



**Activité physique et prévention de l'athérosclérose :
Mise en évidence de l'implication des PPAR
(Peroxisome Proliferator-Activated Receptor) dans la
cardioprotection induite par l'exercice physique soumis
ou volontaire chez la souris ApoE^{-/-} mice**

Justyna Szostak

► **To cite this version:**

Justyna Szostak. Activité physique et prévention de l'athérosclérose : Mise en évidence de l'implication des PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor) dans la cardioprotection induite par l'exercice physique soumis ou volontaire chez la souris ApoE^{-/-} mice. Médecine humaine et pathologie. Université de Franche-Comté, 2012. Français. NNT : 2012BESA3006 . tel-01538103

HAL Id: tel-01538103

<https://theses.hal.science/tel-01538103>

Submitted on 13 Jun 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.

Activité physique et prévention de l'athérosclérose.

Mise en évidence de l'implication des PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor) dans la cardioprotection induite par l'exercice physique soumis ou volontaire chez la souris ApoE^{-/-}.

THÈSE EN COTUTELLE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR es Sciences de la Vie et de la Santé de l'UNIVERSITÉ DE FRANCHE-COMTÉ

Et du grade de

DOCTEUR, ès Sciences de la Vie de l'UNIVERSITÉ DE LAUSANNE

Présentée et soutenue publiquement par

SZOSTAK Justyna

Le 29 juin 2012

JURY

Mr le Professeur Alain Berthelot, (Directeur de thèse), Université de Franche-Comté.
Mme le Professeur Lucia Mazzolai, (Directeur de thèse), Université de Lausanne.
Mr le Professeur Jürg Nussberger, (Co-directeur), Université de Lausanne.
Mr le Professeur Pascal Laurant, (Co-directeur), Université d'Avignon.
Mr le Professeur Jean-Christophe Gris, (Expert), Université de Montpellier 1.
Mr le Professeur Daniel Hayoz, (Expert), Université de Fribourg.

TABLE DES ILLUSTRATIONS

<u>Figure 1</u> : Progression schématique de l'athérosclérose.....	16
<u>Figure 2</u> : Caractéristiques d'une plaque stable et instable (Libby et al, 2002).....	20
<u>Figure 3</u> : Représentation schématique des macrophages M1 et M2 (Claria et al, 2011)	24
<u>Figure 4</u> : Classement des 10 facteurs de risque cardiovasculaire (OMS).....	30
<u>Figure 5</u> : L'inactivité physique favorise le stockage du tissu adipeux, le développement de la résistance à l'insuline, l'athérosclérose, la dépression, les maladies dégénératives et le développement des tumeurs <i>Pedersen (2009)</i>	33
<u>Figure 6</u> : Structure du Peroxisome Proliferator Activated Receptor (Glass et al, 2006).	37
<u>Figure 7</u> : Activités transcriptionnelles du PPAR (Ricote et Glass, 2007).....	38
<u>Figure 8</u> : Cibles cellulaires et moléculaires anti-inflammatoires du PPAR (Straus et al, 2007).	42

TABLE DES ILLUSTRATIONS	1
RÉSUMÉ.....	5
ABSTRACT	6
REMERCIEMENTS.....	7
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	9
INTRODUCTION GÉNÉRALE	12
PARTIE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	14
1. LES MALADIES CARDIOVASCULAIRES.	15
2. L'ATHÉROSCLÉROSE	16
2.1 Définition.	16
2.2 Description anatomique des lésions athéromateuses.	17
2.3 Physiopathologie de l'athérosclérose.	17
2.3.1 Pénétration et accumulation de lipoprotéines dans l'espace sous endothélial.	17
2.3.2 Recrutement de monocytes circulants et la formation de cellules spumeuses.	17
3. ÉVOLUTION DES LÉSIONS ATHÉROMATEUSES.	18
3.1 Progression des lésions athéromateuses.	18
3.2 Rupture de lésions athéromateuses.	19
3.2.1 Facteurs de ruptures d'une plaque d'athérosclérose.	19
4. L'ATHÉROSCLÉROSE UNE PATHOLOGIE IMMUNO-INFLAMMATOIRE.	21
4.1 Le rôle des lymphocytes dans l'athérosclérose.	21
4.2 Le rôle des monocytes, macrophages dans l'inflammation et l'athérosclérose.	22
4.2.1 Les monocytes/macrophages, une population hétérogène.	22
4.3 L'activation hétérogène des macrophages.....	23
4.3.1 L'activation classique des macrophages.	24
4.3.2 L'activation alternative des macrophages.	25
4.3.3 M1/M2 Balance inflammatoires et Athérosclérose.	26
5. LES FACTEURS DE RISQUES DE L'ATHÉROSCLÉROSE.....	27
5.1 Les dyslipidémies, l'obésité, le diabète.	27

5.2	<i>Le tabac</i>	29
5.3	<i>L'hypertension et le système Rénine –Angiotensine</i>	31
5.4	<i>L'inactivité physique</i>	32
6.	LES MOYENS DE LUTTE CLASSIQUES POUR LUTTER CONTRE LES MALADIES CARDIO-VASCULAIRES :	34
6.1	<i>Les stratégies médicamenteuses</i>	34
6.2	<i>Le rôle des récepteurs nucléaires dans l'athérosclérose</i>	36
6.3	<i>Structure et mode d'action du PPAR</i>	36
6.3.1	L'activation des gènes cibles	37
6.3.2	La répression des gènes cibles	38
6.4	<i>La biologie des PPAR</i>	39
6.5	<i>Le rôle du PPAR-γ dans l'inflammation: désactivation des M1 et formation des M2</i>	43
7.	L'EXERCICE PHYSIQUE PRÉVIENT LE DÉVELOPPEMENT DE L'ATHÉROSCLÉROSE	44
7.1	<i>L'Exercice physique prévient et réduit les facteurs de risques</i>	44
7.2	<i>L'exercice physique prévient le processus athéromateux</i>	45
7.2.1	L'exercice physique réduit la progression des lésions athéromateuses	45
7.2.2	L'exercice physique stabilise les lésions athéromateuses	46
7.3	<i>Les effets anti-inflammatoires de l'exercice physique</i>	47
	OBJECTIFS EXPÉRIMENTAUX	49
	OBJECTIFS GÉNÉRAUX :	49
	DESCRIPTION DU MODÈLE EXPÉRIMENTAL LA SOURIS APOE ^{-/-} :	50
	PARTIE 2 : TRAVAUX DE RECHERCHE	53
	PREMIERE PARTIE :	54
	Swim Training Reduces Atherosclerosis Lesions in Apolipoprotein E Deficient Mice (ApoE ^{-/-}) Through Increase PPAR-γ Expression and Anti-Inflammatory Effects.	54
	BUT DE L'ÉTUDE :	55
	MÉTHODE :	55
	RÉSULTATS PRINCIPAUX ET CONCLUSION :	56
	DEUXIEME PARTIE :	78

Type of exercise training differently influences atherosclerosis progression and inflammatory markers in a mouse model of advanced atherosclerosis.....	78
BUT DE L'ÉTUDE :	79
MÉTHODE :	79
RÉSULTATS PRINCIPAUX ET CONCLUSION :	81
PARTIE 3 : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	106
BIBLIOGRAPHIE.....	115
ANNEXE	128

RÉSUMÉ

L'athérosclérose est un processus inflammatoire chronique à l'origine des accidents cardiovasculaires qui constitue l'une des premières causes de mortalité en France. L'inflammation est le facteur essentiel dans l'initiation, la progression et l'instabilité des lésions athéromateuses à l'origine des accidents aigus. Les données récentes suggèrent que l'activation des récepteurs nucléaires PPAR (Peroxisome-Proliferator Activated Receptor) par des ligands pharmacologiques prévient le développement et la progression de l'athérosclérose et diminue de manière importante la mortalité cardiovasculaire. À côté de ces traitements pharmacologiques, l'exercice physique prévient aussi la mortalité cardiovasculaire de manière significative.

L'objectif de notre premier travail a été d'explorer les effets de l'exercice physique de natation, sur le développement des lésions athéromateuses d'une part et d'autre part, sur l'expression des récepteurs nucléaires PPAR. **Nos résultats montrent que l'exercice physique de natation diminue la progression de l'athérosclérose et stimule l'expression des PPAR-γ vasculaires. De manière intéressante, lorsque le PPAR-γ est inhibé avec l'antagoniste BADGE, les effets antiathérogènes de l'exercice physique sont abolis.**

L'hypertension est à l'origine des complications graves telles que la rupture de plaque d'athérosclérose. L'objectif de notre deuxième travail a été d'explorer l'implication des PPAR dans la progression et la stabilité des lésions athéromateuses chez des souris ApoE^{-/-} hypercholestérolemiques et hypertendues (2K1C), soumises à des exercices physiques (volontaire ou imposé) ou traités avec le telmisartan, un antihypertenseur. **Nos résultats montrent que l'exercice physique possède différents mécanismes protecteurs.** De manière similaire, l'exercice physique favorise la stabilité de lésions athéromateuses de manière comparable au traitement pharmacologique. De plus, nos résultats montrent que les souris traitées avec l'exercice imposé ou le telmisartan présentent un mécanisme comparable qui permet de réduire significativement l'expression des cytokines pro-inflammatoires et d'activer les PPAR-γ vasculaires. L'exercice volontaire favorise l'expression des marqueurs des macrophages alternatifs M2 et des cytokines anti-inflammatoires (CD 206, IL-1Ra). L'exercice volontaire diminue significativement l'extension des lésions athéromateuses de manière comparable au telmisartan. **Ces résultats montrent que l'exercice physique volontaire et l'exercice physique imposé ont deux mécanismes d'actions distincts.** De plus, la surexpression des M2 en réponse à l'exercice volontaire modifie la balance inflammatoire en faveur des M2. **Ce renversement de la balance au profit des macrophages alternatifs M2 est significativement corrélé à la diminution de la progression des lésions athéromateuses.**

Les exercices imposé et volontaire possèdent des mécanismes d'action distincts. L'exercice soumis diminue l'expression des cytokines pro-inflammatoires tandis que l'exercice volontaire augmente l'expression des cytokines anti-inflammatoires et favorise un phénotype anti-inflammatoire des macrophages M2 qui s'accompagne d'une réduction des lésions athéromateuses.

Mots Clés : Exercice physique, Athérosclérose, Inflammation, PPAR, ApoE^{-/-}

ABSTRACT

Atherosclerosis is a complex inflammatory process, leading cause of morbidity and mortality in France. Inflammation is essential in initiation, progression and atherosclerosis plaque destabilization leading to acute cardiovascular events. Recent studies suggest that pharmacological PPAR activation prevents ATH development and progression and decreased cardiovascular mortality. Compared to pharmacological treatment, physical exercise also significantly prevents cardiovascular mortality.

The aim of the first study was to investigate the influence of physical exercise on ATS development and PPAR expression in arterial wall. Our results had shown that physical exercise decrease ATH progression and increase PPAR- γ expression in arterial wall. Interestingly, PPAR- γ inhibition with BADGE, a PPAR- γ antagonist abolishes these antiatherogenic effects.

Hypertension increase ATH complication such as plaque rupture. The aim of the second study were to investigate PPAR- γ implication in progression and stabilization of ATH lesions in hypercholesterolemic and hypertensive ApoE^{-/-} mice (2K1C) submitted to different exercises (voluntary wheel running and submitted treadmill running) or treated with telmisartan an anti-hypertensive drug. Our results shown that, physical exercise prevents ATS cardiovascular events by several mechanisms. Similarly to telmisartan, physical exercises stabilize ATH lesion. Moreover results shown that, submitted exercise and telmisartan have an comparable mechanism. In fact, they significantly decrease pro-inflammatory cytokines expression and in the same time activated PPAR- γ expression in arterial wall. Contrary to submitted exercise, voluntary exercises increases expression of anti-inflammatory cytokines IL-1ra and increase M2 marker CD206. These results suggest that voluntary and submitted exercise have two different mechanism of action. Moreover, M2 surexpression in response to voluntary exercise shift the inflammatory balance in favor to M2. Further, this change of balance in favor to M2, is significantly correlated to decrease of ATH progression. Voluntary exercises significantly decreases ATH progression in the same levels like telmisartan treatment.

Voluntary and submitted exercise has two different mechanisms, submitted exercise decrease pro-inflammatory cytokines expression whereas voluntary exercise increase anti-inflammatory cytokines expression and promote an anti-inflammatory phenotype of macrophages M2. The shift of M1/M2 balance towards M2 decreases atherosclerosis progression.

Mots Clés : Physical exercise, Atherosclerosis, Inflammation, PPAR, ApoE^{-/-}

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au sein de deux équipes de recherches dans le cadre d'une cotutelle de thèse entre l'Université de Franche-Comté et L'Université de Lausanne. La première partie de ce travail a été dirigée par le Professeur Alain Berthelot au sein du laboratoire des « Sciences Séparatives Biologiques et Pharmaceutiques » de Besançon. La deuxième partie de ce travail a été réalisée sous la direction de Professeur Lucia Mazzolai et du Professeur Jürg Nussberger au sein du Service d'Angiologie, Département de médecine Interne au Centre Hospitalier Universitaire Vaudois.

Je tiens tout d'abord à remercier le Pr Alain Berthelot pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et m'avoir permis de mener à bien ce travail. Merci Monsieur Berthelot d'avoir accepté d'être mon directeur de thèse, merci pour votre disponibilité et vos réponses aux mails plus rapides que l'éclair.

Ensuite, je souhaite remercier le Pr Jürg Nussberger et le Pr Lucia Mazzolai de m'avoir accueilli à Lausanne afin d'avoir l'opportunité de faire une cotutelle. Merci également pour le financement que vous m'aviez octroyé pour réaliser cette thèse.

Je remercie bien évidemment les membres du jury ainsi que les rapporteurs qui ont accepté de juger ce travail et pris de leurs temps si précieux : le Professeur Jean-Christophe Gris, le Professeur Daniel Hayoz.

Je souhaite remercier plus particulièrement le Pr Pascal Laurant d'avoir codirigé cette thèse. Merci pour votre disponibilité et l'autonomie que vous m'aviez accordée. Merci d'avoir fait partie de ces socles sur lesquels on peut s'appuyer quand rien ne va, merci pour votre humour et les échanges scientifiques de grande qualité. J'ai beaucoup appris à vos côtés et j'ai eu énormément de plaisir à travailler avec vous.

Je voudrais remercier le Dr Carole-Miguet Alfonsi de m'avoir guidée lors de mes premiers pas dans le monde de la recherche. Merci pour ton apprentissage, tes conseils, et surtout pour l'autonomie et la confiance que tu m'as accordée. Merci Carole, maintenant je suis devenue une pro de la biologie cellulaire et moléculaire.

Je tiens à remercier tous les membres et anciens membres du laboratoire 2SBP et du Service d'Angiologie : Sonia, Sylvie, Céline, Maude, Manu, Isabelle, Faycal, Hervé, Magalie, Teddy (et ma cops la Steph!). Jean-François (merci pour le travail sur les souris). Karima (merci pour ces moments passés à réfléchir et à mettre au point, et le tout dans la bonne humeur) et toutes les personnes qui ont participé à ce travail (Dominique et Chantal).

