±18	107.3±15.2	7.8±8.8	8.4±1.2	5.1±3.2	1.2±0.3	2.6±0.4	1.2±1.6
Chittari et al, ²⁹ 2011	T2DM	21 (43)	46.4±9.62	30.1±5	NA	76±8	NA	NA	7.8±1.8	7.8±1.4	4.5±0.9	1.2±0.5	2.5±0.9	1.6±0.5
Kato et al A, ³⁷ 2010	T2DM	10 (50)	68±7.7	26.8±3.2	144±29	89±19	107±22	45±17.4	6.1±0.8	5.8±0.6	5.5±0.4	1.4±0.3	3.5±1.3	1.5±0.1
Kato et al B, ³⁷ 2010	T2DM	10 (30)	67.6±6.2	25.8±2.5	141±26	88±23	106±24	57.6±33.6	6.1±1	6±0.3	5.2±0.7	1.5±0.3	3.7±1.8	1.3±0.2
Kato et al C, ³⁷ 2010	T2DM	10 (30)	67.8±8.6	25.8±3.3	141±29	88±12	106±17	39.6±24.6	6.6±1	6.1±0.6	5.3±0.7	1.4±0.3	3.9±2	1.4±0.2
Ceriello et al (1) B, ²⁷ 2008	T2DM	27 (48)	51.3±13.51	29.5±17.2	123±33	80±19	95±24	NA	7.8±11.4	7.7±1.6	5.1±4.2	1.2±0.3	2.6±0.4	1.2±1.6
Ceriello et al (2) B, ²⁶ 2008	T2DM	10 (50)	50.3±6.96	27.5±10.1	118±17	77±12	91±14	NA	6.8±7	7.3±1	5±2.5	1.3±0.2	2±0.5	1±1.9
Ceriello et al (2) C, ²⁶ 2008	T2DM	10 (50)	50.2±14.23	28.4±13	121±7	79±9	93±8	NA	7.7±1.3	7.9±1.6	5±2.2	1.2±0.3	2.7±0.4	1.3±0.95
Ceriello et al (2) D, ²⁶ 2008	T2DM	10 (60)	51±17.71	28.6±11.7	122±11	80±12	94±12	NA	6±1	7.7±1.9	5.1±2.9	1.2±0.3	2.6±0.8	1.2±2.2
Natali et al C, ⁴⁵ 2008	T2DM	17 (71)	58±8.25	29.3±4.1	139±17	81±8	100±11	NA	8.3±NA	7.2±2.1	4.9±1.2	1±0.3	3.29±1.1	1.5±0.4
Stirban et al, ⁴⁸ 2006	T2DM	13 (NA)	56.9±10.1	30.3±3.2	136±22	79±13	98±16	NA	NA	8.5±1.8	NA	NA	NA	NA
Kim et al, ³⁹ 2003	T2DM	8 (50)	55.9±3.7	25.4±3.2	134±7	82±6	99±7	NA	7.2±2.6	6.6±0.8	5.5±0.3	1.3±0.2	NA	2.1±0.6
Kawano et al C, ³⁸ 1999	T2DM	17 (29)	62.2±4.95	NA	NA	NA	NA	84±22.3	7.1±0.3	NA	5.6±0.4	1.1±0.1	3.7±0.4	1.9±0.2
Shige et al, ⁴⁶ 1999	T2DM	7 (29)	49.3±8	26±5	128±9	72±9	91±9	47.4±16.8	7.1±1.3	NA	4.9±1.3	1±0.2	NA	1.6±0.6
Zhang et al B, ⁵⁹ 2013	Hypertensive	34 (50)	47.44±10.96	24.7±3.5	156±9	96±8	116±8	NA	4.7±0.6	NA	4.7±0.5	1.3±0.2	3±0.4	1.3±0.3
Zhang et al A, ⁵⁸ 2012	Hypertensive	26 (50)	47.92±8.05	24.6±2.6	160±8	97±6	118±7	NA	5.3±0.5	NA	4.7±0.6	1.4±0.3	2.6±0.4	1.4±0.2
Zhang et al B, ⁵⁸ 2012	Hypertensive	34 (47)	49.29±8	24.8±2.5	159±9	99±6	119±7	NA	5.2±0.6	NA	4.9±0.5	1.3±0.3	2.7±0.5	1.3±0.3
Ballard et al, ²⁴ 2013	MetS	19 (26)	28.5±9.59	35±3.9	125±11	85±8	98±8	55±25.7	6±0.9	NA	4.7±0.9	1±0.1	2.8±0.2	1.9±0.9
Baynard et al B, ²⁵ 2009	MetS	11 (NA)	52±3.16	34.4±5	123±7	78±3	93±4	NA	6.1±1.3	5.9±1.1	5.1±1	1±NA	3.1±0.7	2.4±1.3
Dye et al, ³² 2012	T1DM	11 (36)	14.5±3.32	21.5±9.6	105±7	61±10	76±9	NA	NA	8.3±1.2	NA	NA	NA	NA

Data are expressed as mean±SD or n. Some studies presented multiple health groups comparing normoglycemia and acute hyperglycemia vascular function and were therefore evaluated as individual studies (distinguished by A, B, C, or D). Authors who published multiple studies in a single year were distinguished by (1) or (2). BMI indicates body mass index; DBP, diastolic blood pressure; HDL, high-density lipoprotein; IGT, impaired glucose tolerance; LDL, low-density lipoprotein; MAP, mean arterial pressure; MetS, metabolic syndrome; NA, data not available; T1DM, type 1 diabetic mellitus; T2DM, type 2 diabetic mellitus; and SBP, systolic blood pressure.

Table 3. Effect of Acute Hyperglycemia on Vascular Function in Healthy and Cardiometabolic Populations: Quality of Evidence

Outcome Among Participants	Design (No. of Studies)	Risk of Bias	Inconsistency	Indirectness	Imprecision	Other Considerations*	Quality of Evidence (GRADE)
Decreased EF	RCT (23)	Serious†	Not serious	Not serious	Not serious	Publication bias likely¶	Low
Decreased EF	OBS (16)	Not serious	Not serious	Not serious	Not serious	None	Low
Decreased macro-EF	RCT (19)	Serious†	Not serious	Not serious	Not serious	Publication bias likely¶	Low
Decreased macro-EF	OBS (11)	Not serious	Not serious	Not serious	Not serious	None	Low
Preserved micro-EF	RCT (4)	Very serious‡	Serious§	Not serious	Very serious	Publication bias likely¶	Very low
Preserved micro-EF	OBS (5)	Serious‡	Not serious	Not serious	Serious	None	Very low
Preserved VSMF	RCT (3)	Serious†	Not serious	Not serious	Not serious	None	Moderate
Preserved VSMF	OBS (3)	Not serious	Not serious	Not serious	Not serious	None	Low

EF indicates endothelial function; GRADE, Grading of Recommendations Assessment, Development and Evaluation; OBS, observational study; RCT, randomized controlled trial; and VSMF, vascular smooth muscle function.

*Large magnitude of effect, dose–response, plausible biases decreasing the magnitude of effect, publication bias.

†Method for allocation of concealment and participant/assessor blinding is unclear or not performed. Incomplete outcome data and selective reporting when assessing endothelial, macrovascular endothelial, microvascular endothelial, and vascular smooth muscle function during acute hyperglycemia.

‡No control population included, failure to adequately control for confounding, and incomplete follow-up when assessing microvascular endothelial function.

§Large I^2 and point estimates vary widely across studies assessing microvascular endothelial function suggesting benefit, harm, and no effect of acute hyperglycemia.

||The 95% confidence interval of the pooled risk ratio includes both positive and negative effects of acute hyperglycemia.

¶Publication bias is strongly suspected because of the presence of asymmetry in funnel plots for randomized control trials assessing endothelial, macrovascular endothelial, and microvascular endothelial function during hyperglycemia.

Discussion

To our knowledge, this is the first systematic review and meta-analysis to assess the effect of acute hyperglycemia on vascular function. Data from 39 studies assessing endothelial function alone or in combination with VSM function during acute hyperglycemia in healthy and cardiometabolic diseased individuals were pooled and analyzed. The meta-analysis provided evidence that the average effect of acute hyperglycemia on endothelial function is decreased function, whereas VSM function was preserved in healthy and diseased individuals. Because of evidence of heterogeneity, the interpretation of the pooled effects of hyperglycemia on endothelial function should be made cautiously. Considerable heterogeneity was identified for most subgroups suggesting that the variability across studies was because of not only sampling variability but also differences in treatment effect within each study.⁶⁴ Nevertheless, the large effect sizes and 95% CIs consistently

avored normoglycemia, providing evidence of treatment effect.⁶⁴ Exploration of heterogeneity with metaregression indicated that the variability across studies could be explained by differences in age, blood pressure, and low-density lipoprotein cholesterol and the postocclusion interval of vascular assessment.