Je tiens à remercier mes copains: les Boys and Girl : Kink, Mary, Gégé, Mika. Merci pour votre bonne humeur et les petites soirées qui font beaucoup de bien lorsqu'on fait une thèse.

Je tiens à remercier ma famille, un grand merci à mes parents de m'avoir soutenue pendant toutes mes études, merci de m'avoir encouragé et d'avoir été là lorsque j'avais besoin de vous. A ma sœur Joanna, au petit Mateo et son papa Mika. Merci.

Je voudrais remercier celui qui a toujours été à mes côtés, qui m'a supportée et encouragée pendant mon doctorat et qui aujourd'hui est devenue mon mari. Je n'ai pas besoin de le nommer, il se reconnaîtra. Je te remercie pour ta patience, ton dévouement et ton amour. Cette thèse je n'aurais sûrement pas pu l'achever sans toi ou en tout cas pas dans les mêmes conditions alors je te remercie d'avoir pris soin de moi, de nous.

À notre fils Kimaël qui est venu illuminer notre vie.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

2K1C: Souris Two Kidney One Clip

AP-1: Activator Protein -1

ApoE^{-/-}: Souris invalidées par recombinaison homologue pour le gène de l'ApoE

ApoAI: Apolipoprotéine AI

ApoAII: Apolipoprotéine AII

Ang II: Angiotensine II

ARNm: ARN messenger

ATH: Athérosclérose

AVC: Accident vasculaire cérébral

BW: Body Weight

CCR2: Chemokine receptor 2

CD11c: Integrin CD11c

CD206: Macrophage Mannose receptor

CD36: Cluster of differentiation 36

CD68: Cluster of differentiation 68

CML: Cellules musculaires lisses

CRP: C-Reactive protein

DBP: Diastolic Blood Pressure

ET-1: Endothéline 1

HDL: High density lipoprotein

HDL-c: HDL cholestérol

HMGCoA: Hydroxy méthyl glutaryl coenzyme A

HR: Heart Rate

HTA: Hypertension artérielle

HUVEC: Humain Umbilical Endothelial Cells

ICAM: Intracellular Adhesion Molecule

IDM: Infarctus du myocarde

IEC: Inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensie

IFN- γ : Interféron gamma

I κ B: Inhibitory kappa-B proteine

IL: Interleukine

IL-1B: Interleukine 1 Beta

IL-1Ra: IL-1 Receptor antagonist

IMC: Index de masse corporelle

IMT: Intima Media Thickness

LDL: Low density lipoprotein

LDL-c: LDL cholesterol

LDL-ox: LDL oxydées

LPL: Lipoprotein Lipase

LPS: Lipopolysacharides

M1: Classically Activated Macrophage

M2: Alternatively Activated Macrophages

MAC-2: Macrophage galactose-specific lectin-2

MMP: Matrix metalloproteinase

NCoR: Nuclear receptor co-repressor

NFκB: Nuclear factor κB (Facteur de transcription)

NO: Monoxyde d'azote

OMS: Organisation mondiale de la santé

PPAR: Peroxisome Proliferator Activated Recepteur

PPRE: Peroxisome Proliferaor Response Element

PRC: Concentration en rénine plasmatique

SBP: Systolic Blood Pressure

SCID: Severe combined immunodeficiency

SHR: Spontaneous hypertensive Rat

SR-A: Scavenger recptor de type A

SRA: Système Renine Angiotensine

STAT: Signal Transducer and Activators of Transcription

TC: Total cholesterol

Th1: T helper cells 1

Th17: T helper cells 17

Th2: T helper cells 2

TLR: Toll like Receptor

TNF-α: Tumor Necrosis factor-α

VCAM: Vascular Cellular Adhesion Molecule

VLDL: Very Low Density Lipoprotein

INTRODUCTION GÉNÉRALE

L'athérosclérose est une pathologie inflammatoire chronique à l'origine des accidents cardiovasculaires majeurs, qui constitue la première cause de mortalité en France.

Diminuer la morbidité et la mortalité liées à cette pathologie représente un enjeu important en termes de santé publique. L'activité physique fait partie de ces moyens de prévention et de traitements. En effet, des études expérimentales ont permis de mettre en évidence les effets bénéfiques de l'exercice physique sur la progression de l'athérosclérose (Pellegrin *et al*, 2007). Les études cliniques confirment et montrent que l'exercice physique diminue les accidents cardiovasculaires de 31% (Jolliffe *et al*, 2001) et diminue considérablement la progression des lésions athéromateuses (Nordstorm *et al*, 2003). Au-delà de son effet antiathérogène, l'exercice physique, au même titre qu'un traitement pharmacologique, possède un véritable effet anti-inflammatoire. L'exercice physique diminue de manière significative la CRP et les cytokines pro-inflammatoires plasmatiques. Si le rôle bénéfique de l'exercice physique dans la prévention et le traitement de l'athérosclérose est bien établi à l'heure actuelle, les mécanismes impliqués dans cette protection restent inconnus.

Les données récentes suggèrent la participation des récepteurs nucléaires PPAR (Peroxisome-Proliferator Activated Receptor) dans le développement et la progression de l'athérosclérose, ceci par répression des voies pro-inflammatoires protectrices vis-à-vis de l'athérosclérose (Barbier *et al*, 2002). En effet, des études expérimentales et cliniques montrent que l'activation des PPAR par un traitement pharmacologique diminue la progression de l'athérosclérose et diminue l'inflammation associée. D'un point de vue global, les bénéfices de l'exercice physique et des traitements pharmacologiques sur la prévention du risque cardiovasculaire et la progression des lésions athéromateuses sont comparables.

L'objectif principal de notre projet d'étude est donc de démontrer que l'activité physique au même titre que le traitement pharmacologique stimule l'expression des PPAR au niveau du tissu vasculaire et que cette modulation engendre les effets antiathérogènes majeurs.

PARTIE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. LES MALADIES CARDIOVASCULAIRES.

Les maladies cardiovasculaires constituent la première cause de mortalité dans le monde. Elles sont responsables chaque année du décès de 17 millions de personnes, soit 30 % de la mortalité dans le monde, selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS). Les maladies cardiovasculaires (MCV) représentent un ensemble de troubles du cœur et des vaisseaux sanguins. Elles sont la conséquence d'une ischémie ou insuffisance d'apport sanguin à l'organe irrigué par l'artère obstruée, causée par l'Athérosclérose.

Tous les organes peuvent être atteints par une ischémie, mais les trois cibles principales sont :

Le muscle cardiaque (myocarde) par l'obstruction des artères coronaires. La manifestation la plus commune est la maladie coronaire ou *ischémie du myocarde*. L'athérosclérose coronaire se manifeste par une angine de poitrine (douleur vive, en étai, du thorax, irradiant parfois vers le bras gauche ou vers la mâchoire). Elle se traduit par une insuffisance temporaire de l'apport de sang au myocarde, typiquement à l'occasion d'un effort physique, mais parfois aussi spontanément en dehors de tout effort. Elle se traduit aussi par un accident aigu, quand une partie du myocarde est brutalement privée de tout apport sanguin, ce qui provoque un infarctus du myocarde (mort ou nécrose du muscle), ou parfois un décès subit.

Le cerveau, par l'obstruction des artères cérébrales. L'*ischémie cérébrale* se manifeste par des attaques (ictus, apoplexie), souvent une paralysie d'une moitié du corps (hémiplegie) qui peut être durable ou transitoire suite à une obstruction des artères carotides ou vertébrales au niveau du cou, et leurs branches dans le crâne. L'obstruction des artères cérébrales est plus communément appelée « accident vasculaire cérébral ».

Les membres inférieurs : L'ischémie des membres inférieurs provoque une douleur musculaire à la marche (claudication intermittente) et peut, quand elle est sévère, déterminer la survenue de gangrènes du pied.

L'ischémie du myocarde (Infarctus du myocarde) et les accidents vasculaires cérébraux (AVC) représentent la majeure partie des accidents cardiovasculaires. En effet, sur **17 millions de décès, environ 7,2 millions sont liés à une ischémie du myocarde et 5,7 millions à des accidents vasculaires cérébraux (OMS).**

2. L'ATHEROSCLEROSE

2.1 Définition.

L'athérosclérose est la responsable majeure des accidents cardiovasculaires. L'athérosclérose est un processus pathologique immuno-inflammatoire des artères à localisation intinale, caractérisé par des dépôts de lipides et d'éléments fibreux et le développement d'une réaction inflammatoire dans la paroi des artères, obstruant au fur et à mesure la lumière artérielle (Ross et al, 1999 ; Hansson et al, 2011, Libby et al, 2011). L'agent d'agression entraînant la réaction inflammatoire est le LDL-cholestérol. Schématiquement, la plaque d'athérosclérose évolue en plusieurs stades: des stries lipidiques, des lésions intermédiaires et des lésions compliquées (Virmani et al, 2000).

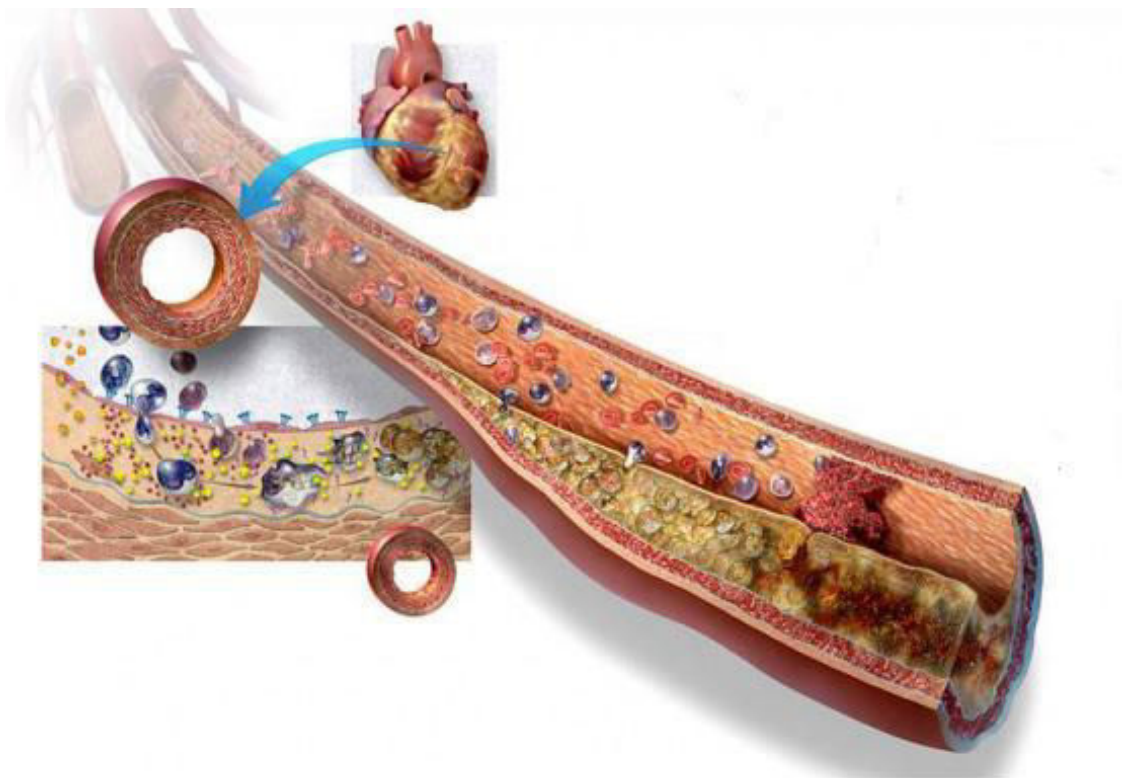


Figure 1: Progression schématique de l'athérosclérose.

2.2 Description anatomique des lésions athéromateuses.

La plaque d'athérosclérose adulte se développe au niveau de la paroi interne des artères. Une artère est constituée de trois tuniques la tunique interne (l'intima), la tunique intermédiaire (la média) et la tunique externe (l'adventice). Les lésions athéromateuses se développent au niveau de l'intima. Elles se caractérisent par la formation d'un cœur lipidique et d'une chape fibromusculaire qui « isole » le cœur lipidique de la lumière artérielle.

Le cœur lipidique est composé des cholestérols apportés par les lipoprotéines à faible densité (LDL), des cellules circulantes et des cellules de l'immunité (macrophages 61 % Lymphocytes T 10 %) (Jonasson et al, 1986). La chape fibreuse est composée, quant à elle, de cellules musculaires lisses (environ 60 %) et de protéines de la matrice extracellulaire (collagène, élastine, protéoglycanes) qui assurent la stabilité des lésions athéromateuses.

2.3 Physiopathologie de l'athérosclérose.

2.3.1 Pénétration et accumulation de lipoprotéines dans l'espace sous endothélial.

Le point de départ de l'athérosclérose est représenté par le passage au travers de l'endothélium, de particules de LDL riches en cholestérol, et par leur accumulation au niveau sous-endothélial (Tedgui et al, 2003). Après leur pénétration, les LDL subissent une oxydation. Cette transformation est une étape majeure dans la formation et le développement de la plaque. Du fait de cette oxydation, les LDL-ox perdent leurs aptitudes à se lier à leurs récepteurs (qui constituent la principale voie d'épuration des LDL. Ces LDL-ox vont, non seulement s'accumuler au niveau des lésions athéromateuses et former ce qu'on appelle les « stries lipidiques », mais elles vont, en plus, stimuler l'inflammation par l'expression des facteurs d'adhésion au niveau des cellules endothéliales, permettant l'attraction des monocytes et des lymphocytes circulants, et leur passage dans le sous-endothélium (Kannel, 1998).

2.3.2 Recrutement de monocytes circulants et la formation de cellules spumeuses.

Une fois les LDL-ox séquestrées dans l'intima, elles vont sécréter les facteurs d'adhésion (VCAM-1, ICAM-1 et MCP-1) favorisant l'attraction des monocytes circulant à la surface de l'endothélium (Libby et al, 2010). Les monocytes circulants vont alors s'immobiliser à la surface de l'endothélium, la traverser

puis se transformer en macrophages. Les macrophages captent les LDL oxydées par l'intermédiaire de récepteurs (SR-AI, CD-36, CD68) et se transforment en « cellules spumeuses ». Les cellules spumeuses sont à l'origine de la formation du cœur lipidique de la lésion, et entretiendront aussi la réaction inflammatoire (Ross *et al*, 1999). Les macrophages et les lymphocytes infiltrés dans la paroi artérielle, vont sécrétés, par une activité paracrine, des cytokines pro-inflammatoires telles que IL-1 β (*Interleukin 1- β*), TNF- α (*tumor-necrosis factor- α*), IL-8, IL-12, IFN- γ (*Interféron gamma*). La libération de ces molécules amplifie l'effet des LDL-ox, en favorisant l'expression des VCAM-1 et MCP-1 dans les cellules endothéliales. En outre, ces cytokines pérennisent l'inflammation et entretiennent le processus athérogène, en favorisant le recrutement de leucocytes sur le site inflammatoire par la stimulation de MCP-1. Les cytokines pro-inflammatoires peuvent, par ailleurs, déstabiliser les lésions athéromateuses. En effet, les cytokines pro-inflammatoires modulent l'activité des Cellules musculaires lisses (CML). La production du collagène de type I et III par les CML, est inhibée par IFN- γ (Whitman et al, 2002), tandis que IL-1 β et TNF- α induisent la libération des métalloprotéinases (MMP-2 et MMP-9), capables de dégrader la matrice extracellulaire (MEC), fragilisant ainsi la plaque.

3. ÉVOLUTION DES LÉSIONS ATHEROMATEUSES.

3.1 Progression des lésions athéromateuses.

Les lésions athéromateuses évoluent de manière lente sur de nombreuses années. La progression de la plaque athéromateuse vers la sténose est un phénomène très lent. Les deux composants de la plaque adulte, le centre lipidique et la chape fibreuse contribuent à la sténose, du fait de l'infiltration lipidique, de l'accumulation de cellules spumeuses et de la prolifération de cellules musculaires lisses avec une synthèse de matrice extracellulaire. Dans un premier temps, la plaque se développe de manière silencieuse sans altérer le calibre vasculaire : c'est un processus d'adaptation des vaisseaux appelé remodelage vasculaire. Cependant, lorsque la masse intimale de la lésion excède 40 % de la surface totale de la paroi, le remodelage excentrique de la paroi n'est plus suffisant, son développement se fait au dépens de la lumière artérielle et conduit à son obstruction progressive (Duriez et al, 2004 ; Glagov et al, 1987). Une lésion d'athérosclérose obstruant de manière importante la lumière artérielle entraîne des manifestations douloureuses telles que l'angine de poitrine. Cependant, ce qui fait le danger

des lésions athéromateuses n'est pas tant la taille que les complications possibles, telles que les hémorragies ou l'obstruction de l'artère due à l'érosion ou la rupture de plaque.

3.2 Rupture de lésions athéromateuses.

En effet, dans certains cas, les segments athéromateux ne vont pas évoluer vers la sténose, mais au contraire dans certaines conditions et en fonction de leurs localisations, les lésions athéromateuses vont se rompre et entraîner des complications graves (Davies *et al*, 1996). Les mécanismes physiopathologiques mis en jeu ne sont pas encore élucidés, mais on sait que le développement des anévrismes nécessite une destruction et une désorganisation de la chape fibreuse et plus particulièrement des éléments structuraux de la matrice extracellulaire et des fibres d'élastine. Ces structures très résistantes peuvent être dégradées par les MMP, à forte activité protéolytique. La rupture ou l'érosion se situe au niveau de la chape fibreuse et met en contact le sang avec les éléments thrombogènes du centre lipidique. La conséquence en est une thrombose (implication des plaquettes puis du système de la coagulation). La rupture de plaque est l'élément le mieux caractérisé pouvant conduire aux accidents aigus.

3.2.1 Facteurs de ruptures d'une plaque d'athérosclérose.

Il existe des facteurs extrinsèques pouvant expliquer une rupture de plaque : par exemple, poussée hypertensive, le stress ou un effort important. Ils augmentent les contraintes exercées sur la plaque d'athérosclérose et peuvent favoriser la survenue d'accidents. Cependant, les facteurs intrinsèques (taille du noyau lipidique, la composition en CML et la réponse inflammatoire qui règne au sein de la plaque) sont toutefois les plus importants. Ils dépendent de la structure de la plaque et représentent la vulnérabilité de la plaque. D'un point de vue structural, l'indicateur de vulnérabilité d'une plaque athéromateuse est sa composition relative en lipides, en tissu fibreux et cellules inflammatoires (Naghavi *et al*, 2003). Des études cliniques récentes ont montré que les lésions dites vulnérables présentent un noyau lipidique large 30 à 40 % du total de la plaque, une chape fibreuse fine avec une faible composition en CML ainsi qu'une accumulation importante en cellules inflammatoires (Naghavi *et al*, 2003). Une chape fibreuse fine est une caractéristique majeure des lésions vulnérables (Kolodgie *et al*, 2001).

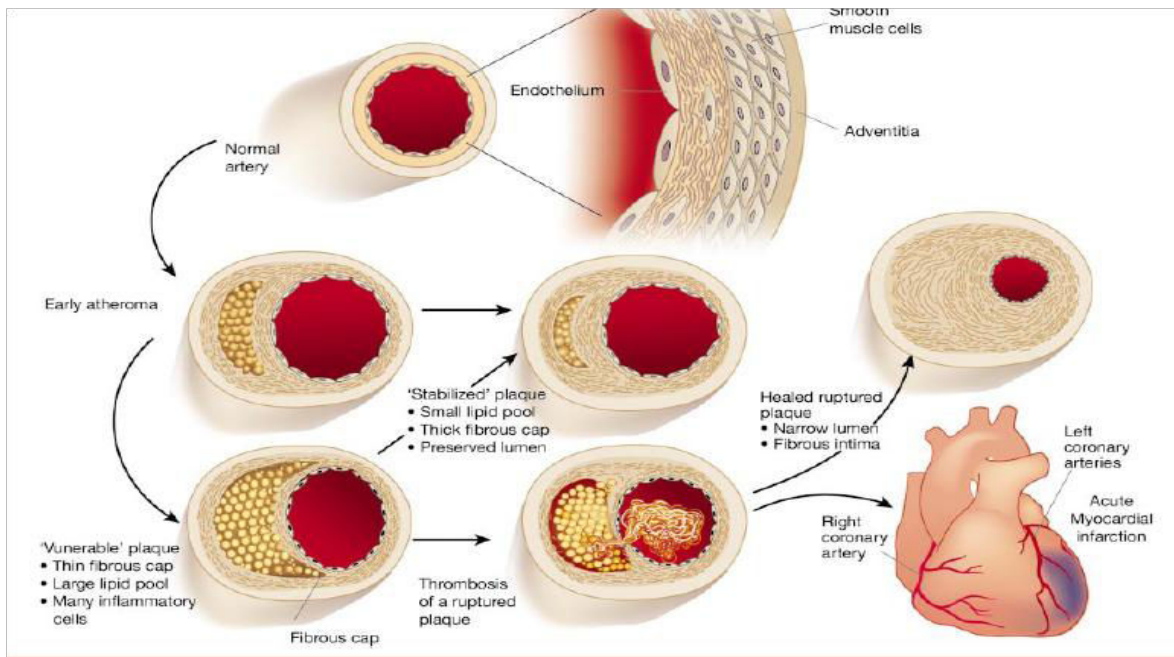


Figure 2: Caractéristiques d'une plaque stable et instable (Libby et al, 2002).

Par ailleurs, l'inflammation locale, due à l'accumulation des macrophages activés et des lymphocytes T, jouent un rôle important dans l'instabilité des lésions athéromateuses. En effet, les macrophages activés sécrètent des MMP (Boyle et al, 2005), capables de dégrader la matrice extracellulaire. De même, IFN- γ inhibe la synthèse de collagène par les CML et peut ainsi contribuer à diminuer la résistance de la chape fibreuse et favoriser la rupture de plaque (Gupta *et al*, 1997 ; Amento *et al*, 1991). Chez l'homme, les cellules inflammatoires sont beaucoup plus importantes chez les patients symptomatiques que chez les patients asymptomatiques, ce qui confirme le rôle délétère de l'inflammation dans la vulnérabilité des lésions athéromateuses (Van Der Wall et al, 1994). Les auteurs s'accordent à dire, finalement, que l'activité des cytokines pro-inflammatoires telles que IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , est surexprimée dans les lésions vulnérables. Ceci est la démonstration que le niveau inflammatoire local influence la stabilité des lésions athéromateuses (Shah et al, 2007).

Des études récentes suggèrent, par ailleurs, que l'inflammation systémique joue un rôle important dans la déstabilisation de lésions athéromateuses et représente un facteur de risque important dans la survenue d'accidents ischémiques (Libby et al, 2002 ; Maseri et al, 1997). En effet une concentration importante en CRP plasmatique est significativement associée avec la progression des lésions athéroma-

teuses et l'instabilité de la plaque chez les patients athéromateux (Schillinger et al, 2005 ; Schlager et al, 2007).

Les plaques les moins vulnérables, c'est-à-dire celles qui ont un risque faible d'évoluer vers un accident aigu, ont généralement un centre lipidique de petite taille isolé de la lumière artérielle par une épaisse chape fibreuse. Les lésions dites « stables » sont aussi peu inflammatoires (Van Der Wall et al, 1994 ; Naghavi et al, 2003).

4. L'ATHEROSCLEROSE UNE PATHOLOGIE IMMUNO-INFLAMMATOIRE.

4.1 Le rôle des lymphocytes dans l'athérosclérose.

Les études expérimentales les plus récentes, faites sur des plaques d'athérosclérose, permettent d'affirmer que l'athérosclérose est une maladie immuno-inflammatoire. L'analyse des lésions athéromateuses révèle la présence de différents types cellulaires impliqués dans le développement et la pérennisation de l'inflammation : on y trouve notamment des lymphocytes T, B, des cellules dendritiques, des mastocytes et des macrophages (Weber et al, 2008). Jonasson et al, dès 1986, montrent cependant que les macrophages et les lymphocytes T sont les cellules majoritairement exprimées, avec un pourcentage d'expression de 60 % et 10 % respectivement. Les lymphocytes T, se différencient en deux sous-types de lymphocytes, Th1 et Th2, caractérisés par un profil anti- ou pro-inflammatoire des cytokines qu'ils produisent. Les lymphocytes Th1 sont de façon prépondérante, des lymphocytes T CD4⁺. Les lymphocytes Th1 se distinguent des Th2 par une sécrétion des cytokines pro-inflammatoires : IL-2, IFN- γ , TNF- α . À l'inverse, les lymphocytes Th2 ne sont pas pathogènes, ils se distinguent par la sécrétion majoritairement de cytokines anti-inflammatoires : IL10, IL4, IL13. Le rôle des Th1 dans la progression de l'athérosclérose a notamment été démontré chez la souris ApoE^{-/-} immunodéprimée. En effet, chez la souris ApoE^{-/-}/Rag-1 (immunodéprimée pour les cellules B et T et alimentée avec un régime gras), les lésions athéromateuses sont deux fois moins développées que chez la souris ApoE^{-/-} (Dansky et al, 1997). D'autres études montrent des données similaires chez la souris ApoE^{-/-}/SCID (Severe Combined Immunodeficiency). Une déficience pour les lymphocytes B et T conduit à une réduction importante des lésions athéromateuses. Par ailleurs, une reconstitution des cellules T CD4⁺ dérivées de la souris ApoE^{-/-} à la souris ApoE^{-/-}/SCID renverse cette protection et augmente les lésions athéromateuses de +164%

(Zhou et al, 2000). Le transfert de cellules T favorise leur infiltration au niveau des lésions athéromateuses et augmente la sécrétion d'IFN- γ . L'IFN- γ sécrétée par les lymphocytes T engendre des effets proathérogènes majeurs, puisque chez la souris ApoE^{-/-} infusée avec IFN- γ , on remarque une accélération de lésions athéromateuses (Whitman et al, 2000). L'implication de l'IFN- γ dans la progression des lésions athéromateuses a été mise en évidence dans d'autres études (Gupta et al, 1997 ; Whitmann et al, 2002). Par ailleurs, le blocage de IFN- γ chez la souris INF- γ R^{-/-}/ApoE^{-/-} montre une réduction dans la progression des lésions athéromateuses et une stabilisation des lésions avec une augmentation du collagène (Koga et al, 2007).

Bien que les lymphocytes interviennent dans l'activité inflammatoire des lésions athéromateuses, les macrophages représentent la majeure partie des cellules infiltrées dans ces lésions, ce qui leur confère une place privilégiée dans le développement de la réaction inflammatoire et la progression de l'athérosclérose. En effet, Moore et al (2011) montrent que l'inflammation est intimement liée au nombre de macrophages infiltrés dans les lésions athéromateuses. Les macrophages infiltrés sécrètent de nombreuses cytokines avec des effets proathérogénèse, mais aussi antiathérogènes (Davies et al, 1993).

4.2 Le rôle des monocytes, macrophages dans l'inflammation et l'athérosclérose.

4.2.1 Les monocytes/macrophages, une population hétérogène.

Les monocytes et macrophages appartiennent au système des phagocytes mononuclés. Ils sont originaires de cellules pluripotentes localisées dans la moelle osseuse qui se différencient successivement en monoblastes, promocytes puis en monocytes. Les monocytes nouvellement formés migrent dès lors dans la circulation sanguine, où ils représentent environ 5 à 10 % des leucocytes sanguins (Cole et al, 2010). Dans les conditions normales, les monocytes ne séjournent que 24 h dans le sang circulant. Chez l'homme et chez l'animal, deux sous-types différents des monocytes et macrophages ont été identifiés en fonction de leur taille, de l'expression des cytokines et de leurs capacités d'adhésion (Woollard et al, 2010). Dans les conditions non pathologiques, les deux sous-types de monocytes /macrophages sont représentés de manière égale au niveau sanguin. Cependant, lors de pathologies telles que l'hypercholestérolémie (Swirski et al, 2007), le diabète (Kanter et al, 2012) l'obésité (Lumeng et al, 2007) et l'athérosclérose (Khallou-Laschet et al, 2010) les monocytes se transforment majoritairement en un

phénotype pro-inflammatoire. Grâce à leurs capacités de diapédèse, les monocytes peuvent franchir la barrière endothéliale des vaisseaux et migrer ensuite dans les tissus où ils vont se différencier en macrophages. Bien que généralement caractérisés par l'expression de marqueurs de surface cellulaire CD68 ou Mac-2, les macrophages constituent une population très hétérogène. Leur état d'activation ainsi que leurs fonctions sont profondément influencés par la présence des cytokines dans l'espace environnant.

4.3 L'activation hétérogène des macrophages.

Les macrophages sont des cellules immunitaires, composantes essentielles des lésions athéromateuses, et sont responsables de la majeure cause des événements cardiovasculaires. Les macrophages jouent un rôle central dans l'initiation, la progression et la vulnérabilité de lésions athéromateuses. Comme les autres cellules du système immunitaire, les macrophages ne sont pas statiques, ils répondent à une multitude de stimuli qu'ils perçoivent de leur environnement et, en conséquence, montre une grande plasticité et hétérogénéité (Stout et al, 2005 ; Khallou-Laschet et al, 2010). Les études récentes montrent que, sous le terme général de macrophage, on trouve une population cellulaire très hétérogène (Geissmann et al, 2003 ; Gordon et al, 2005). En imitant la classification des cellules T, les macrophages ont été classifiés selon une échelle linéaire simplifiée, où les macrophages de type M1 représentent des macrophages activés classiquement et donc pro-inflammatoires tandis que les macrophages de type M2 représentent des macrophages anti-inflammatoires, activés d'une manière alternative.