Currently, there is no consensus on the effect of acute hyperglycemia on endothelial function and VSM function as studies assessing vascular function during acute hyperglycemia have presented confounding results. This meta-analysis demonstrated evidence of macrovascular endothelial dysfunction during acute hyperglycemia in healthy people, as well as cardiometabolic diseased subjects, suggesting that the pathogenesis of CVD may begin, among others, with acute hyperglycemia-mediated transient decreases in endothelial function long before the onset of morbidities, such as obesity, hypertension, or type 2 diabetes mellitus. Interestingly, the inverse

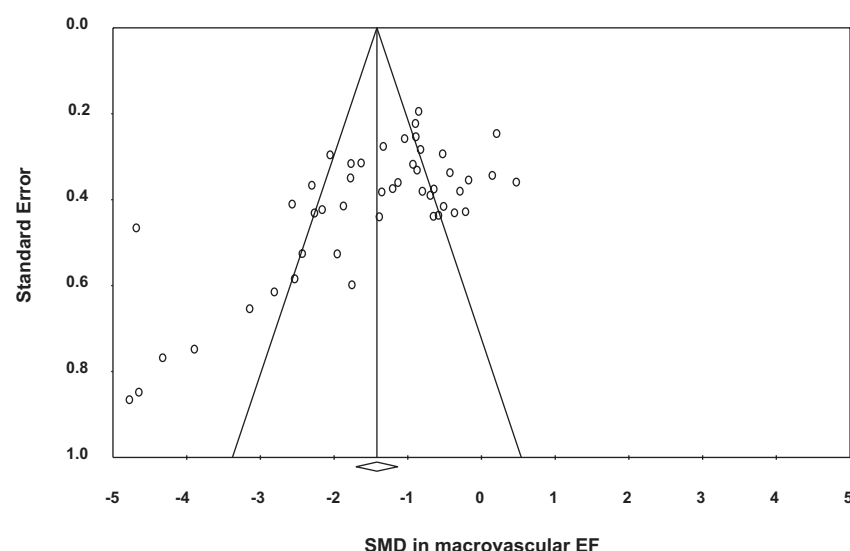


Figure 2. Funnel plot of the standardized mean difference (SMD) in macrovascular endothelial function in studies included in the meta-analysis. Funnel plot asymmetry: $P=0.0002$ and $P=0.00005$ according to Begg and Mazumdar rank correlation test and Egger test, respectively. EF indicates endothelial function.

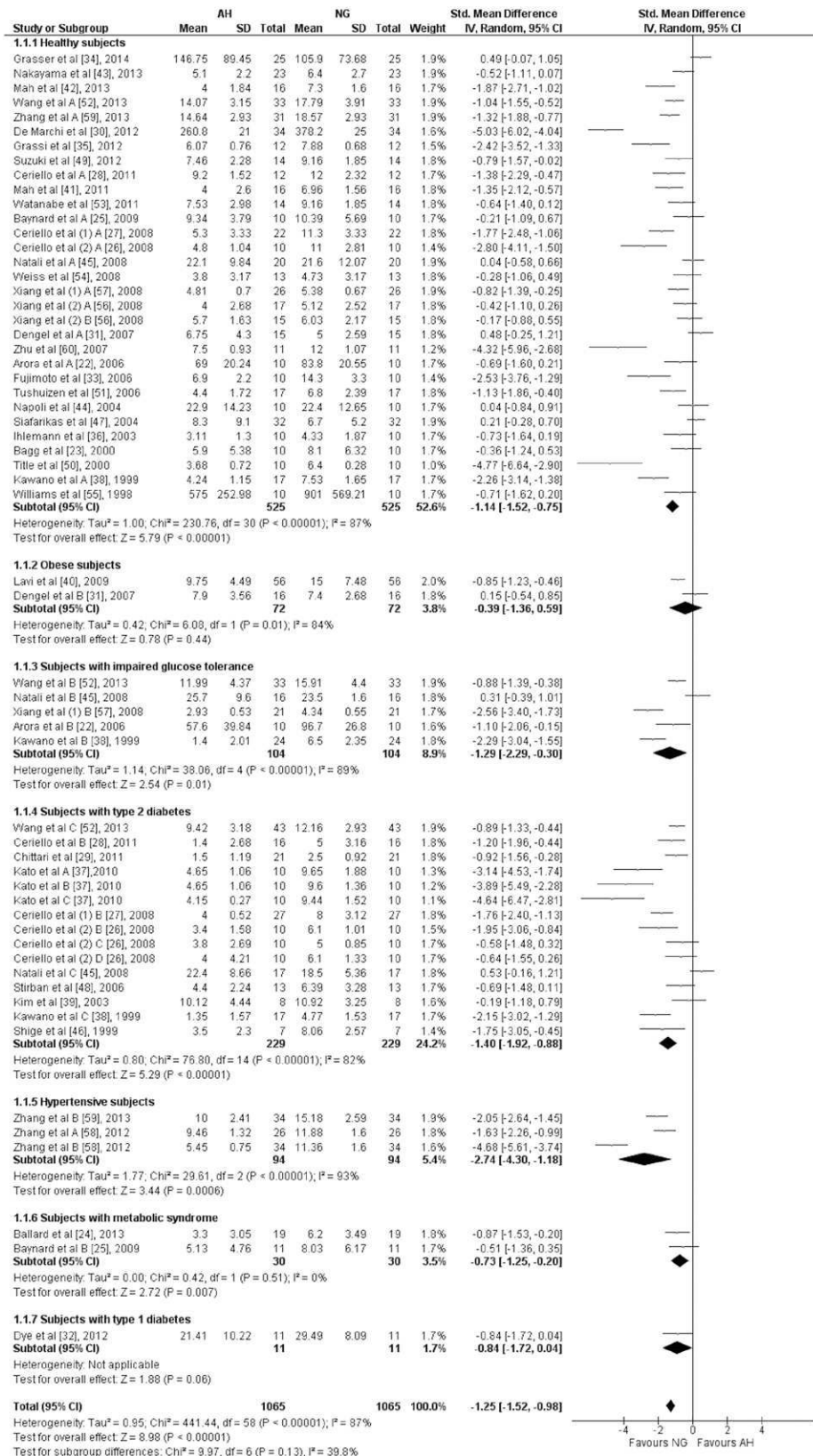


Figure 3. Forest plot of standardized mean difference (SMD) in endothelial function between acute hyperglycemia and normoglycemic states for all health groups included. Squares represent the SMD in endothelial function of each study. The diamond represents the pooled SMD in endothelial function by health group and overall. Some studies presented multiple subgroups according to health status; thus, they were evaluated as individual studies (distinguished by A, B, C, or D). Authors who published multiple studies in a single year had studies distinguished by numeric values (1 and 2). AH indicates acute hyperglycemia; CI, confidence interval; IV, inverse variance; and NG, normoglycemia.

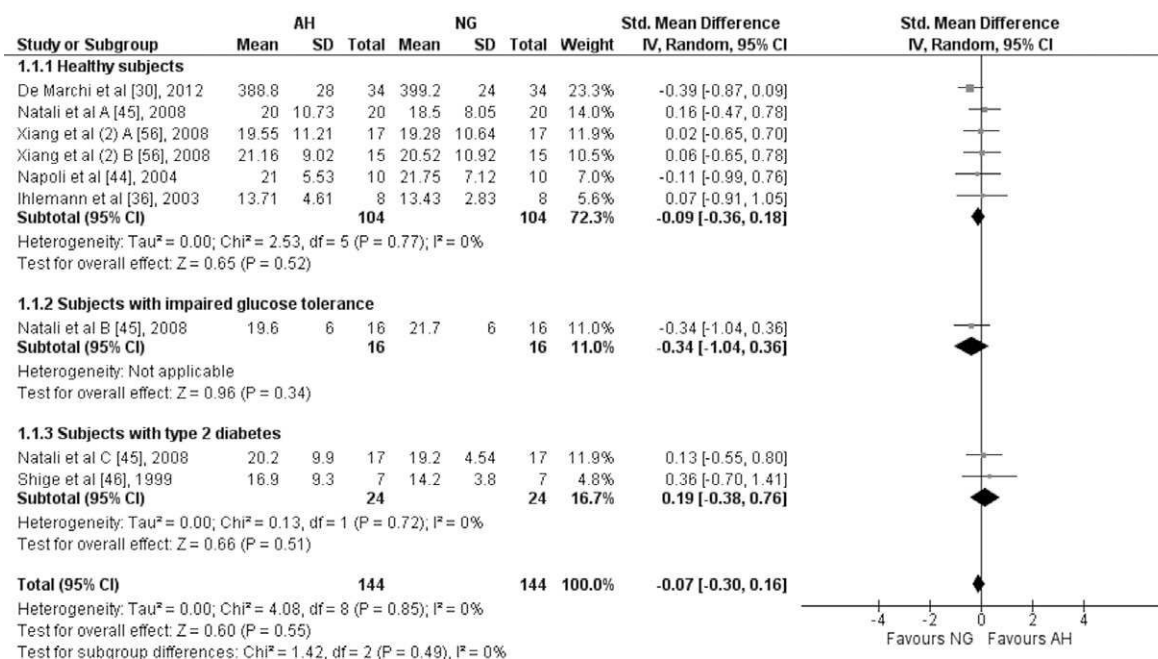


Figure 4. Forest plot of standardized mean difference (SMD) in vascular smooth muscle (VSM) function between acute hyperglycemic and normoglycemic states for all health groups included. Squares represent the SMD in VSM function of each study. The diamond represents the pooled SMD in VSM function by health group and overall. Some studies presented multiple subgroups according to health status; thus, they were evaluated as individual studies (distinguished by A, B, or C). Authors who published multiple studies in a single year had studies distinguished by numeric values (1 and 2). AH indicates acute hyperglycemia; CI, confidence interval; IV, inverse variance; and NG, normoglycemia.