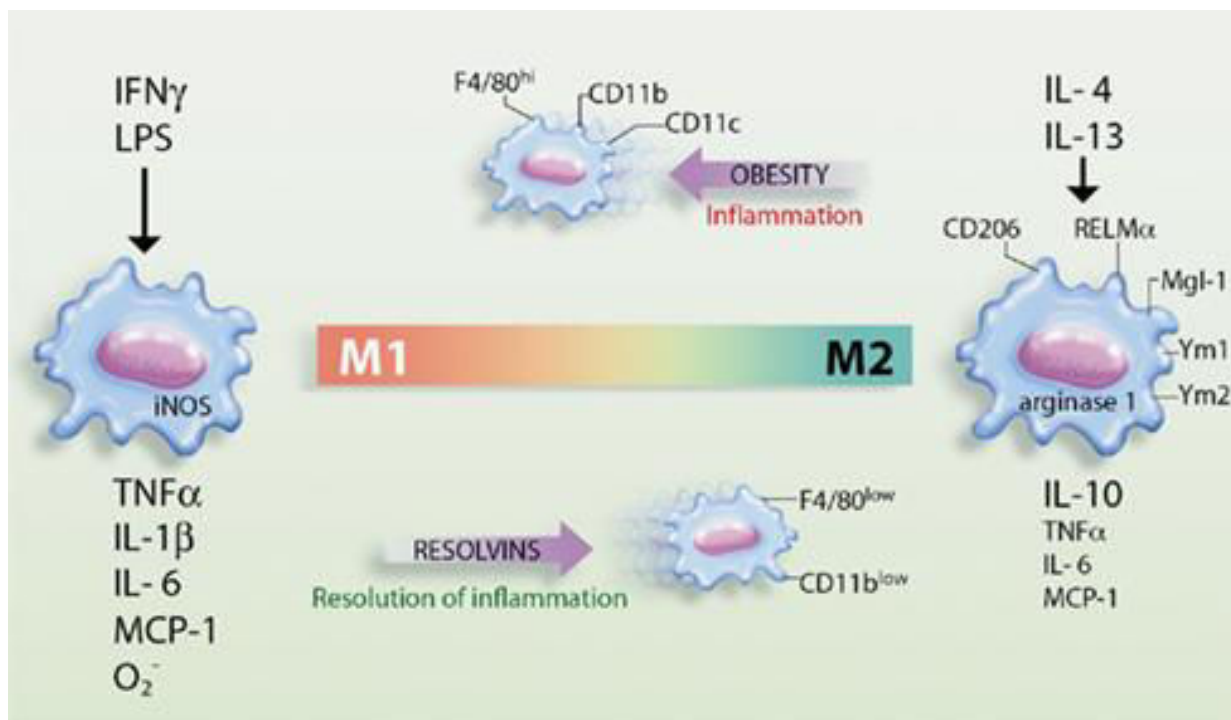


Figure 3: Représentation schématique des macrophages M1 et M2 (Claria et al, 2011)

En réponse à des stimuli microbiens ou inflammatoires, les macrophages expriment des propriétés fonctionnelles différentes et peuvent soit entretenir l'inflammation, soit résorber l'inflammation et réparer les tissus (Tidball et al, 2010 ; Lee et al, 2011). Bien que cette désignation soit trop succincte, puisque les macrophages alternatifs présentent de nombreuses différences biochimiques et biologiques, elle permet néanmoins de définir l'état cellulaire inflammatoire.

4.3.1 L'activation classique des macrophages.

Les macrophages M1, activés classiquement, sont polarisés en réponse à des stimuli bactériens, des lipopolysaccharides (LPS) ou des cytokines pro-inflammatoires (Mantovani et al, 2004). En particulier, IFN- γ et TNF- α de type Th1, induisent un phénotype dit classique des macrophages (M1). Ces macrophages M1 sont des cellules effectrices, à fort pouvoir phagocytaire, qui détruisent les microorganismes, virus et produisent à haut niveau des cytokines et médiateurs pro-inflammatoires tels que TNF- α , IL-6, IL-1 β (Gordon et al, 2003). Une manière efficace de distinguer le phénotype des macrophages est d'identifier le sécrétome (les cytokines et les chimiokines) ou d'identifier les mécanismes cellulaires et

les facteurs de transcriptions associés. L'analyse du sécrétome des M1 montre que les macrophages M1 expriment majoritairement des cytokines pro-inflammatoires TNF- α , IL-1 β (Arnold et al, 2007) et très peu des cytokines anti-inflammatoires. L'activation classique des macrophages dépend du Toll like Receptor (TLR) ligand, qui agit sur le MyD88 en activant la transcription du TNF- α . Le TNF- α peut, à son tour, activé de manière autocrine IFN- γ . Cependant, certains ligands du TLR peuvent activer le domaine TIR et produire IFN- β , qui peut remplacer IFN- γ dans l'activation classique des macrophages.

D'autres cytokines telles que IL-1 β sont également le signe d'une activation classique des macrophages M1. IL-1 β exerce son action inflammatoire après s'être fixé sur son récepteur IL-1R. Cette liaison engendre la production d'un large spectre de cytokines pro-inflammatoires, de chimiokines ainsi que l'expression des molécules d'adhésion. De plus, IL-1 β contribue au développement des dommages vasculaires puisqu'elle favorise l'expression et la sécrétion des enzymes de dégradation cellulaires (MMP) (Tedgui et al, 2006). En analogie avec les lymphocytes T, différents facteurs de transcription et marqueurs de surface cellulaires sont associés avec M1. Il a ainsi été montré que le CD11c est un marqueur de surface des macrophages M1 (Lumeng et al (2007). CD11c est une intégrine exprimée sur la membrane plasmique des monocytes et des macrophages tissulaires. Wu et al (2009) montrent d'une part que le CD11c est bien présent au niveau des lésions athéromateuses. D'autre part, ils montrent que les souris ApoE^{-/-} déficientes en CD11C présentent des lésions plus petites et moins sévères que les souris ApoE^{-/-}/CD11c^{+/+}. Les effets pro-inflammatoires des macrophages CD11c⁺ ont été décrits chez l'homme (Hirata et al, 2011) ainsi que dans différents modèles animaux (Wu et al, 2009 ; Li et al, 2010 ; Lumeng et al, 2007 ; Kawanishi et al, 2010).

4.3.2 L'activation alternative des macrophages.

La découverte récente des macrophages M2 dans les lésions athéroscléreuses humaines démontre, pour la première fois, une population hétérogène de macrophages au sein des plaques d'athérosclérose (Bouhel et al, 2007). Les macrophages alternatifs sont induits par les cytokines de type Th2, tel que IL-4, IL-13 et IL-10. Les macrophages M2 sont des macrophages régulateurs qui tentent de résorber l'inflammation Th1-dépendante, nettoient les débris cellulaires et favorisent la réparation tissulaire. Les macrophages M2 se caractérisent par la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires IL-10, IL-1Ra. IL-10

est une cytokine anti-inflammatoire produite majoritairement par les monocytes et les macrophages. IL-10 inhibe fortement la prolifération des lymphocytes de type Th1. Elle régule négativement de façon autocrine, la synthèse de cytokines pro-inflammatoires TNF- α , IL-12, IL-2 et IFN- γ par les macrophages, inhibe l'activation de Nf- κ B et l'expression de MMP-1 et MMP-9 par les macrophages. IL-10 est, parmi les cytokines Th2, celle qui a le plus puissant effet antiathérogène. Mallat et al (1999) montrent qu'une déficience en IL-10 chez la souris, favorise la formation des lésions athéromateuses par une augmentation de la production de cellules inflammatoires. Caligiuri et al (2003) confirment et montrent qu'une déficience en IL-10 chez la souris ApoE^{-/-}/IL-10^{-/-} engendre l'augmentation des lésions athéromateuses, de LDL, et favorise la survenue de lésions de type vulnérable. Les effets anti-inflammatoires de M2 lui confèrent un rôle antiathérogène majeur (Gordon et al, 2003 ; Mantovani et al, 2004). Les M2 se distinguent fortement par l'expression de protéines transmembranaires spécifiques comme le CD163 et CD206 (connu comme étant le macrophage mannose récepteur (MMR)). Le CD206 est une protéine transmembranaire de 162-175 kDa. Des travaux récents sur la caractérisation des macrophages montrent que le CD206 apparaît comme un marqueur majeur des macrophages M2. Par ailleurs, des études récentes (Bouhel et al, 2007 ; Odegard et al, 2007, Chinetti et al, 2003) montrent que l'activation des macrophages alternatives M2 stimule le facteur de transcription PPAR- γ .

4.3.3 M1/M2 Balance inflammatoires et Athérosclérose.

Dans certaines pathologies, la balance inflammatoire M1/M2 joue un rôle majeur dans la progression de la maladie. Par exemple, dans le cadre de pathologies oncologiques, un déséquilibre en faveur des macrophages M2 favorise la suppression du système inflammatoire et favorise la croissance tumorale (Sica et al, 2008). A contrario, une réponse excessive des macrophages M1 provoque une production excessive de radicaux libres et empêche la réparation et favorise des dommages tissulaires. Dans le cadre des maladies métaboliques, l'obésité engendre une modification du phénotype des macrophages vers un profil inflammatoire. En effet, Lumeng et al (2007) observent une augmentation des macrophages M1 CD11c⁺ et une diminution des M2 chez la souris obèse par rapport à la souris non obèse. D'autres études montrent que la déplétion des marqueurs M1, tels que TNF- α , CD-11c⁺, normalise la sensibilité à l'insuline (Patsouris et al, 2008). Les macrophages sont des cellules plastiques et il a été

montré que, dans certaines conditions, une population de macrophages peut être remplacée par une autre, sous l'influence de stimuli du micro-environnement. Lee et al (2011) montrent, sur un modèle d'ischémie rénale, que les macrophages M1 sont recrutés dans les phases primaires de l'infection, tandis que les macrophages M2 sont détectés plus tardivement, lors de la résolution de l'inflammation et de la réparation tissulaire. Arnold et al (2007) observent un phénomène similaire lors d'une ischémie des membres inférieurs. L'athérosclérose est un processus inflammatoire qui peut être la conséquence non seulement d'une réaction inflammatoire locale, mais aussi le résultat d'une dérégulation de la balance M1/M2.

5. LES FACTEURS DE RISQUES DE L'ATHEROSCLEROSE

Bien que, l'hypercholestérolémie est un facteur déclenchant de l'athérosclérose, d'autres facteurs de risque modifiables sont susceptibles d'accélérer la progression et l'aggravation de la plaque par une exagération de la réponse inflammatoire. Parmi ces facteurs, on peut citer, le diabète, l'obésité, le tabac, l'hypertension et l'inactivité physique.

5.1 Les dyslipidémies, l'obésité, le diabète.

Les anomalies du métabolisme lipidique sont à l'origine des perturbations biologiques avec des conséquences importantes en termes de santé publique. Elles sont, en grande partie, responsables du développement de l'athérosclérose et des accidents cardiovasculaires. Les données épidémiologiques ont montré, de façon constante, que le taux de cholestérol plasmatique élevé représente un risque majeur d'accident cardiovasculaire. Stamler et al (2000) montrent qu'une réduction du LDL-cholestérol s'accompagne d'une augmentation de la longévité. En effet, l'incidence des accidents coronariens est directement liée aux taux de LDL-cholestérol et inversement liée à ceux du HDL-cholestérol (Assmann et al, 2004 ; Gordon et al, 1989). Les lipoprotéines HDL (High Density Lipoprotein) sont impliquées dans le "transport reverse" du cholestérol, permettant la récupération de celui-ci en périphérie et son transport vers les organes chargés de son élimination. L'augmentation du HDL-Cholestérol est donc a priori plutôt protectrice et ceci a bien été démontré dans de nombreuses études épidémiologiques. L'étude REGRESS (Jukema et al, 1995) montre qu'une augmentation du

HDL-Cholestérol de 10 % s'accompagne d'une diminution du risque coronarien de 39 %. Le traitement pharmacologique des dyslipidémies repose essentiellement sur l'utilisation de deux grandes classes de molécules, les statines et les fibrates qui tentent de réduire les dyslipidémies. L'Étude Helsinki Heart Study montre une réduction significative de 34 % des infarctus du myocarde après cinq ans de traitements par gemfibrozil (Frick et al, 1987). Ces deux classes de médicaments agissent sur le bilan lipidique en contrôlant l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme des lipoprotéines.

La surcharge pondérale, l'obésité, est associée à un risque coronarien nettement accru. Ce risque est, en partie, dépendant de l'impact de la surcharge pondérale sur les autres facteurs de risque. Ainsi, plus de 75 % des hypertension sont liées à la surcharge pondérale. De même, la surcharge pondérale favorise l'émergence des dyslipidémies et du diabète. Ainsi, une étude américaine portant sur les hommes de 40 à 65 ans (Rimm et al, 1995), montre que le risque de maladie coronarienne augmente avec l'indice de masse corporelle (IMC). En effet, chez les hommes, le risque relatif de maladie coronarienne passe de 1,72 pour les hommes ayant un IMC entre 25 et 29 ; à 2,61 entre 29 et 33 et à 3,44 pour les obèses avec un IMC > 33 kg/m². Au-delà de la corpulence totale, il semblerait que la répartition de l'adiposité ait un impact important sur le risque cardiovasculaire. L'excès d'adiposité abdominale (répartition de type centrale ou androïde) majore de façon beaucoup plus significative le risque. On peut, en particulier, l'apprécier par le ratio tour de taille/tour de hanche (ou plus simplement le tour de taille). Un ratio supérieur à 0,95 chez l'homme et supérieur à 0,80 chez la femme, constitue un indicateur de risque cardiovasculaire important. En effet, l'excès d'adiposité abdominale est fortement associé à un certain nombre de perturbations faisant partie (à des degrés divers selon les individus) du syndrome métabolique.

Le risque d'accident cardiovasculaire est deux à trois fois plus important chez la personne diabétique. Le diabète est défini par une glycémie à jeun supérieure ou égale à 1,26 g/L. Au-delà, des complications microvasculaires, qui mettent en jeu la qualité de vie, les complications coronariennes sont la première cause de mortalité des diabétiques. L'étude de Haffner et al (1998) montre que le taux de mortalité chez le non-diabétique sans antécédents d'infarctus est de 3,5%. Il progresse à 18% chez le non-diabétique avec antécédents, à 20 % chez le diabétique sans antécédents et il atteint les 45%

chez le diabétique avec antécédents. D'un point de vue physiopathologique, plusieurs paramètres peuvent expliquer le poids important du diabète en tant que facteur de risque : l'hyperglycémie et les facteurs de risques associés. L'hyperglycémie est responsable d'une athérosclérose accélérée, elle augmente le stress oxydatif, la glycation des lipoprotéines, l'agrégation plaquettaire et favorise la thrombose. Bien que l'hyperglycémie joue un rôle important dans le risque cardiovasculaire, on estime que l'augmentation de celui-ci, chez le diabétique de type 2, est provoquée par l'association accrue de facteurs de risque traditionnels, principalement l'HTA, les dyslipidémies et le tabac. En effet, chez le diabétique, les facteurs de risques traditionnels sont plus fréquents et plus graves. En 1998 Laasko et al (1998) montrent que l'HTA, est retrouvée chez 60 % des diabétiques alors que sa fréquence n'est que de 30 % chez les non-diabétiques. Les dyslipidémies jouent également un rôle important dans les complications cardiovasculaires du diabétique. Le profil lipidique est perturbé. On remarque une augmentation des taux sanguins de triglycérides, des VLDL et une diminution des HDL. Ce qui augmente le risque de complications.