relationship between macrovascular endothelial function and several traditional cardiovascular risk factors demonstrates the degree to which acute hyperglycemia mediates macrovascular endothelial dysfunction and correlates with increases in age, blood pressure, or low-density lipoprotein cholesterol levels. This is consistent with previous research revealing that elderly, hypertensive and subjects with dyslipidemia all exhibited significantly decreased endothelium-dependent vasodilation at rest compared with healthy populations,^{65–67} indicating that any existing macrovascular endothelial dysfunction may therefore be compounded by an acute hyperglycemic stress. The fact that microvascular endothelial dysfunction during acute hyperglycemia was not detected contradicts previously published data that associates decreased microvascular function with incident type 2 diabetes mellitus and suggests a role for microvascular dysfunction in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus.⁶⁸ Although in this meta-analysis, macrovascular endothelial function was affected across healthy and cardiometabolic health groups, VSM function remained preserved during acute hyperglycemia when compared with normoglycemia. In contradiction to previous findings in animal and in vitro studies, which found VSM dysfunction mediated by VSM cell proliferation may occur in as little as 6 hours.^{20,52}

Macrovascular endothelial dysfunction observed during acute hyperglycemia by methods assessing endothelium-dependent vasodilation primarily implicate decreased NO bioavailability as a central mechanism of endothelial dysfunction in healthy and cardiometabolic diseased populations.⁶⁹ This may be attributed to acute hyperglycemia increasing oxidative stress and its role in disrupting pathways of NO synthesis.¹² The fact that even healthy people

exhibited decreased macrovascular endothelial function during acute hyperglycemia demonstrates how acutely NO bioavailability may be affected by excess sugar consumption. The magnitude of macrovascular endothelial dysfunction induced by acute hyperglycemia may be compounded when cardiovascular risk factors, such as increased age, blood pressure, or low-density lipoprotein cholesterol, are present. This may be partly due to the fact that health groups exhibiting these clinical markers demonstrate decreased NO bioavailability and therefore impaired endothelial function, even at rest.^{65–67} Although NO is the predominant vasodilator in macrocirculation, it has been demonstrated to have significantly less influence in the microcirculatory system.⁷⁰ The increased influence of other chemical mediators of vasodilation, such as endothelial-derived hyperpolarizing factor and prostaglandin I_2 ,⁷¹ may, however, explain why microvascular endothelial function remained preserved during acute hyperglycemia. Consideration should also be given to the spatial variability associated with the techniques used in several of the studies using skin microcirculation as a model of assessing microvascular function.⁷² The large spatial variability in single-point laser Doppler flowmetry, for example, may have limited findings.⁷³ Despite this, final conclusions on the effect of acute hyperglycemia on microvascular function should not be made because of the limited availability of microcirculation data. Furthermore, it must be acknowledged that shear stress was not considered when performing analyses of flow-mediated dilation data in many studies. Shear stress, which is responsible for inducing the NO release that causes flow-mediated dilation, is dependent on variability of the hyperemic blood flow response in the microcirculation.⁷⁴

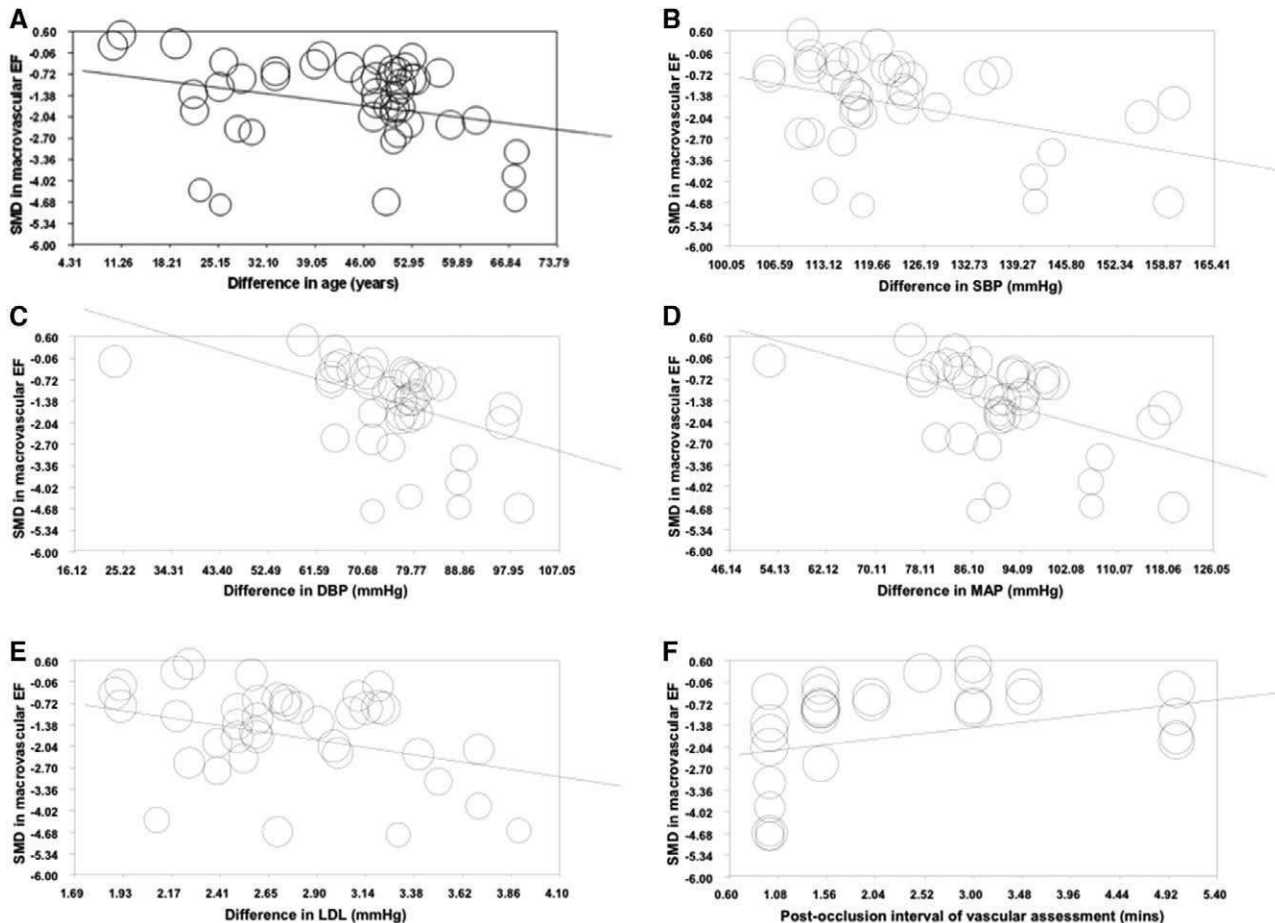


Figure 5. Metaregression plots of standardized mean difference (SMD) in macrovascular endothelial function (EF) according to the difference in (A) age ($\beta=-0.03$; $P=0.005$), (B) systolic blood pressure (SBP; $\beta=-0.04$; $P=0.0004$), (C) diastolic blood pressure (DBP; $\beta=-0.05$; $P<0.00001$), (D) mean arterial pressure (MAP; $\beta=-0.05$; $P=0.00001$), (E) low-density lipoprotein cholesterol (LDL; $\beta=-0.93$; $P=0.005$), and (F) postocclusion interval of vascular assessment ($\beta=0.36$; $P=0.01$). The size of each circle is proportional to the study's weight.