5.2 Le tabac

Dans le cadre des maladies coronariennes, le tabac est un facteur de risque essentiel. En effet, l'OMS estime que la cigarette est responsable de 10 % des décès. Il existe dans la fumée du tabac plusieurs milliers de composants qui font du tabac un inducteur de complications de l'athérosclérose (Ambrose et al, 2004). De ce fait, l'OMS place la cigarette comme deuxième facteur de risque cardiovasculaire, derrière l'hypertension artérielle.

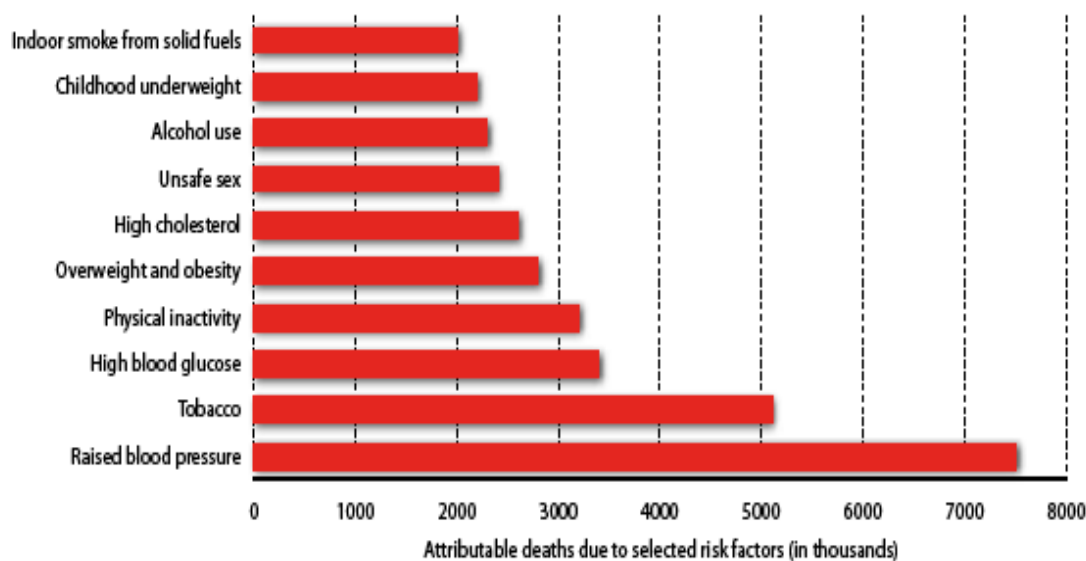


Figure 4: Classement des 10 facteurs de risque cardiovasculaire (OMS).

L'ensemble des données montre que, chez les sujets âgés de 30 à 50 ans, le risque d'infarctus du myocarde est multiplié par cinq chez le sujet fumeur (Johnson et al, 2012). Du point de vue moléculaire, les glycoprotéines libérées par la combustion du tabac et les hydrocarbures sont responsables d'une agression cellulaire endothéliale. Chez l'homme comme chez l'animal, des études ont montré que l'exposition à la fumée des cigarettes est responsable d'une altération de l'endothélium et d'une diminution de la biodisponibilité du NO (monoxyde d'azote) (Mc Veight et al, 1996 ; Mayhan et al, 1996 ; Ota et al, 1997). Par ailleurs, le tabac accentue l'inflammation et favorise l'athérosclérose. La fumée de cigarette augmente de 70 % à 90 %, l'adhésion des monocytes à la surface endothéliale des cellules HUVEC en culture (Kalra et al, 1994) et favorise ainsi l'inflammation. Par ailleurs, des études récentes (Amoruso et al, 2009) montrent que la fumée de cigarette favorise la sécrétion de cytokines inflammatoires (TNF- α , IL-6) par les macrophages. D'autres parts, l'expression de PPAR- γ est significativement réduite chez les sujets fumeurs. Chez la souris ApoE^{-/-} hypertendue, la fumée de cigarette favorise le développement des lésions athéromateuses, augmente l'expression de MMP-2, MMP-9 responsable de la rupture de plaque et favorise la rupture d'anévrisme abdominale (Stolle et al, 2010). Au-delà des effets inflammatoires et

vasomoteurs, la fumée de cigarette a un effet métabolique généralisé puisque le tabagisme favorise l'augmentation des taux sanguins de triglycérides, des LDL et une diminution du HDL cholestérol (Craig et al, 1989).

5.3 L'hypertension et le système Rénine –Angiotensine

L'HTA est le risque majeur des accidents cardiovasculaires. Elle est responsable de 7.5 millions de décès, soit 12,8 % des décès annuels. L'augmentation de la pression artérielle est positivement corrélée au risque d'AVC et d'accidents coronariens. L'HTA est définie lorsque la pression systolique (SBP) dépasse 140 mm Hg ou lorsque la pression diastolique (DBP) dépasse 90 mm Hg. L'OMS estime que le risque de faire un accident cardiovasculaire double lorsque la pression systolique augmente de 20 mm Hg et/ou que la pression diastolique augmente de 10 mm Hg. L'Angiotensine II est un puissant agent hypertenseur qui influence l'athérogénicité, par un processus hémodynamique résultant d'une augmentation de la pression artérielle (Weiss et al, 2001) et par des processus moléculaires liés à l'action indépendante de l'ANG II (Schmidt-Otto et al, 2000, Mazzolai et al, 2004). La déformation mécanique de la paroi artérielle, due à l'élévation des contraintes circonférentielle sur la paroi artérielle, lorsque la pression augmente, stimule des molécules pro-inflammatoires MCP-1, VCAM-1, ICAM-1, IL-6 au niveau aortique et augmente le stress oxydant favorisant ainsi une augmentation des lésions athéromateuses (Daugherty et al, 2000). Cependant, des études montrent que les effets pro-athérogènes majeurs de l'hypertension sont principalement liés à l'augmentation de la rénine/angiotensine II circulante qui favorise le recrutement et l'activation des monocytes circulants, augmentent le stress oxydant et moins à l'effet hémodynamique exercé sur la paroi artérielle. En effet, chez la souris perfusée avec un agent hypertenseur rénine-dépendante (Ang II) ou non rénine-dépendante (la noradrénaline), la pression artérielle est comparable entre les deux groupes tandis que l'étendue des lésions athéromateuses est significativement plus importante chez la souris ApoE^{-/-} perfusée avec l'angiotensine II. Des investigations récentes confirment cet effet proathérogène de l'angiotensine II et montrent que l'ANG II a un effet pro-inflammatoire majeur. L'angiotensine II augmente l'activation des cellules pro-inflammatoires Th1 (Guzik et al, 2007), (augmentation de l'expression de CD69, un marqueur de l'activation des cellules T), augmente la production de cyto-

kines pro-inflammatoires (IFN- γ , TNF- α) et augmente l'activité des MMPs (MMP-9) responsable de la dégradation de la matrice extra cellulaire (Boyle et al, 2005 ; Rabbani et al, 1999). Dans un modèle d'auto-immunité, l'inhibition du système SRA est associée à une réduction de l'expression des cytokines Th1 et Th17 et à l'inhibition du facteur de transcription pro-inflammatoire NF- κ B (Gage et al, 2004). L'inhibition du SRA diminue la production des cytokines pro-inflammatoire et diminue le Ratio Th1/Th2 chez des patients atteints d'une insuffisance cardiaque (Gage et al, 2004). Au-delà de son rôle pro-inflammatoire, Mazzolai et al (2004) montrent que l'angiotensine II favorise le développement de lésions vulnérables chez la souris ApoE^{-/-}. - Cette étude confirme que l'ANG II augmente la vulnérabilité des lésions et donc le risque d'accident cardiovasculaire. Des études expérimentales, sur différents modèles d'animaux, montrent, a contrario, que l'inhibition des récepteurs AT1 avec des antagonistes atténue le développement (Charpiot et al, 1993 ; Ikeda et al, 2009 ; Lu et al, 2011, 2012) et la vulnérabilité des lésions athéromateuses (Nussberger et al, 2008), témoignant de l'importance du SRA dans la progression et la vulnérabilité des lésions athéromateuses (Lu et al, 2011, 2012).

Au niveau clinique, le même constat peut être effectué, les études CONSENSUS (1987), HOPES (Yusuf et al, 2000) et SAVE (Moye et al, 1994) démontrent que le traitement des patients avec des inhibiteurs du SRA réduit significativement l'incidence des événements coronariens de 30%, suggérant que l'inhibition du SRA peut prévenir les complications antérothrombotiques.

5.4 L'inactivité physique.

L'inactivité physique est aujourd'hui présentée comme une épidémie silencieuse des temps modernes (Booth et al, 2000). L'inactivité physique est aujourd'hui reconnue par l'OMS comme un risque cardiovasculaire majeur. L'inactivité physique est classée au quatrième rang des risques cardiovasculaires. L'OMS définit l'inactivité physique comme une activité inférieure à **30 minutes d'activité physique modérée 5 fois par semaine ou 20 min d'activité intensive 3 fois par semaine**. Des études expérimentales ont montré que l'inactivité physique affecte rapidement le métabolisme glucidique et lipidique. Chez le rat naturellement actif, les études expérimentales montrent que l'inactivité simulée par un blocage de la roue d'entraînement (pendant 5 heures, 29 heures ou 53 heures) entraîne une réduction de la sensibilité à l'insuline, une réduction du nombre des récepteurs à l'insuline (IR β) et une réduction des

transporteurs du glucose GLUT4, après 53 heures d'inactivité (Kump et Booth, 2005). Des résultats similaires ont été retrouvés chez l'homme. L'inactivité provoque de manière spectaculaire la résistance du muscle à l'insuline (Smorawinski et al, 2000), ce qui contribue au développement du syndrome métabolique, des maladies vasculaires et du diabète de type 2 (Mokdad et al, 2005).

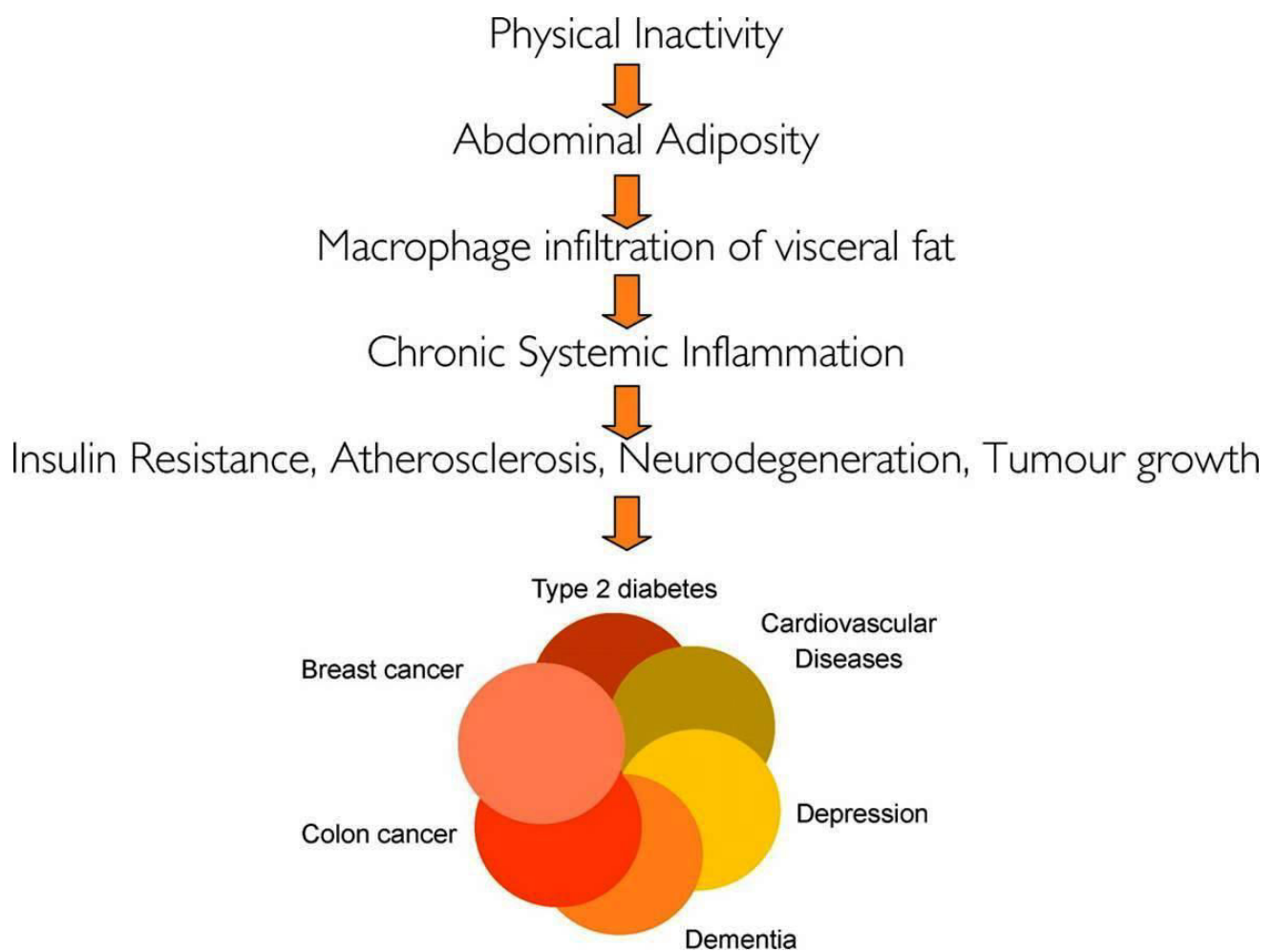


Figure 5: L'inactivité physique favorise le stockage du tissu adipeux, le développement de la résistance à l'insuline, l'athérosclérose, la dépression, les maladies dégénératives et le développement des tumeurs Pedersen (2009).

Les études épidémiologiques confirment et montrent que 20% des femmes les plus inactives ont un risque de diabète qui est multiplié par deux. De manière similaire, 20% des femmes, dont les parents présentent un diabète de type II, les plus inactives ont 65% de risque de développer le diabète de type 2 (Hu et al, 2001). En effet, un faible niveau d'activité, associé à une faible dépense énergétique, accroît de manière importante le risque de maladies cardiométaboliques et cardio-vasculaires chez des sujets

sains, mais également chez les sujets présentant des pathologies (Blair et al, 1989 ; Manson et al, 2002). Kump et Booth (2005) montrent que 53 heures après l'arrêt de l'activité physique sur roue d'entraînement, le tissu adipeux abdominal du rat augmente de 25% à 48%. Chez l'homme, Slentz et al (2005) observent une augmentation de 9% de tissus adipeux abdominal après six mois d'inactivité physique chez les sujets en surpoids ($IMC > 25-35 \text{ kg/m}^2$), en comparaison à un sujet pratiquant modérément la course à pied à raison de 12 miles/semaine. Globalement, les sujets qui sont physiquement inactifs ont deux fois plus de risque de développer des maladies cardio-vasculaires, en comparaison avec les sujets physiquement actifs. Dans le cadre de l'athérosclérose, l'inactivité physique favorise la dysfonction endothéliale et la progression de l'athérosclérose (Laufs et al, 2005). A contrario, l'activité physique diminue l'inflammation (Okabe et al, 2007), la progression de l'athérosclérose (Pellegrin et al, 2007 ;) et diminue le développement des lésions vulnérables (Pellegrin et al, 2009). Chez la souris $ApoE^{-/-}$, Okabe et al (2007) montrent que l'exercice de nage diminue l'infiltration des macrophages ainsi que de lymphocytes pro-inflammatoires. Chez la souris $ApoE^{-/-}$ ou $LDL^{-/-}$, l'exercice physique diminue l'extension des lésions athéromateuses (de 30 % à 50%) (Pellegrin et al, 2007 ; Okabe et al, 2007 ; Napoli et al, 2006) et diminue la vulnérabilité des lésions athéromateuses (Pellegrin et al, 2009). Au regard des maladies cardio-vasculaires, l'inactivité physique apparaît comme le premier maillon responsable d'une dérégulation métabolique, puis inflammatoire responsable de l'initiation la progression et la déstabilisation des lésions athéromateuses.

6. LES MOYENS DE LUTTE CLASSIQUES POUR LUTTER CONTRE LES MALADIES CARDIO-VASCULAIRES :

6.1 Les stratégies médicamenteuses.

Les stratégies médicamenteuses reposent essentiellement sur la réduction des facteurs de risque. Le traitement des dyslipidémies est assuré par l'utilisation de trois types de traitement: les statines, les fibrates et les résines. Les statines ont un effet hypocholestérolémiant essentiellement dû à une inhibition enzymatique de la HMG CoA. Cette inhibition arrête la synthèse du cholestérol endogène par les hépatocytes et diminue le taux du cholestérol plasmatique. Par ailleurs, les statines favorisent une augmenta-

tion des récepteurs LDL-cholestérol au niveau des hépatocytes et favorise la capture et la dégradation des LDL circulants. L'effet majeur des statines, chez les patients hypercholestérolémiques, est de diminuer le cholestérol circulant d'environ 20 à 50% selon la molécule utilisée (Davignon et al, 2001). L'effet hypolipémiant et cardioprotecteur des statines a été prouvé dans diverses études épidémiologiques. On observe une diminution de 27% à 30% du nombre des événements cardiovasculaires et de décès chez les patients traités avec les statines (Hebert et al, 1997 ; Ross et al, 1999). Cette efficacité fait des statines un médicament de choix pour la prévention des complications athéromateuses.

L'utilisation de fibrates est indiquée dans l'hypertriglycémie. Les fibrates stimulent l'hydrolyse des triglycérides, des chylomicrons et des VLDL en modulant l'expression des gènes qui contrôle cette lipolyse et en diminuant la sécrétion de la l'apolipoprotéine C-III (apoC-III) qui inhibe la dégradation des VLDL (Staels et al, 2008 ; Duval et al, 2004). Les fibrates augmentent également les concentrations du HDL (chez l'homme), en stimulant la synthèse de l'apoA-1 et de l'apoA-II (Fruchart et al, 1999). Les fibrates sont des activateurs des récepteurs nucléaires du type PPAR- α (Desvergne et al, 1999). En plus de leurs effets métaboliques, les fibrates ont des effets antiathérogènes puisqu'ils diminuent l'inflammation et stabilisent les lésions athéromateuses (Delerive et al, 2001 ; Duval et al, 2004).

La réduction des facteurs de risque implique également une diminution de la pression artérielle. Les antihypertenseurs regroupent sept grandes familles de médicaments. Les diurétiques, les bêta-bloquants, les antagonistes calciques, les inhibiteurs de l'enzyme de conversion, les antagonistes des récepteurs AT1 de l'ANG II, les antihypertenseurs centraux et les alpha-bloquants. Le rôle majeur de ces antihypertenseurs est d'abaisser la pression artérielle par divers mécanismes moléculaires. Les études cliniques CONSENSUS (1987) ; HOPES (Yusuf et al, 2000) et SAVE (Moye et al, 1994) démontrent que le traitement des patients hypertendus avec des inhibiteurs de l'enzyme de conversion réduit significativement l'incidence des événements coronariens (30%), suggérant que l'inhibition du SRA peut prévenir les complications antérothrombotiques. Les études expérimentales montrent que la normalisation de la pression artérielle réduit de 50 à 80% l'extension des lésions athéromateuses et favorise des lésions stables (avec moins de macrophages et plus de cellules musculaires lisses), chez la souris 2K1C et chez la souris ApoE^{-/-} (Nussberger et al, 2008 ; Blessing et al, 2008).

Au regard de la littérature, l'activation des PPAR, du fait de leurs effets anti-inflammatoire et antiathérogènes apparaissent comme une cible privilégiée dans le traitement de l'athérosclérose.

6.2 Le rôle des récepteurs nucléaires dans l'athérosclérose.

Les récepteurs des facteurs de prolifération des peroxysomes (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors ou PPARs) sont des facteurs de transcription ligand inductible qui appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires. Ils sont situés au carrefour du métabolisme lipidique et du processus inflammatoire (Castrillo et al, 2004 ; Glass et al, 2010 ; Bensinger et al, 2008). Les récepteurs nucléaires PPAR modulent de nombreuses fonctions cellulaires et les premières identifiées furent, pour le PPAR- γ , la différenciation des adipocytes, ainsi que le métabolisme des acides gras et du glucose. Cependant, les PPAR sont également exprimés au niveau d'autres cellules, telles que les cellules endothéliales, les macrophages (Ricote et al, 1998 ; Jiang et al, 1998), les lymphocytes T (Marx et al, 2002) et B (Padilla et al, 2000), ce qui leur confère un statut privilégié susceptible d'influencer la réponse immuno-inflammatoire dans la pathologie de l'athérosclérose. Trois isoformes ont été identifiées chez la souris et l'homme, PPAR- α , PPAR- β , et PPAR- γ .

6.3 Structure et mode d'action du PPAR.

Les récepteurs nucléaires PPAR ont une structure hautement conservée des récepteurs nucléaires, avec cinq domaines fonctionnels distincts. Un premier domaine, situé en position N-terminal, correspond à un site d'activation indépendant du ligand, appelé AF1. Un second domaine, composé de deux structures, constitue la région de fixation à l'ADN (DBD pour DNA Binding Domain), est conservé par les trois isoformes du PPAR. Ce domaine comprend des séquences d'acides aminés cruciales pour la spécificité de fixation du récepteur à l'ADN et la dimérisation des récepteurs.

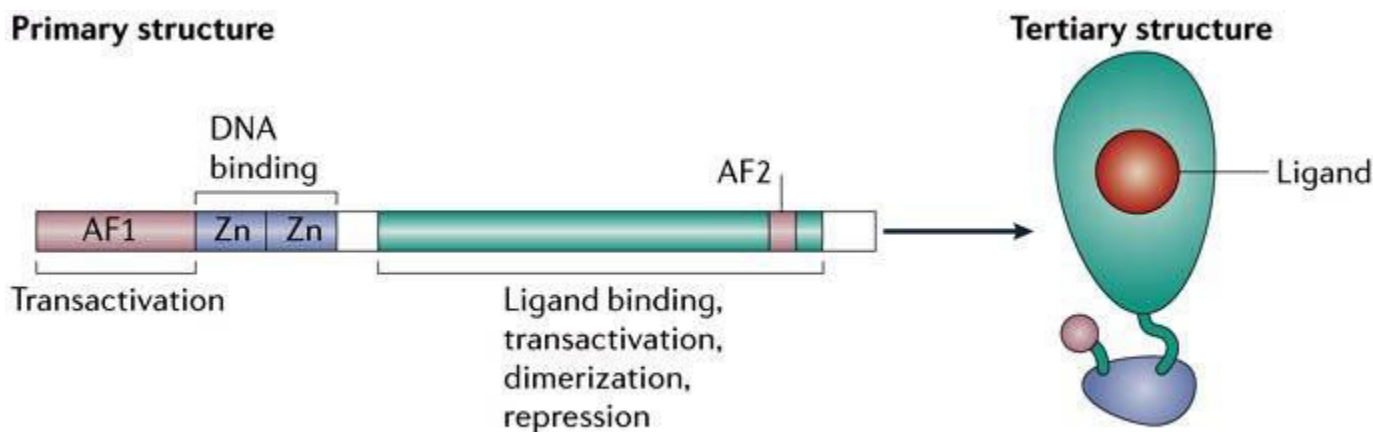


Figure 6: Structure du Peroxisome Proliferator Activated Receptor (Glass et al, 2006).

Le domaine Carboxy-terminal correspond au site de fixation du ligand LBD (Ligand Binding Domain). Il contient la région AF2, domaine d'activation dépendant du ligand. La séquence LBD détermine les interactions avec les co-activateurs et les co-répresseurs et module la transcription de gènes cibles en induisant des changements allostériques de la région AF2. La dernière région F correspond à une région charnière.

6.3.1 L'activation des gènes cibles.

Comme pour tous les récepteurs nucléaires, l'activité transcriptionnelle des PPAR dépend de la fixation d'un ligand. La transactivation implique la dimérisation avec un autre récepteur nucléaire, le RXR (Retinoïde acid X Receptor), afin de faciliter la fixation de l'ensemble PPAR/RXR sur l'élément de réponse de la séquence promotrice des gènes cibles, appelée PPRE (Peroxisome Proliferator Responsive Element). Ces PPRE sont des déclinaisons de la séquence AGGTCA, répétées en tandem et séparées par un nucléotide. La fixation d'un ligand implique la libération du complexe co-répresseur qui, via leur association avec les histones desacétylases, maintiennent la transrépression du gène. Le co-répresseur est alors ubiquitinylé et dégradé par le protéasome (Zieleniak et al, 2008). Les 3 isoformes du PPAR couplés à RXR reconnaissent le même PPRE. L'hétérodimère PPAR-RXR, fixé à l'ADN, peut alors interagir avec des complexes co-activateurs pour assurer son activité transcriptionnelle des gènes cibles (CD36, LPL, SR-B1) (Castrillo et Tantz, 2004).

Le mécanisme majeur qui souligne l'habilité du PPAR à agir sur le mécanisme et la signalétique inflammatoire est la répression.

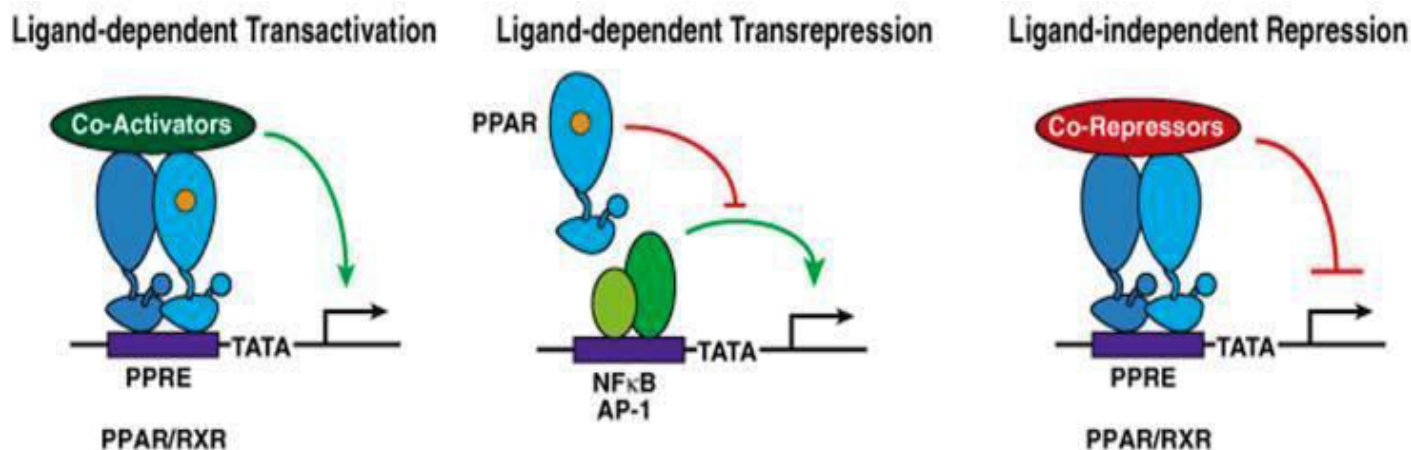


Figure 7: Activités transcriptionnelles du PPAR (Ricote et Glass, 2007).

6.3.2 La répression des gènes cibles.

La répression ligand-indépendante

En effet, les PPAR ont la capacité de réprimer l'expression de gènes pro-inflammatoire par différents mécanismes indépendants de la liaison du ligand et/ou indépendants de la liaison à l'ADN (Ricote et Glass 2007). Le premier mécanisme est une répression active indépendante du ligand. Cette répression est liée au recrutement des co-répresseurs qui antagonisent l'action des complexes co-activateurs (Gerry et al, 2008). Les co-répresseurs des PPAR les mieux caractérisés, sont le NCoR (nucléaire récepteur corépresseur) et le SMRT (le médiateur silence connexe de l'acide rétinoïque, de la thyroïde et des hormones récepteurs). Le passage de la répression à l'activation est ligand-induit et entraîne un changement allostérique dans la région C-terminale du domaine de liaison de ligand, qui réduit l'affinité pour le co-répresseur et augmente l'affinité pour le co-activateur.

La répression ligand-dépendante

Le second mécanisme est la transrépression, ce processus ne correspond pas à une interaction PPAR/RXR-PPRE mais reste dépendante de la fixation d'un ligand. La transrépression ligand-dépendante agit sur plusieurs niveaux afin de réduire la transcription de gènes pro-inflammatoires (Pascual et al, 2005). L'activation des PPAR, par un ligand spécifique, permet d'inhiber l'activité des autres facteurs de transcriptions pro-inflammatoires telles que : AP-1, NF-Kb, STAT-1 (Chinetti et al, 2000) . Dans ce cas, l'interaction directe du PPAR avec les autres facteurs de transcriptions est protéine-protéine dépendante. Cette interaction empêche la fixation de ces facteurs de transcriptions sur le PPRE du gène cible. Il a ainsi été montré que l'activation du PPAR inhibe l'inflammation vasculaire par une interaction directe protéine-protéine avec p65 et cJun. Cette fixation protéine/protéine entraîne la formation d'un complexe PPAR/p65/cJun et évite la transcription du gène pro-inflammatoire (Pascual et al, 2005). Par ailleurs, l'activation du PPAR favorise l'expression d'I κ B α . L'induction d'I κ B α permet à son tour de maintenir le complexe des unités de NF-Kb p65/cJun/ I κ B α séquestré dans le cytoplasme et empêche ainsi son activité transcriptionnelle pro-inflammatoire. L'activation de PPAR permet aussi de réguler l'activité des enzymes et notamment de la MAPK (proteine kinase régulé par les mitogènes). En effet, l'activation des PPAR réduit l'activité du c-Jun N-terminal kinase (JNK), MAPK et p38, entraînant une diminution de l'expression des gènes pro-inflammatoires. PPAR- γ peut inhiber les réponses inflammatoires en bloquant la dégradation du NCoR co-répresseur. En effet, la stimulation par les lipopolysaccharides (LPS) favorise la dégradation protéosomale du complexe NCoR (Gerry et al, 2008 ; Pascual et al, 2006). En présence de ligand, le PPAR- γ est sumoylé et ciblés sur le complexe co-répresseur et sur le promoteur des gènes. Ceci empêche le dégagement de NCoR des complexes adjacents et sa dégradation.