Therefore, macrovascular endothelial dysfunction observed during acute hyperglycemia may partially be mediated by a decrease in shear stress stimulus reflecting microvascular dysfunction.⁷⁴ The fact that VSM function was preserved during acute hyperglycemia indicates that endothelial dysfunction precedes VSM dysfunction, further supporting its role as a primary mechanism of CVD pathogenesis. Although disruptions in NO bioavailability mediated by acute hyperglycemia and the resulting endothelial dysfunction may initially be transient, if repeated often enough, they may lead to cumulative adverse outcomes, including proinflammatory responses and VSM cell proliferation.^{12,75} It has been suggested that acute hyperglycemia may induce VSM cell proliferation by disrupting VSM cell apoptosis, which is a key mechanism to prevent increased neointimal formation and stenosis.¹⁹ Moreover, decreased NO delivery by the endothelium to the VSM may contribute to VSM cell proliferation through increased periods of higher vasoconstrictive tone.⁷⁵ Ultimately, VSM cell proliferation may signal the beginning of a detectable and significant VSM dysfunction, representing a critical event in vascular remodeling and the development of CVD.⁷⁶

Given that CVD is the single leading cause of death, accounting for 30% of the annual global mortality rate,⁷⁷ and

that even healthy populations are subject to vascular dysfunction during acute hyperglycemia, there is a clear need to further investigate the effects of acute hyperglycemia on the underlying mechanisms of vascular function in vivo. Because of a surge in added sugar consumption in recent decades, predominantly in the form of sugar-sweetened beverages,² humans are more often in a state of acute hyperglycemia and therefore are more frequently inducing endothelial dysfunction. Considering this, future research should quantify what frequency and dosage of sugar consumption mediate atherosclerotic vascular changes in healthy and cardiometabolic diseased populations. Previously, certain ethnicities have demonstrated decreased vascular function at rest compared with white subjects.⁷⁸ Whether this exacerbates any vascular dysfunction mediated by acute hyperglycemia is still unknown and requires further research. To provide more comprehensive conclusions on how macrovascular and microvascular functions are affected by acute hyperglycemia, future research should consider shear stress as a covariate of conduit artery flow-mediated dilation data during statistical analyses.^{79,80} Furthermore, noting that vascular function is not entirely mediated by NO,¹² future research may also investigate the effect of sugar-sweetened beverage consumption on numerous mechanisms of vasodilation (eg, NO, endothelium-derived

hyperpolarizing factor, and prostaglandin I₂) and vasoconstriction (eg, endothelin-1), the influence of which varies from microcirculation to macrocirculation.

There are many inherent limitations to our analyses that require comment. As previously discussed, significant heterogeneity was observed among studies that assessed endothelial function. Studies published in languages other than English were not included, and the quality of evidence for outcomes assessed in this meta-analysis was low-to-moderate. Subanalyses of microcirculatory and VSM data were limited because of the low number of studies assessing microvascular and VSM function in normoglycemic and acute hyperglycemic states. Furthermore, some studies used methods of assessing microcirculation that can be easily influenced by spatial variability and thus may limit results when assessing microvascular function. The risk of publication or other biases was detected when assessing the SMD in endothelial function. However, the quality of studies was evaluated by specific tools for the quality assessment of observational research,^{81,82} revealing a predominantly low-bias risk. It must be acknowledged that the ethnicity of the populations was poorly reported by studies included in this meta-analysis, and thus, conclusions on the effect of ethnicity cannot be drawn from these data. Finally, many studies using flow-mediated dilation as a method of assessing macrovascular endothelial function did not report shear stress. Therefore, it was not possible to comprehensively conclude whether macrovascular endothelial dysfunction found during acute hyperglycemia is because of intrinsic abnormalities of macrovascular endothelial function or if it is partially attributable to microvascular dysfunction and decreased stimulus for conduit artery dilation.⁷⁹

In conclusion, based on studies included in this meta-analysis, current evidence suggests that acute hyperglycemia decreases macrovascular endothelial function with no changes in microvascular endothelial function and systemic VSM function across healthy and cardiometabolic populations. This further supports endothelial dysfunction mediated by decreased NO availability as a primary mechanism in the pathogenesis of CVD, which may begin long before vascular remodeling is detectable or the onset of cardiometabolic diseases. Noting that microvascular data were limited, the microcirculatory system should therefore not be dismissed as a possible site of vascular dysfunction. Considering this, future studies should investigate the effects of sugar-sweetened beverage consumption on the underlying mechanisms of human vascular function at microvascular and macrovascular levels. These studies will provide a better understanding of how acute hyperglycemia induces vascular dysfunction and how it contributes to the pathogenesis of CVD from healthy to cardiometabolic populations.

Acknowledgments

G. Walther was responsible for the concept and design of the study. Acquisition of data was carried out by J. Loader, D. Montero, C. Lorenzen, and G. Walther. J. Loader, D. Montero, and G. Walther analyzed and interpreted the data. Drafting of the article was carried out by J. Loader, D. Montero, and G. Walther. J. Loader, D. Montero, C. Lorenzen, R. Watts, C. Méziat, C. Reboul, S. Stewart, and G. Walther critically revised the article for important intellectual content. D. Montero provided statistical expertise, and J. Loader, D.

Montero, C. Lorenzen, R. Watts, S. Stewart, and G. Walther provided administrative, technical or material support. All authors approved the final version of the article.

Sources of Funding

G. Walther was supported by a grant (sabbatical) from the French Ministry of Research for this work. S. Stewart was supported by the National Health and Medical Research Council of Australia.

Disclosures

None.

References

1. World Health Organisation. Diabetes fact sheet. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>. November 22, 2014.
2. Brown CM, Dulloo AG, Montani JP. Sugary drinks in the pathogenesis of obesity and cardiovascular diseases. *Int J Obes (Lond)*. 2008;32(suppl 6):S28–S34. doi: 10.1038/ijo.2008.204.
3. Johnson RK, Appel LJ, Brands M, Howard BV, Lefevre M, Lustig RH, Sacks F, Steffen LM, Wylie-Rosett J; American Heart Association Nutrition Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism and the Council on Epidemiology and Prevention. Dietary sugars intake and cardiovascular health: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2009;120:1011–1020. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.192627.
4. Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med*. 2006;3:e442. doi: 10.1371/journal.pmed.0030442.
5. Malik AH, Akram Y, Shetty S, Malik SS, Yanchou Njike V. Impact of sugar-sweetened beverages on blood pressure. *Am J Cardiol*. 2014;113:1574–1580. doi: 10.1016/j.amjcard.2014.01.437.
6. Malik VS, Pan A, Willett WC, Hu FB. Sugar-sweetened beverages and weight gain in children and adults: a systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr*. 2013;98:1084–1102. doi: 10.3945/ajcn.113.058362.
7. Malik VS, Popkin BM, Bray GA, Després JP, Willett WC, Hu FB. Sugar-sweetened beverages and risk of metabolic syndrome and type 2 diabetes: a meta-analysis. *Diabetes Care*. 2010;33:2477–2483. doi: 10.2337/dc10-1079.
8. Romaguera D, Norat T, Wark PA, et al. Consumption of sweet beverages and type 2 diabetes incidence in european adults: results from epic-interact. *Diabetologia*. 2013;56:1520–1530.
9. International Diabetes Federation. Idf worldwide definition of the metabolic syndrome. <http://www.idf.org/metabolic-syndrome>. December 10, 2014.
10. World Health Organisation. Obesity and overweight fact sheet. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>. December 10, 2014.
11. Tominaga M, Eguchi H, Manaka H, Igarashi K, Kato T, Sekikawa A. Impaired glucose tolerance is a risk factor for cardiovascular disease, but not impaired fasting glucose. The Funagata Diabetes Study. *Diabetes Care*. 1999;22:920–924.
12. Mah E, Bruno RS. Postprandial hyperglycemia on vascular endothelial function: mechanisms and consequences. *Nutr Res*. 2012;32:727–740. doi: 10.1016/j.nutres.2012.08.002.
13. Lefebvre PJ, Scheen AJ. The postprandial state and risk of cardiovascular disease. *Diabet Med*. 1998;15(suppl 4):S63–S68. doi: 10.1002/(SICI)1096-9136(1998120)15:4<S63::AID-DIA737>3.0.CO;2-7.
14. Souza EG, De Lorenzo A, Huguenin G, Oliveira GM, Tibiriçá E. Impairment of systemic microvascular endothelial and smooth muscle function in individuals with early-onset coronary artery disease: studies with laser speckle contrast imaging. *Coron Artery Dis*. 2014;25:23–28. doi: 10.1097/MCA.000000000000055.
15. Buchwalow IB, Cacanyiova S, Neumann J, Samoilova VE, Boecker W, Kristek F. The role of arterial smooth muscle in vasorelaxation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;377:504–507. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.10.019.
16. Karaca Ü, Schram MT, Houben AJ, Muris DM, Stehouwer CD. Microvascular dysfunction as a link between obesity, insulin resistance and hypertension. *Diabetes Res Clin Pract*. 2014;103:382–387. doi: 10.1016/j.diabres.2013.12.012.
17. Celermajer DS. Endothelial dysfunction: does it matter? is it reversible? *J Am Coll Cardiol*. 1997;30:325–333.