6.4 La biologie des PPAR.

Les trois isoformes identifiées chez la souris et l'homme sont les PPAR- α , PPAR- β , et PPAR- γ . Le PPAR- α est fortement exprimé dans les tissus avec des taux élevés d'oxydation mitochondriale des acides gras, tels que le foie, le cœur, les muscles, les reins et les cellules de la paroi artérielle (macrophages, cellules musculaires lisses et endothéliales). Il est activé par les fibrates, les acides gras (oxy-

dés), les eicosanoïdes tel que 15-D Pstg (15-désoxy-Delta prostaglandine-J2) (Desvergne et al, 1999). Il régule l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme des lipoprotéines, il augmente la transcription des apolipoprotéines AI et AII, importantes apolipoprotéines des HDL favorisant le transport inverse du cholestérol. Le PPAR- α régule l'expression de gènes impliqués dans la bêta-oxydation mitochondriale. Il active l'acyl-CoA oxydase et l'énoyl-CoA hydratase/déshydrogénase, enzymes multifonctionnelles impliquées dans la dégradation des acides gras. En modifiant la transcription de ces gènes, le PPAR- α conduit à la dégradation accrue des triglycérides et des acides gras. L'implication du PPAR- α dans le métabolisme du cholestérol a été mis en évidence chez la souris PPAR $\alpha^{-/-}$. En effet, la délétion du PPAR- α engendre une diminution de la bêta-oxydation et une augmentation du cholestérol plasmatique (Staels et al, 2008).

Le PPAR- γ a été initialement découvert au niveau du tissu adipeux, lui conférant un rôle-clé dans l'adipogénèse et le stockage du tissu adipeux. Le PPAR- γ est aussi exprimé dans les principales cellules du système vasculaire, y compris les cellules endothéliales, les CMLV et les monocytes/macrophages. Les ligands naturels du PPAR- γ sont les prostaglandines, les dérivés de l'acide linoléique. Les ligands synthétiques sont les antidiabétiques : glitazones : Troglitazone, Pioglitazone et Rosiglitazone (Touyz et al, 2006). Des mutations qui modifient la fonction de PPAR- γ provoquent un syndrome de résistance à l'insuline, une HTA, une dyslipidémie, caractéristiques du syndrome cardiométabolique (Barrosso et al, 1999). L'activation de PPAR- γ inhibe des réactions inflammatoires au niveau des monocytes, des macrophages, des cellules endothéliales, en empêchant l'activation de facteurs de transcription nucléaires, comme NF- κ B, AP-1 et STAT1 (Desvergne et al, 1999 ; Chinetti et al, 2000). Au niveau des cellules endothéliales, l'activation du PPAR- γ inhibe VCAM-1, ICAM-1 et MCP-1, diminuant l'attraction des macrophages au niveau de l'intima (Tantoz et al, 2008).

Le PPAR- β est exprimé dans de nombreux tissus incluant le tissu adipeux et le muscle squelettique. Bien que son rôle physiologique reste incertain, il semblerait qu'il soit impliqué dans la régulation du métabolisme des acides gras. En effet, l'activation du PPAR- β contrôle l'expression des gènes impliqués dans la captation des acides gras et la β -oxydation (Luquet et al, 2005).

Au-delà de leurs rôles dans le métabolisme lipidique, les PPAR- α , PPAR- β et PPAR- γ sont impliqués dans le processus inflammatoire (Szanto et al, 2008).

L'athérosclérose est un processus pathologique inflammatoire impliquant l'attraction des monocytes/macrophages dans la paroi vasculaire. L'expression des PPAR- α a été mise en évidence au sein des lésions athéromateuses et des macrophages spumeux (Tantoz et al, 1998 ; Ricote et al, 1998 ; Marx et al, 1998), suggérant ainsi que les PPAR peuvent jouer un rôle majeur dans le processus inflammatoire et athéromateux. Au niveau clinique, cet effet protecteur de l'activation des PPAR- α a été rapidement observé puisque, des études montrent que les fibrates, activateurs de PPAR- α , et le troglitazone, agoniste de PPAR- γ , diminuent la progression de l'athérosclérose et l'épaisseur de l'intima-média au niveau des carotides humaines (Langenfeld et al, 2005). Dès lors, les effets antiathérogènes de l'activation des PPAR ont été examinés dans de nombreux modèles animaux d'athérosclérose et d'HTA. Des études expérimentales, chez la souris LDL^{-/-} ou ApoE^{-/-}, montrent que l'administration de Troglitazone ou Rosiglitazone diminue de 30 à 80% la formation de lésions athéromateuses (Collins et al, 2001 ; Chen et al, 2001 ; Li et al, 2000). Dans le cadre de l'HTA, chez la souris LDL^{-/-} infusée avec l'angiotensine II, l'activation du PPAR- γ , avec l'agoniste Merck L645, diminue de 60% l'étendue des lésions athéromateuses (Collins et al, 2001). Chez le rat DOCA-sel hypertendu, l'activation du PPAR- γ par Rosiglitazone engendre une diminution de la pression artérielle ainsi qu'une diminution de l'expression des ARNm de l'endothéline 1 (Iglarz et al, 2003). Finalement, pour confirmer le rôle protecteur des PPAR dans la progression de l'athérosclérose, l'étendue des lésions athéromateuses a été aussi étudiée chez la souris LDLR^{-/-} déficiente pour l'expression du PPAR α ^{-/-} et du PPAR γ ^{-/-} au niveau des macrophages (Babaev et al, 2005; 2007). Les auteurs observent une augmentation des lésions athéromateuses de plus de 40%. Ceci démontre bien le rôle préventif des PPAR- α et PPAR- γ dans la progression de l'athérosclérose. D'autres études montrent que l'activation du PPAR- γ réprime la transcription de MCP-1 et de son récepteur CCR2 au niveau des macrophages, inhibant ainsi le recrutement et la pénétration des macrophages sur le site de l'inflammation et prévenant le développement des lésions athéromateuses (Babaev et al, 2005 ; Chen et al, 2005). L'ensemble de ces études montre finalement que l'activation des PPAR- γ et PPAR- α par des agonistes spécifiques freine le développement de l'athérosclérose. Les auteurs ajoutent que la diminution de la progression de l'athérosclérose est essentiellement liée à une baisse accrue de l'inflammation. En effet, les agonistes de PPAR diminuent l'activation des facteurs de transcriptions NF-

kB, AP-1, STAT-1 au niveau des macrophages, inhibant ainsi la production macrophagique des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , TNF- α , IL-6 au niveau des lésions athéromateuses (Jiang et al, 1998 ; Straus et al, 2007 ; Welch et al, 2003, Matsumura et al, 2011). Li et al (2004) confirment et montrent que l'activation du PPAR- γ diminue la production d'IL-1 β , TNF- α et IL-6 par les macrophages et diminue la transcription du MCP-1. Par ailleurs, des études in vitro, sur des macrophages stimulés avec IFN- γ , montrent que le PPAR- γ inhibe l'expression de la iNOS et du récepteur Scavenger A (Ricote et al, 1998). L'activation des PPAR au niveau des macrophages entraine des effets anti-inflammatoires accrus. Clark et al (2000) montrent que l'activation du PPAR inhibe la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les Lymphocytes T. En effet, des études réalisées sur le système Th1/Th2 montrent par ailleurs que l'activation des PPAR et notamment du PPAR- γ et - α inhibe la production des cytokines Th1 telles que IL-2 et IFN- γ (Clark et al, 2000).

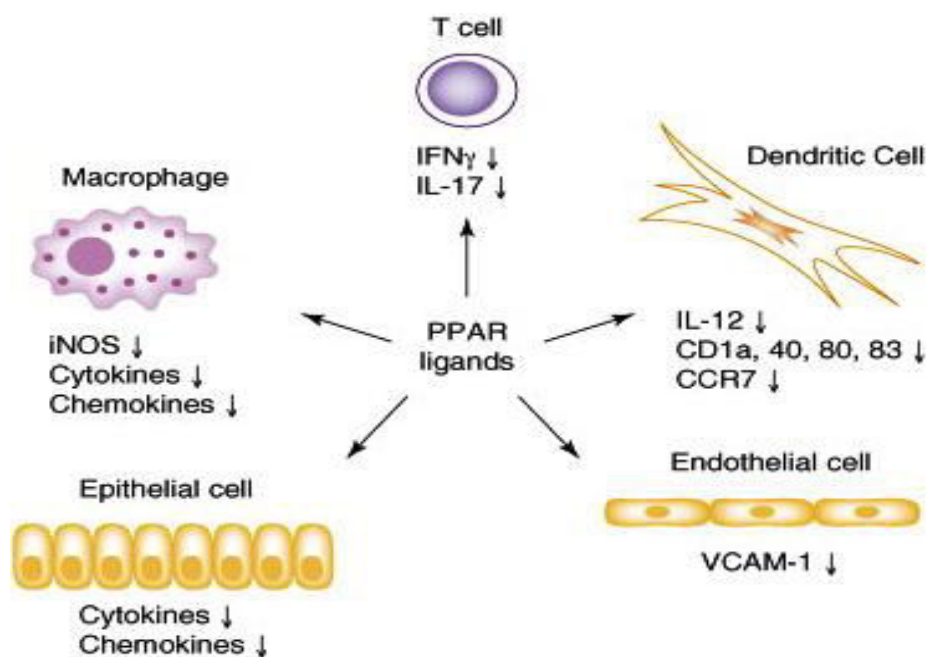


Figure 8 : Cibles cellulaires et moléculaires anti-inflammatoires du PPAR (Straus et al, 2007).

Au niveau clinique, diverses études montrent que l'activation du PPAR- γ s'accompagne d'une diminution de marqueurs de l'inflammation systémique. En effet, un traitement de 26 semaines avec Rosiglitazone diminue la concentration plasmatique de CRP et MMP-9, le nombre de leucocytes circulants, significativement corrélés avec la diminution du risque cardiovasculaire (Haffner et al, 2002). Par ailleurs, les

patients diabétiques présentent une élévation de la cytokine pro-inflammatoire plasmatique CD40, indépendamment des autres facteurs de risque (cholestérol total, LDL, IMC). Un traitement de 12 semaines avec Troglitazone à des patients diabétiques permet de réduire le CD40 plasmatique circulant, suggérant un mécanisme anti-inflammatoire systémique (Marx et al, 2003, Varo et al, 2003). De plus, l'administration de Rosiglitazone diminue l'épaisseur de l'intima-média (IMT) considérée comme un marqueur de maladies cardiovasculaires réduit la E-selectine, le fibrinogène plasmatique et la résistance à l'insuline. (Sidhu et al, 2003).

6.5 Le rôle du PPAR- γ dans l'inflammation: désactivation des M1 et formation des M2.

Le récepteur nucléaire PPAR- γ , utilisé dans le traitement du diabète, est exprimé dans les macrophages de la lésion athéromateuse où il module la réponse immuno-inflammatoire et engendre des effets antiathérogènes. En effet, dans les macrophages classiques M1, les agonistes synthétiques de PPAR- γ répriment la transcription de gènes pro-inflammatoires. Cette désactivation des macrophages inflammatoires engendre une diminution de la capacité des macrophages à sécréter des cytokines pro-inflammatoires (Ricote et al, 1998, Bouhlef et al, 2008). En effet, les auteurs confirment la désactivation des macrophages M1 pro-inflammatoires et montrent que les agonistes du PPAR- γ suppriment le phénotype M1, par une inhibition de l'expression des cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- α , IL-1 β et IL-6 (Jiang et al, 1998). D'autres auteurs montrent que, dans les macrophages activés M1, le mécanisme d'action de la transrépression du PPAR- γ est assuré par le maintien du complexe co-répresseur NoCr sur l'élément de réponse PPRE du gène NF- κ B. Cette régulation négative des gènes pro-inflammatoires NF- κ B, STAT 1, AP-1 est le mécanisme anti-inflammatoire principal qu'assurent les PPAR (Pascual et al, 2005 ; Bouhlef et al, 2008).

Le PPAR- γ a récemment été identifié comme un récepteur important dans la détermination du phénotype des macrophages et de leur fonction (Charo et al, 2007 ; Chinetti et al, 2003). Bouhlef et al (2007) ont montré récemment que l'activation du PPAR- γ , au cours de la différenciation des monocytes en macrophages, amplifie le phénotype M2. Par ailleurs, une forte corrélation entre l'expression du PPAR- γ et les marqueurs des macrophages M2, CD206 et CD36, a été mise en évidence dans les lésions athéromateuses (Bouhlef et al, 2007). L'importance du PPAR- γ dans la polarisation des macrophages vers un

phénotype M2 a été confirmée chez la souris transplantée avec des macrophages déficients pour le PPAR- γ . Chez cette souris déficiente pour le PPAR- γ , on observe au niveau des macrophages, un défaut de maturation des macrophages M2 et une prédominance des macrophages présentant un phénotype M1 « pro-inflammatoire » (Odegaard et al, 2007). Cependant, Bouhel et al (2007) tempèrent et montrent que l'activation du PPAR- γ influence la formation des macrophages M2 dans les monocytes sanguins et non des macrophages résidents ou déjà programmés M1. Néanmoins, ils ajoutent que le PPAR- γ permet de réduire l'activation des M1 en diminuant l'expression des cytokines pro-inflammatoires chez les macrophages différenciés M1 au niveau des lésions athéromateuses.

7. L'EXERCICE PHYSIQUE PREVIENT LE DEVELOPPEMENT DE L'ATHEROSCLEROSE

7.1 L'Exercice physique prévient et réduit les facteurs de risques.

À l'heure actuelle, les données scientifiques mettent en avant les effets bénéfiques de l'activité physique sur les facteurs de risques cardiovasculaires (Thompson et al, 2003). L'activité physique réduit la concentration sanguine du LDL-c et augmente celle du HDL-c. En effet, une meta-analyse réalisée à partir de 4700 sujets montre que l'exercice physique augmente le HDL-c de 4,6% et réduit le LDL-c et les triglycérides de 3,7% et 5% respectivement (Leon et al, 2001). Des résultats similaires ont été mis en évidence dans l'étude HERITAGE, réalisée sur 675 sujets sains pratiquant un exercice physique pendant cinq mois. Les auteurs observent l'augmentation de HDL-c de 3% alors que les triglycérides et le LDL-c diminuent de 2,7% et 0,8% respectivement (Leon et al, 2001). D'autres études confirment l'effet bénéfique de l'exercice physique sur le profil lipidique (Mora et al, 2006; Balardinelli et al, 2001).