18. Coutinho M, Gerstein HC, Wang Y, Yusuf S. The relationship between glucose and incident cardiovascular events. A metaregression analysis of published data from 20 studies of 95,783 individuals followed for 12.4 years. *Diabetes Care*. 1999;22:233–240.
19. Davis C, Fischer J, Ley K, Sarembock IJ. The role of inflammation in vascular injury and repair. *J Thromb Haemost*. 2003;1:1699–1709.
20. Sun J, Xu Y, Dai Z, Sun Y. Intermittent high glucose enhances proliferation of vascular smooth muscle cells by upregulating osteopontin. *Mol Cell Endocrinol*. 2009;313:64–69. doi: 10.1016/j.mce.2009.08.019.
21. Wang L, Zhu LH, Jiang H, Tang QZ, Yan L, Wang D, Liu C, Bian ZY, Li H. Grape seed proanthocyanidins attenuate vascular smooth muscle cell proliferation via blocking phosphatidylinositol 3-kinase-dependent signaling pathways. *J Cell Physiol*. 2010;223:713–726. doi: 10.1002/jcp.22080.
22. Arora S, Lidor A, Abularrage CJ, Weiswasser JM, Nysten E, Kellicutt D, Sidawy AN. Thiamine (vitamin B1) improves endothelium-dependent vasodilation in the presence of hyperglycemia. *Ann Vasc Surg*. 2006;20:653–658. doi: 10.1007/s10016-006-9055-6.
23. Bagg W, Whalley GA, Sathu A, Gamble G, Sharpe N, Braatvedt GD. The effect of acute hyperglycaemia on brachial artery flow mediated dilatation in normal volunteers. *Aust N Z J Med*. 2000;30:344–350.
24. Ballard KD, Mah E, Guo Y, Pei R, Volek JS, Bruno RS. Low-fat milk ingestion prevents postprandial hyperglycemia-mediated impairments in vascular endothelial function in obese individuals with metabolic syndrome. *J Nutr*. 2013;143:1602–1610. doi: 10.3945/jn.113.179465.
25. Baynard T, Carhart RL Jr, Weinstock RS, Ploutz-Snyder LL, Kanaley JA. Short-term exercise training improves aerobic capacity with no change in arterial function in obesity. *Eur J Appl Physiol*. 2009;107:299–308. doi: 10.1007/s00421-009-1126-2.
26. Ceriello A, Esposito K, Piconi L, Ihnat M, Thorpe J, Testa R, Bonfigli AR, Giugliano D. Glucose “peak” and glucose “spike”: impact on endothelial function and oxidative stress. *Diabetes Res Clin Pract*. 2008;82:262–267. doi: 10.1016/j.diabres.2008.07.015.
27. Ceriello A, Esposito K, Piconi L, Ihnat MA, Thorpe JE, Testa R, Boemi M, Giugliano D. Oscillating glucose is more deleterious to endothelial function and oxidative stress than mean glucose in normal and type 2 diabetic patients. *Diabetes*. 2008;57:1349–1354. doi: 10.2337/db08-0063.
28. Ceriello A, Esposito K, Testa R, Bonfigli AR, Marra M, Giugliano D. The possible protective role of glucagon-like peptide 1 on endothelium during the meal and evidence for an “endothelial resistance” to glucagon-like peptide 1 in diabetes. *Diabetes Care*. 2011;34:697–702. doi: 10.2337/dc10-1949.
29. Chittari MV, McTernan P, Bawazeer N, Constantinides K, Ciotola M, O’Hare JP, Kumar S, Ceriello A. Impact of acute hyperglycaemia on endothelial function and retinal vascular reactivity in patients with Type 2 diabetes. *Diabet Med*. 2011;28:450–454. doi: 10.1111/j.1464-5491.2010.03223.x.
30. De Marchi S, Prior M, Rigoni A, Zecchetto S, Rulfo F, Arosio E. Ascorbic acid prevents vascular dysfunction induced by oral glucose load in healthy subjects. *Eur J Intern Med*. 2012;23:54–57. doi: 10.1016/j.ejim.2011.07.019.
31. Dengel DR, Kelly AS, Steinberger J, Sinaiko AR. Effect of oral glucose loading on endothelial function in normal-weight and overweight children. *Clin Sci (Lond)*. 2007;112:493–498. doi: 10.1042/CS20060305.
32. Dye AS, Huang H, Bauer JA, Hoffman RP. Hyperglycemia increases muscle blood flow and alters endothelial function in adolescents with type 1 diabetes. *Exp Diabetes Res*. 2012;2012:170380. doi: 10.1155/2012/170380.
33. Fujimoto K, Hozumi T, Watanabe H, Tokai K, Shimada K, Yoshiyama M, Homma S, Yoshikawa J. Acute hyperglycemia induced by oral glucose loading suppresses coronary microcirculation on transthoracic Doppler echocardiography in healthy young adults. *Echocardiography*. 2006;23:829–834. doi: 10.1111/j.1540-8175.2006.00325.x.
34. Grasser EK, Yepuri G, Dulloo AG, Montani JP. Cardio- and cerebrovascular responses to the energy drink Red Bull in young adults: a randomized cross-over study. *Eur J Nutr*. 2014;53:1561–1571. doi: 10.1007/s00394-014-0661-8.
35. Grassi D, Desideri G, Necozione S, Ruggieri F, Blumberg JB, Stornello M, Ferri C. Protective effects of flavanol-rich dark chocolate on endothelial function and wave reflection during acute hyperglycemia. *Hypertension*. 2012;60:827–832. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.112.193995.
36. Ihlemann N, Rask-Madsen C, Perner A, Dominguez H, Hermann T, Køber L, Torp-Pedersen C. Tetrahydrobiopterin restores endothelial dysfunction induced by an oral glucose challenge in healthy subjects. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;285:H875–H882. doi: 10.1152/ajpheart.00008.2003.
37. Kato T, Inoue T, Node K. Postprandial endothelial dysfunction in subjects with new-onset type 2 diabetes: an acarbose and nateglinide comparative study. *Cardiovasc Diabetol*. 2010;9:12. doi: 10.1186/1475-2840-9-12.
38. Kawano H, Motoyama T, Hirashima O, Hirai N, Miyao Y, Sakamoto T, Kugiyama K, Ogawa H, Yasue H. Hyperglycemia rapidly suppresses flow-mediated endothelium-dependent vasodilation of brachial artery. *J Am Coll Cardiol*. 1999;34:146–154.
39. Kim SH, Park KW, Kim YS, Oh S, Chae IH, Kim HS, Kim CH. Effects of acute hyperglycemia on endothelium-dependent vasodilation in patients with diabetes mellitus or impaired glucose metabolism. *Endothelium*. 2003;10:65–70.
40. Lavi T, Karasik A, Koren-Morag N, Kanety H, Feinberg MS, Shechter M. The acute effect of various glycemic index dietary carbohydrates on endothelial function in nondiabetic overweight and obese subjects. *J Am Coll Cardiol*. 2009;53:2283–2287. doi: 10.1016/j.jacc.2009.03.025.
41. Mah E, Noh SK, Ballard KD, Matos ME, Volek JS, Bruno RS. Postprandial hyperglycemia impairs vascular endothelial function in healthy men by inducing lipid peroxidation and increasing asymmetric dimethylarginine:arginine. *J Nutr*. 2011;141:1961–1968. doi: 10.3945/jn.111.144592.
42. Mah E, Noh SK, Ballard KD, Park HJ, Volek JS, Bruno RS. Supplementation of a γ -tocopherol-rich mixture of tocopherols in healthy men protects against vascular endothelial dysfunction induced by postprandial hyperglycemia. *J Nutr Biochem*. 2013;24:196–203. doi: 10.1016/j.jnutbio.2012.04.015.
43. Nakayama H, Tsuge N, Sawada H, Higashi Y. Chronic intake of onion extract containing quercetin improved postprandial endothelial dysfunction in healthy men. *J Am Coll Nutr*. 2013;32:160–164. doi: 10.1080/07315724.2013.797858.
44. Napoli R, Guardasole V, Angelini V, Capasso AM, Zarra E, Cittadini A, Matarazzo M, Saccà L. Food and red wine do not exert acute effects on vascular reactivity. *Metabolism*. 2004;53:1081–1086.
45. Natali A, Baldi S, Vittone F, Muscelli E, Casolaro A, Morgantini C, Palombo C, Ferrannini E. Effects of glucose tolerance on the changes provoked by glucose ingestion in microvascular function. *Diabetologia*. 2008;51:862–871. doi: 10.1007/s00125-008-0971-6.
46. Shige H, Ishikawa T, Suzukawa M, Ito T, Nakajima K, Higashi K, Ayaori M, Tabata S, Ohsuzu F, Nakamura H. Endothelium-dependent flow-mediated vasodilation in the postprandial state in type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol*. 1999;84:1272–4, A9.
47. Siafrikas A, Watts K, Beye P, Jones TW, Davis EA, Green DJ. Lack of effect of oral glucose loading on conduit vessel endothelial function in healthy subjects. *Clin Sci (Lond)*. 2004;107:191–196. doi: 10.1042/CS20040004.
48. Stirban A, Negrean M, Stratmann B, Gawlowski T, Horstmann T, Götting K, Kleesiek K, Mueller-Roesel M, Koschinsky T, Uribarri J, Vlassara H, Tschoepe D. Benfotiamine prevents macro- and microvascular endothelial dysfunction and oxidative stress following a meal rich in advanced glycation end products in individuals with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2006;29:2064–2071. doi: 10.2337/dc06-0531.
49. Suzuki K, Watanabe K, Futami-Suda S, Yano H, Motoyama M, Matsumura N, Igari Y, Suzuki T, Nakano H, Oba K. The effects of postprandial glucose and insulin levels on postprandial endothelial function in subjects with normal glucose tolerance. *Cardiovasc Diabetol*. 2012;11:98. doi: 10.1186/1475-2840-11-98.
50. Title LM, Cummings PM, Giddens K, Nassar BA. Oral glucose loading acutely attenuates endothelium-dependent vasodilation in healthy adults without diabetes: an effect prevented by vitamins C and E. *J Am Coll Cardiol*. 2000;36:2185–2191.
51. Tushuizen ME, Nieuwland R, Scheffer PG, Sturk A, Heine RJ, Diamant M. Two consecutive high-fat meals affect endothelial-dependent vasodilation, oxidative stress and cellular microparticles in healthy men. *J Thromb Haemost*. 2006;4:1003–1010. doi: 10.1111/j.1538-7836.2006.01914.x.
52. Wang L, Guo L, Zhang L, Zhou Y, He Q, Zhang Z, Wang M. Effects of glucose load and nateglinide intervention on endothelial function and oxidative stress. *J Diabetes Res*. 2013;2013:849295. doi: 10.1155/2013/849295.
53. Watanabe K, Oba K, Suzuki T, Ouchi M, Suzuki K, Futami-Suda S, Sekimizu K, Yamamoto N, Nakano H. Oral glucose loading attenuates endothelial function in normal individual. *Eur J Clin Invest*. 2011;41:465–473. doi: 10.1111/j.1365-2362.2010.02424.x.
54. Weiss EP, Arif H, Villareal DT, Marzetti E, Holloszy JO. Endothelial function after high-sugar-food ingestion improves with endurance exercise performed on the previous day. *Am J Clin Nutr*. 2008;88:51–57.
55. Williams SB, Goldfine AB, Timimi FK, Ting HH, Roddy MA, Simonson DC, Creager MA. Acute hyperglycemia attenuates endothelium-dependent vasodilation in humans in vivo. *Circulation*. 1998;97:1695–1701.
56. Xiang GD, Sun HL, Hou J, Yue L, Xu L. Acute hyperglycemia rapidly suppresses endothelium-dependent arterial dilation in first-degree relatives of

- type 2 diabetic patients. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2008;116:112–117. doi: 10.1055/s-2007-984478.
57. Xiang GD, Sun HL, Zhao LS, Hou J, Yue L, Xu L. The antioxidant alpha-lipoic acid improves endothelial dysfunction induced by acute hyperglycaemia during OGTT in impaired glucose tolerance. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2008;68:716–723. doi: 10.1111/j.1365-2265.2007.03099.x.
 58. Zhang TX, Peng F, Chai DJ, Lin JX. Effects of combined glucose and fat load on endothelium-dependent brachial artery vasodilatation in hypertensive patients. *Am J Med Sci*. 2012;344:447–451. doi: 10.1097/MAJ.0b013e31824a0164.
 59. Zhang TX, Xu JX, Peng F, Chai DJ, Lin JX. Metformin reduces vascular endothelial dysfunction caused by an acute glucose load in patients with hypertension. *Blood Press*. 2013;22:106–113. doi: 10.3109/08037051.2012.732761.
 60. Zhu W, Zhong C, Yu Y, Li K. Acute effects of hyperglycaemia with and without exercise on endothelial function in healthy young men. *Eur J Appl Physiol*. 2007;99:585–591. doi: 10.1007/s00421-006-0378-3.
 61. Lee IK, Kim HS, Bae JH. Endothelial dysfunction: Its relationship with acute hyperglycaemia and hyperlipidemia. *Int J Clin Pract Suppl*. 2002;129:59–64.
 62. Bülow J, Astrup A, Christensen NJ, Kastrup J. Blood flow in skin, subcutaneous adipose tissue and skeletal muscle in the forearm of normal man during an oral glucose load. *Acta Physiol Scand*. 1987;130:657–661. doi: 10.1111/j.1748-1716.1987.tb08189.x.
 63. Forst T, Kunt T, Pohlmann T, Goitom K, Löbig M, Engelbach M, Beyer J, Pfützner A. Microvascular skin blood flow following the ingestion of 75 g glucose in healthy individuals. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 1998;106:454–459. doi: 10.1055/s-0029-1212015.
 64. Riley RD, Higgins JP, Deeks JJ. Interpretation of random effects meta-analyses. *BMJ*. 2011;342:d549.
 65. Ma L, Zhao S, Li J, Zhou Q, Gao M. Interaction of hypertension and diabetes on impairment of endothelial function. *Chin Med J (Engl)*. 2001;114:563–567.
 66. Rosendorff C. Effects of LDL cholesterol on vascular function. *J Hum Hypertens*. 2002;16(suppl 1):S26–S28. doi: 10.1038/sj.jhh.1001337.
 67. Trinity JD, Groot HJ, Layec G, Rossman MJ, Ives SJ, Morgan DE, Gmelch BS, Bledsoe AD, Richardson RS. Passive leg movement and nitric oxide-mediated vascular function: The impact of age. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2015;308(6):H672–H679. doi: 10.1152/ajpheart.00806.2014.
 68. Muris DM, Houben AJ, Schram MT, Stehouwer CD. Microvascular dysfunction is associated with a higher incidence of type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32:3082–3094. doi: 10.1161/ATVBAHA.112.300291.
 69. Green DJ, Dawson EA, Groenewoud HM, Jones H, Thijssen DH. Is flow-mediated dilation nitric oxide mediated?: a meta-analysis. *Hypertension*. 2014;63:376–382. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.02044.
 70. Sandoo A, Carroll D, Metsios GS, Kitas GD, Veldhuijzen van Zanten JJ. The association between microvascular and macrovascular endothelial function in patients with rheumatoid arthritis: a cross-sectional study. *Arthritis Res Ther*. 2011;13:R99. doi: 10.1186/ar3374.
 71. Félétou M, Vanhoutte PM. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: where are we now? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26:1215–1225. doi: 10.1161/01.ATV.0000217611.81085.c5.
 72. Rousseau P, Mahé G, Haj-Yassin F, Durand S, Humeau A, Leftheriotis G, Abraham P. Increasing the “region of interest” and “time of interest”, both reduce the variability of blood flow measurements using laser speckle contrast imaging. *Microvasc Res*. 2011;82:88–91. doi: 10.1016/j.mvr.2011.03.009.
 73. Tew GA, Klonizakis M, Crank H, Briers JD, Hodges GJ. Comparison of laser speckle contrast imaging with laser Doppler for assessing microvascular function. *Microvasc Res*. 2011;82:326–332. doi: 10.1016/j.mvr.2011.07.007.
 74. Mitchell GF. Effects of central arterial aging on the structure and function of the peripheral vasculature: implications for end-organ damage. *J Appl Physiol (1985)*. 2008;105:1652–1660. doi: 10.1152/japplphysiol.90549.2008.
 75. Montero D, Walther G, Pérez-Martin A, Vicente-Salar N, Roche E, Vinet A. Vascular smooth muscle function in type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *Diabetologia*. 2013;56:2122–2133. doi: 10.1007/s00125-013-2974-1.
 76. Akamatsu D, Sato A, Goto H, et al. Nitroglycerin-mediated vasodilatation of the brachial artery may predict long-term cardiovascular events irrespective of the presence of atherosclerotic disease. *J Atheroscler Thromb*. 2010;17:1266–1274.
 77. World Health Organisation. Cardiovascular diseases fact sheet. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>. December 11, 2014.
 78. Ozkor MA, Rahman AM, Murrow JR, Kavtaradze N, Lin J, Manatunga A, Hayek S, Quyyumi AA. Differences in vascular nitric oxide and endothelium-derived hyperpolarizing factor bioavailability in blacks and whites. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34:1320–1327. doi: 10.1161/ATVBAHA.113.303136.
 79. Mitchell GF, Parise H, Vita JA, Larson MG, Warner E, Keaney JF Jr, Keyes MJ, Levy D, Vasan RS, Benjamin EJ. Local shear stress and brachial artery flow-mediated dilation: the Framingham Heart Study. *Hypertension*. 2004;44:134–139. doi: 10.1161/01.HYP.0000137305.77635.68.
 80. Thijssen DH, Black MA, Pyke KE, Padilla J, Atkinson G, Harris RA, Parker B, Widlansky ME, Tschakovsky ME, Green DJ. Assessment of flow-mediated dilation in humans: a methodological and physiological guideline. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;300:H2–12. doi: 10.1152/ajpheart.00471.2010.
 81. Ross LE, Grigoriadis S, Mamisashvili L, Koren G, Steiner M, Dennis CL, Cheung A, Mousmanis P. Quality assessment of observational studies in psychiatry: an example from perinatal psychiatric research. *Int J Methods Psychiatr Res*. 2011;20:224–234. doi: 10.1002/mpr.356.
 82. Sprung VS, Atkinson G, Cuthbertson DJ, Pugh CJ, Aziz N, Green DJ, Cable NT, Jones H. Endothelial function measured using flow-mediated dilation in polycystic ovary syndrome: a meta-analysis of the observational studies. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2013;78:438–446. doi: 10.1111/j.1365-2265.2012.04490.x.

Significance

Acute hyperglycemia has previously been proposed to contribute to vascular dysfunction, which represents one of the main precursors to CVD. However, the effect of acute hyperglycemia on mechanisms of vascular function in humans is unclear because of discrepant results. Given this, we conducted the first systematic review and meta-analysis of its kind comparing endothelial function alone or in combination with VSM function during acute hyperglycemia in healthy and cardiometabolic diseased individuals. We demonstrate that acute hyperglycemia transiently impairs macrovascular endothelial function, which may represent, among others, a primary mechanism in the pathogenesis of CVD. This is significant when considering the surge in added sugar consumption in recent decades; humans are more often in a state of acute hyperglycemia and therefore are more frequently inducing endothelial dysfunction. This study provides the foundation for future research that will investigate the effect of acute hyperglycemia on underlying mechanisms of vascular function.

Acute hyperglycemia impairs flow-mediated dilatation through an increase in vascular oxidative stress: winter is coming for excess sugar consumption

Cindy Meziat^{1*}, Jordan Loader^{1,2,3*}, Cyril Reboul¹, Guillaume Walther^{1,3}

¹Avignon University, LAPEC EA4278, F-84000, Avignon, France; ²Centre of Research Excellence to Reduce Inequality in Heart Disease, Mary MacKillop Institute for Health Research, Australian Catholic University, Melbourne, Australia; ³School of Exercise Science, Australian Catholic University, Melbourne, Australia

*These authors contributed equally to this work.

Correspondence to: Guillaume Walther. Avignon University, Faculty of Sciences, LAPEC EA4278, 74 rue Louis Pasteur, 84000 Avignon, France. Email: guillaume.walther@univ-avignon.fr.

Submitted Jul 05, 2016. Accepted for publication Jul 28, 2016.

doi: 10.21037/jtd.2016.07.99

View this article at: <http://dx.doi.org/10.21037/jtd.2016.07.99>

In two editorials recently published in the *Journal of Thoracic Disease*, Robert P. Hoffman and John David Horowitz *et al.* separately reviewed the interaction between acute hyperglycemia and vascular function (1,2) with a focus on the results of our meta-analysis published in *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* (3). We thank the authors for their interest in our research and for their contribution to further understanding the effects of acute hyperglycemia on cardiovascular health.

Hoffman importantly highlighted that although our meta-analysis defined the methods used to assess vascular function, the primary outcome of each study wasn't clearly described. Indeed, it can be confirmed that for all studies included in the meta-analysis, the percentage increase from baseline measurement in response to a specific test of vascular reactivity was the primary outcome for both microvascular data (e.g., acetylcholine and sodium nitroprusside iontophoresis) and macrovascular data (e.g., flow- and nitrate-mediated dilation); and was used to determine standardized mean difference between vascular function in the acute hyperglycemic and normoglycemic states. In agreement with Hoffman, if there is a ceiling effect to the maximal vasodilatory capability of a blood vessel, then variations in baseline measurements due to the potential vasodilating effects of increased blood glucose or blood insulin concentrations during acute hyperglycemia would limit interpretation of the results when expressing vascular data solely as the percentage increase from baseline (1). Given

that only a few studies in the meta-analysis provided absolute values for baseline measurements of microcirculatory blood perfusion or brachial artery diameter, comparisons to detect differences in baseline data between the acute hyperglycemic and normoglycemic states were not possible. Such research deficiencies emphasize the need for future studies to clearly report absolute values of vascular function.

Further to this, Hoffman continued to address the potential confounding effects of the hyperinsulinemia that accompanies acute hyperglycemia. Indeed, insulin is a recognised vasodilator that contributes to vascular smooth muscle relaxation in an endothelium-dependent manner by stimulating the synthesis of nitric oxide via the PI3K/Akt pathway and the subsequent activation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) by phosphorylation at serine 1177 (4). Given that shear stress induces vasodilation through the same endothelium-dependent mechanism (5), it may be hypothesized that the impairment of the PI3K/Akt pathway that may be responsible for the acute hyperglycemia-mediated decrease in flow-mediated dilation may also cause a reduction in the vasodilatory action of insulin. Furthermore, it must be acknowledged that whilst blood glucose concentration increases rapidly following sugar consumption, increases in blood insulin concentration and its vasodilatory action are significantly delayed (6,7). Therefore, it is likely that the deleterious vascular effects of acute hyperglycemia may occur and be measured prior to any significant vasodilatory influence of insulin; moreover,

suggesting the redundancy of insulin's implication in potentially mediating heterogeneity between acute hyperglycemic and normoglycemic baseline measurements in vascular assessments performed soon after sugar consumption.

Considering that our meta-analysis highlighted the role of decreased nitric oxide bioavailability in acute hyperglycemia-mediated endothelial dysfunction, Horowitz *et al.* presented mechanisms that may contribute to impaired nitric oxide release (2). Nitric oxide synthesis is catalyzed by eNOS, which oxidizes L-arginine at its N-terminal oxygenase domain. However, L-arginine can also be converted to asymmetric N^G , N^G -dimethylarginine (ADMA) by protein arginine N methyltransferase (PRMT) (8) and arginase (9). The authors argue that elevated production of reactive oxygen species (ROS) during acute hyperglycemia may increase PRMT and arginase activity resulting in decreased bioavailability of L-arginine and increased ADMA. In addition to limiting substrate availability required for nitric oxide synthesis, ADMA directly competes with arginine for eNOS binding sites, thereby decreasing nitric oxide bioavailability. An increase in ROS (oxidative stress) during acute hyperglycemia may also impair eNOS activity by oxidizing its essential co-factor, tetrahydrobiopterin (BH_4) to dihydrobiopterin (BH_2) (10). Such elevations in BH_2 concentration decrease the binding of BH_4 to the active site of eNOS, compounding the superoxide generation (11) that reduces nitric oxide bioavailability and subsequently impairs endothelial function.

Given that it is now clearly established that acute hyperglycemia induces transient oxidative stress that is responsible for endothelial dysfunction (12), there is a great interest in approaches that increase antioxidant defenses that can prevent endothelial dysfunction. Physical activity is one such method that is known to stimulate antioxidant mechanisms, which may enhance eNOS coupling and eNOS activation by phosphorylation at serine 1177 (13). Nevertheless, further experimental and clinical studies are needed to explore the ability of exercise training to prevent oxidative stress and the eNOS uncoupling phenomenon occurring during acute hyperglycemia.

In conclusion, our meta-analysis provided evidence that acute hyperglycemia induces endothelial dysfunction. Due to limited availability of microcirculatory studies, this effect was contained to the macrocirculation. However, further research is needed to clearly establish that acute hyperglycemia-mediated endothelial dysfunction might also occur in the microcirculation. Given that added

sugar consumption has increased dramatically in recent decades, especially in children, highlights the importance of conducting such research that will inform public health policy on the role of excess sugar consumption in the pathogenesis of cardiovascular disease.

Acknowledgements

Cindy Meziat is a recipient of a PhD Scholarship awarded by the Provence Alpes Côte d'Azur Region. Jordan Loader is a recipient of a Dora Lush Biomedical Research Postgraduate Scholarship awarded by the National Health and Medical Research Council of Australia.

Footnote

Conflicts of Interest: The authors have no conflicts of interest to declare.

Response to: Horowitz JD, Chong CR, Ngo DT, *et al.* Effects of acute hyperglycaemia on cardiovascular homeostasis: does a spoonful of sugar make the flow-mediated dilatation go down? *J Thorac Dis* 2015;7:E607-11.

Hoffman RP. Hyperglycemic endothelial dysfunction: does it happen and does it matter? *J Thorac Dis* 2015;7:1693-5.

References

1. Hoffman RP. Hyperglycemic endothelial dysfunction: does it happen and does it matter? *J Thorac Dis* 2015;7:1693-5.
2. Horowitz JD, Chong CR, Ngo DT, *et al.* Effects of acute hyperglycaemia on cardiovascular homeostasis: does a spoonful of sugar make the flow-mediated dilatation go down? *J Thorac Dis* 2015;7:E607-11.
3. Loader J, Montero D, Lorenzen C, *et al.* Acute Hyperglycemia Impairs Vascular Function in Healthy and Cardiometabolic Diseased Subjects: Systematic Review and Meta-Analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2015;35:2060-72.
4. Muniyappa R, Quon MJ. Insulin action and insulin resistance in vascular endothelium. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2007;10:523-30.
5. Fleming I, Fisslthaler B, Dixit M, *et al.* Role of PECAM-1 in the shear-stress-induced activation of Akt and the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in endothelial cells. *J Cell Sci* 2005;118:4103-11.
6. Fugmann A, Lind L, Andersson PE, *et al.* The effect of euglycaemic hyperinsulinaemia on forearm blood flow

- and glucose uptake in the human forearm. *Acta Diabetol* 1998;35:203-6.
7. Tack CJ, Scheffman AE, Willems JL, et al. Direct vasodilator effects of physiological hyperinsulin-aemia in human skeletal muscle. *Eur J Clin Invest* 1996;26:772-8.
 8. Wu G, Morris SM Jr. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J* 1998;336:1-17.
 9. Pope AJ, Karupiah K, Cardounel AJ. Role of the PRMT-DDAH-ADMA axis in the regulation of endothelial nitric oxide production. *Pharmacol Res* 2009;60:461-5.
 10. Crabtree MJ, Smith CL, Lam G, et al. Ratio of 5,6,7,8-tetrahydrobiopterin to 7,8-dihydrobiopterin in endothelial cells determines glucose-elicited changes in NO vs. superoxide production by eNOS. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;294:H1530-40.
 11. Vásquez-Vivar J, Martásek P, Whitsett J, et al. The ratio between tetrahydrobiopterin and oxidized tetrahydrobiopterin analogues controls superoxide release from endothelial nitric oxide synthase: an EPR spin trapping study. *Biochem J* 2002;362:733-9.
 12. Monnier L, Mas E, Ginet C, et al. Activation of oxidative stress by acute glucose fluctuations compared with sustained chronic hyperglycemia in patients with type 2 diabetes. *JAMA* 2006;295:1681-7.
 13. Farah C, Kleindienst A, Bolea G, et al. Exercise-induced cardioprotection: a role for eNOS uncoupling and NO metabolites. *Basic Res Cardiol* 2013;108:389.

Cite this article as: Meziat C, Loader J, Reboul C, Walther G. Acute hyperglycemia impairs flow-mediated dilatation through an increase in vascular oxidative stress: winter is coming for excess sugar consumption. *J Thorac Dis* 2016;8(9):E1103-E1105. doi: 10.21037/jtd.2016.07.99

Hyperglycaemia and perivascular adipose tissue, two triggers in vascular dysfunction:**Impact of oxidative stress-eNOS pathway and effect of exercise training.**

The globalization of the western diet has mediated prevalence in cardiovascular disease related mortality, the single leading cause of death worldwide. Considering this, it is imperative that the underlying mechanisms of cardiovascular dysfunctions are continually investigated to establish a greater understanding of its pathogenesis from a healthy state to the presence of cardiometabolic diseases; and to improve upon current treatment and preventative strategies. Therefore, the **first aim** of this research was to identify vascular impact of acute hyperglycaemic stress induced by sweet sugar beverage consumption, with a translational approach. The results of this study demonstrated that consumption of a single commercially available sugar-sweetened beverage (SSB) induced transient micro- and macrovascular endothelial dysfunction, even in a healthy population. Further exploration into the underlying mechanisms of SSB-mediated endothelial dysfunction indicated that an increase in oxidative stress disrupts normal function of the nitric oxide pathway. Although disturbances in cardiovascular function may initially be transient, repetitive acute metabolic stress may translate to chronic cardiometabolic disease. Therefore, the **second aim** of this research was to assess the impact of a chronic metabolic disorder, metabolic syndrome (MetS), on vascular function in a rat model. Despite increasing sympathetic activity, the MetS rats didn't present elevated arterial pressure. Such findings may be explained by a compensatory adaptation of endothelial function that increases production of nitric oxide in response to α -adrenergic agonist and, thus, regulates arterial pressure despite sympathetic hyperactivity. Considering this, the **third aim** of this research evaluated the impact of perivascular adipose tissue (PVAT) on vascular function in MetS rats; demonstrating that MetS altered the adiponectin-endothelial nitric oxide synthase pathway in PVAT, in an oxidative stress-dependant manner. Exercise training is well recognized as a non-pharmacological strategy that has a beneficial impact on both metabolic and cardiovascular disorders via an improvement in function of the nitric oxide pathway. Considering this, research also assessed the efficacy of this approach to prevent vascular injury induced by acute hyperglycaemia in a healthy population and by PVAT in those with MetS. It was demonstrated that exercise attenuated acute hyperglycemia-mediated endothelial dysfunction; and restored endothelium-dependent vascular reactivity in rats with MetS, due to an improvement in the biocommunication between PVAT and arterial issue and a notable enhancement of the adiponectine-endothelial nitric oxide synthase pathway.

Hyperglycémie et tissu adipeux, deux acteurs de la dysfonction vasculaire : Implication du couple stress oxydant – eNOS et modulation par l'exercice physique.

Les troubles métaboliques caractéristiques d'une alimentation de type « Western diet », sont à l'origine de pathologies cardiovasculaires, première cause de mortalité dans le monde. Il apparaît nécessaire d'améliorer la compréhension des mécanismes impliqués dans l'installation des dysfonctions cardiovasculaires afin de pouvoir proposer des stratégies thérapeutiques ou préventives adaptées. Ainsi, **le premier objectif de la thèse** a été d'évaluer les effets d'une boisson sucrée sur la fonction vasculaire macro- et microcirculatoire chez des sujets sains, par une approche translationnelle allant de la clinique humaine à un modèle expérimental de rongeur. Nos résultats montrent une altération de la fonction endothéliale en réponse à une prise de boisson sucrée, dans l'ensemble des lits vasculaires. L'exploration des mécanismes sous-jacents ces altérations nous a permis d'identifier l'implication du couple stress-oxydant/voie du NO. **Un second objectif de thèse**, a été d'étudier l'impact d'un stress métabolique chronique sur la fonction vasculaire et son incidence sur la régulation de la pression artérielle. Comme observé chez certains sujets souffrant de syndrome métabolique, notre modèle de rat ne présentait pas d'hypertension artérielle, malgré une hyperactivité du système sympathique. Ceci semble être expliqué par une compensation endothéliale eNOS-dépendant, qui permet de garantir le maintien d'une pression artérielle normale en dépit de l'effet vasopresseur adrénergique élevé. **Le troisième objectif de thèse** a porté sur un nouvel élément participant au maintien de l'homéostasie vasculaire et impacté par les situations pathologiques : le tissu adipeux périvasculaire (PVAT). Nos travaux démontrent dans le contexte du SMet, une altération de la voie adiponectine/eNOS dans le PVAT, en parallèle d'une augmentation de la production d'espèces oxygénées réactives. La pratique régulière d'un exercice physique est aujourd'hui reconnue comme une stratégie non-pharmacologique permettant d'impacter à la fois les désordres métaboliques et cardiovasculaires, notamment via une amélioration de la voie du NO. Nos résultats démontrent une limitation de l'apparition des dysfonctions endothéliales causée par une hyperglycémie aigue lorsqu'un protocole d'exercice physique chronique est réalisé. Enfin, l'exercice physique permet également de prévenir les modifications des propriétés vasoactives du PVAT dans un modèle de rat SMet. Ce phénomène pourrait être expliqué par une amélioration du statut oxydant de la paroi artérielle, et à une potentialisation de la voie adiponectine/eNOS par l'exercice physique.