L'exercice physique diminue la pression artérielle systolique et la pression artérielle diastolique chez les sujets normotendus et les sujets présentant une HTA. En effet, Fagard et al (2007) ont comparé l'effet hémodynamique de l'exercice physique sur 2674 sujets. Ils montrent que l'exercice physique diminue la pression artérielle systolique et diastolique d'environ 3,4 mm Hg et 2,4 mm Hg respectivement. Par ailleurs, ils montrent que la baisse de la pression artérielle est plus importante chez les sujets hypertendus (Fagard et al, 2006).

L'exercice physique diminue le risque de diabète. En effet, Lindstrom et al (2006) montrent que 150 minutes d'activité de marche par semaine peuvent réduire de moitié le risque de développer un diabète de type II. Par ailleurs, des études réalisées chez le rat, montrent que l'exercice physique augmente la sensibilité à l'insuline, l'expression des récepteurs à l'insuline (IR-beta) et le transport du glucose via une augmentation des molécules transporteuses (GLUT 4). D'autres études montrent, par ailleurs, que l'activité physique peut s'avérer plus pertinente que le traitement pharmacologique dans la prévention du diabète chez les patients à haut risque (Tuomilehto et al, 2001 ; Knowler et al, 2002).

Une méta-analyse (Jolliffe et al, 2000) a comparé l'effet de l'exercice et d'une prise en charge multifactorielle sur la mortalité globale et la mortalité cardiovasculaire. Cette étude inclut des patients coronariens provenant de 36 essais cliniques (n=8440). L'objectif était de mesurer l'efficacité des programmes d'exercices seuls (EX) ou associés à une prise en charge multifactorielle (PM). Elle montre une réduction significative de la mortalité totale (respectivement, 27 % EX et 13 % PM), ainsi qu'une réduction de la mortalité cardiovasculaire (respectivement, 31 % EX et 26 % PM). Les auteurs concluent que l'exercice physique est plus efficace pour réduire la mortalité chez les patients à risque cardiovasculaire qu'une prise en charge multifactorielle.

Il est intéressant de noter que, malgré des effets modestes de l'exercice physique sur le LDL-C, le HDL-C ou encore la pression artérielle (Leon et al, 2001 ; Fagard et al, 2001 ; Green et al, 2003 ; Turnbull et al, 2003), les effets bénéfiques de l'activité physique sur le risque cardiovasculaire restent majeurs.

7.2 L'exercice physique prévient le processus athéromateux.

7.2.1 L'exercice physique réduit la progression des lésions athéromateuses

De nombreuses études cliniques et expérimentales se sont intéressées aux effets de l'exercice physique sur la progression de l'athérosclérose. Chez l'homme, la mesure de l'épaisseur de l'intima-média, au niveau de la carotide, est un marqueur aisément utilisé pour quantifier l'athérosclérose et évaluer le risque ischémique tel que l'infarctus du myocarde ou l'AVC (Park et al, 2011). L'étude Framingham montre qu'une épaisseur supérieure à 1,5 mm au niveau de la carotide interne, est un facteur prédictif indépendant des AVC (Polak et al, 2011). En effet, lors du processus athéromateux, on observe un

épaississement de l'interface intima-média dû à l'infiltration des cellules inflammatoires. L'inactivité physique augmente l'épaisseur intima-média au niveau de la carotide, suggérant ainsi que l'inactivité favorise le développement des plaques athéromateuses (Kadoglou et al, 2008). A contrario, l'exercice physique prévient l'épaississement de l'intima-média (IMT). La progression de l'épaisseur de l'intima-média diminue avec la pratique de l'exercice physique. En effet, l'épaississement de l'intervalle intima-média augmente de 14,3 $\mu\text{m}/\text{an}$ chez les sédentaires, de 10,2 $\mu\text{m}/\text{an}$ chez les sujets modérément actifs et de 5,5 $\mu\text{m}/\text{an}$ chez les sujets très actifs (Nordstorm et al, 2003). Chez le patient diabétique et obèse, un programme d'exercice physique combiné avec une modification du style de vie diminue la progression de l'épaisseur intima-média au niveau de la carotide ($-0,004 \pm 0,136$ versus $+0,083 \pm 0,167$) et stoppe la progression de l'athérosclérose (Kim et al, 2006). Wildmann et al (2004), confirment et montrent qu'une dépense énergétique de 1000 à 1500 Kcal/semaine diminue la progression de l'épaississement de l'intima-média de 0,008 à 0,004 mm/an chez la femme ménopausée.

Des études expérimentales rapportent des données similaires. En effet, Napoli et al (2006) montrent chez la souris LDL^{-/-}, qu'un exercice physique de nage réduit significativement l'épaisseur de la paroi artérielle, réduit les lésions athéromateuses. De nombreuses données expérimentales ont montré un effet direct de l'exercice physique sur la progression de l'athérosclérose sans pour autant modifier les facteurs de risques. Ainsi, les effets bénéfiques directs de l'exercice physique sur la progression de l'athérosclérose ont été vérifiés chez la souris LDL^{-/-} (Napoli et al, 2004 ; Ramachandran et al, 2005), ainsi que chez la souris ApoE^{-/-} (Pellegrin et al, 2007 ; Okabe et al, 2006, 2007) alors que l'inactivité physique accélère la progression de l'athérosclérose (Laufs et al, 2005).

7.2.2 L'exercice physique stabilise les lésions athéromateuses.

Les lésions, sous l'influence de facteurs inflammatoires, peuvent se transformer en plaque vulnérable (Naghavi et al, 2003). Des données récentes montrent que l'entraînement prévient la progression, mais aussi le développement des lésions vulnérables. En effet, Pellegrin et al (2009) montrent que l'exercice physique de nage, chez la souris ApoE^{-/-} 2K1C, diminue l'infiltration des macrophages inflammatoires, diminue la dégénérescence de la média, augmente le nombre de CML et l'épaisseur de la chape fibreuse, conduisant ainsi à une stabilisation des lésions athéromateuses. Des données similaires ont été

trouvées dans d'autres études expérimentales. En effet, Napoli et al (2006) montrent qu'un programme d'entraînement de nage diminue l'infiltration des macrophages, diminue le risque de thrombus et prolonge la survie. L'ensemble de ces études montre que l'exercice physique prévient de manière significative la progression des lésions athéromateuses et leur vulnérabilité, sans corriger les facteurs de risques classiques tels que les dyslipidémies, la pression artérielle, ou encore la dysfonction endothéliale. Ceci suggère que l'exercice physique peut directement affecter la composition et le phénotype des lésions athéromateuses et prévenir la survenue des accidents cardio-vasculaires.

7.3 Les effets anti-inflammatoires de l'exercice physique.

De nombreuses études cliniques et expérimentales les plus récentes permettent d'affirmer que l'athérosclérose est un processus immuno-inflammatoire. Ces études montrent par ailleurs que l'inflammation contribue au développement et à la progression de l'athérosclérose, module la matrice extracellulaire et accroît sa vulnérabilité. L'exercice physique permet de réduire ce processus inflammatoire. En effet, quelques études expérimentales (Niebauer et al, 2008 ; Pellegrin et al, 2009 ; Fukao et al, 2010) montrent que l'exercice physique réduit l'infiltration de cellules inflammatoires dans les lésions athéromateuses. Chez la souris ApoE^{-/-}, Okabe et al (2007) montrent que l'exercice de nage diminue l'infiltration des macrophages ainsi que de lymphocytes pro-inflammatoires Th1 CD4⁺. Par ailleurs, Fukao et al (2010) ajoutent que l'exercice physique a un effet anti-inflammatoire systémique. En effet, il observe chez la souris ApoE^{-/-} une diminution de la sécrétion des cytokines inflammatoires telles que TNF- α , IL-6 et MCP-1. Ces cytokines jouent un rôle important, dans l'athérosclérose puisqu'elles sont augmentées, et leur augmentation accentue la dysfonction endothéliale. Chez l'homme, des effets similaires ont été constatés, puisqu'on observe une réduction significative de 25% à 50% de la CRP plasmatique en réponse à un exercice d'endurance (Lakka et al, 2005 ; Goldhammer et al, 2005).

Par ailleurs, des études récentes montrent que l'exercice physique au-delà d'un effet anti-inflammatoire systémique favorise la polarisation des macrophages anti-inflammatoire M2 (Yakeu et al, 2010, Kawanishi et al, 2010 ; Gleeson et al, 2011). Bouhel et al (2007) montrent que les lésions athéromateuses sont composées des deux populations des macrophages : M1 et M2. Ils montrent que les M2 sont majoritairement présents au niveau des lésions dites stables (Bouhel et al 2007). Ces données suggèrent que

les macrophages peuvent jouer un rôle déterminant dans la progression et la stabilité des lésions athéromateuses. Des études récentes montrent que l'exercice physique permet d'induire un phénotype anti-inflammatoire (M2) des macrophages. En effet, l'exercice de course, chez la souris C57BL/6, augmente l'expression des marqueurs des macrophages de type M2 (CD163), tandis que les marqueurs M1 (CD11c) sont fortement réduits (Kawanishi et al, 2010). Yakeu et al (2010) confirment chez l'homme, que l'exercice physique de marche (10 000 pas à raison de 3 fois par semaine), augmente l'expression des marqueurs des macrophages alternatifs M2 (IL-4, CD206) et diminue les marqueurs de type M1 (IL-6, TNF- α et MCP-1).

L'ensemble des données bibliographiques montre que l'exercice physique a un effet bénéfique anti-inflammatoire et antiathérogène. Les PPAR et les macrophages jouent un rôle primordial dans l'inflammation lors du processus athéromateux. De ce fait, nous allons étudier l'implication du PPAR dans la cardioprotection induite par l'exercice physique.

OBJECTIFS EXPÉRIMENTAUX

OBJECTIFS GENERAUX :

Au regard de notre travail bibliographique, l'ensemble des données cliniques et expérimentales montre que l'exercice physique réduit de manière significative la mortalité cardiovasculaire, prévient la progression de la lésion athéromateuse et la vulnérabilité de la plaque.

Bien que de nombreuses études aient observé une diminution de la réaction inflammatoire systémique et locale, pouvant sous-entendre une activation ou un effet direct des récepteurs nucléaires PPAR, il n'existe aucune production scientifique qui met en évidence un effet direct de l'exercice physique sur l'expression et l'activation des récepteurs nucléaires PPAR au niveau vasculaire. L'objectif de notre premier travail a donc été d'examiner, à partir d'un modèle murin d'hypercholestérolémie et d'athérosclérose, la souris ApoE^{-/-}, l'effet de l'exercice physique sur l'activation des récepteurs nucléaires PPARs et le processus inflammatoire. Par ailleurs, nous avons investigué, par RT-PCR et par analyse immunohistochimique, le rôle des récepteurs nucléaires PPAR-γ dans la progression de l'athérosclérose.

D'autre part, s'il est aujourd'hui bien démontré dans la littérature que l'exercice physique inhibe la progression de l'athérosclérose et stabilise les lésions vulnérables, il nous semblait intéressant d'évaluer ces effets protecteurs majeurs avec diverses formes d'exercices (imposé et volontaire) tout en les comparant à un traitement pharmacologique. Notre objectif, dans cette deuxième partie, a donc été de comparer l'effet de différents types d'exercice physique (imposé sur tapis roulant et volontaire sur roue libre) contre un traitement pharmacologique de type inhibiteur du SRA : Telmisartan, dans la progression et la stabilité des lésions athéromateuses chez la souris ApoE^{-/-} hypercholestérolémique et hypertendue générée par l'équipe du Pr. Mazzolai.

Afin de mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires, nous avons étudié l'implication des PPAR dans l'inflammation, l'induction des marqueurs de macrophages M2 et le rôle de la balance inflammatoire M1/M2 dans le processus athéromateux.

DESCRIPTION DU MODELE EXPERIMENTAL LA SOURIS ApoE^{-/-} :

Lors de notre étude expérimentale, nous avons utilisé la souris ApoE^{-/-} qui est un modèle expérimental d'athérosclérose le plus communément utilisée. La souris ApoE^{-/-} a été développée dans le laboratoire du Dr Nobuyo Maeda à l'Université de Caroline du Nord. L'apolipoprotéine E joue un rôle critique dans le métabolisme des lipoprotéines. Ces fonctions sont extrêmement importantes dans le transport et le métabolisme des lipides et du cholestérol dans la circulation sanguine. En présence de lipides, l'apoE est un ligand pour la plupart des récepteurs de la famille des récepteurs LDL. L'apolipoprotéine E permet l'élimination du cholestérol de la circulation sanguine. La souris ApoE^{-/-} présente, de ce fait, une accumulation de cholestérol, engendrant des changements importants dans le métabolisme des lipides : le taux sanguin de cholestérol total est 5 fois supérieur (ApoE^{-/-} 400-500 mg/dl versus C57Bl/6 60-80 mg/dl), le taux de HDL-c chute de 50 % (O'Neill 1997). Cette augmentation exagérée du cholestérol se poursuit par un développement accru des lésions athéromateuses. En effet, les études scientifiques montrent que la souris ApoE^{-/-} développe des lésions athéromateuses dès l'âge de 10 semaines.

Les accidents cardiovasculaires sont la conséquence d'une déstabilisation de lésions vulnérables. L'ANG II est un agent hypertenseur qui favorise les lésions vulnérables (Mazzolai et al, 2004). Dans la deuxième partie de notre étude, nous avons investigué le rôle des différents traitements (exercices physiques volontaire soumis et traitement pharmacologique) sur la progression des lésions athéromateuses et sur la stabilité des lésions, chez la souris ApoE^{-/-} 2K1C. La souris ApoE^{-/-} 2K1C est un modèle de souris hypercholestérolémique avec en plus une hypertension rénovasculaire, qui a l'avantage de présenter un phénotype de plaques instables. Cette souris a été générée dans le laboratoire du Pr Mazzolai (Angiologie Bâtiment Nestlé NES/06CH-1011 Lausanne, Switzerland) par une intervention chirurgicale au niveau du rein. Cette intervention consiste à compri-

mer l'artère rénale par la pose d'un clip. La pose du clip va engendrer une diminution de la perfusion rénale. En réponse à cette sténose, le rein sécrète alors la rénine. La rénine sera clivée par l'Angiotensinogène (sécrété par le foie) et transformée en Angiotensine I (inactive), puis en ANG II grâce à l'enzyme de conversion de l'angiotensine (AEC). Cette ANG II se fixera sur ses récepteurs spécifiques AT1.

Les souris 2K1C présentent une élévation de la pression artérielle et un phénotype de plaque instable avec une accumulation accrue de macrophages et une réduction du contenu en CML de la chape fibreuse.

PARTIE 2 : TRAVAUX DE RECHERCHE

PREMIERE PARTIE :

Swim Training Reduces Atherosclerosis Lesions in Apolipoprotein E Deficient Mice (ApoE^{-/-}) Through Increase PPAR- γ Expression and Anti-Inflammatory Effects.

Justyna Szostak^{a,b}, Carole Miguët-Alfonsi^b, Maxime Pellegrin^a, Alain Berthelot^b, Karima Bouzourene^a, Jean François Aubert^a, Lucia Mazzolai^a, Pascal Laurant^c

^aService of Vascular Medicine, Department of Internal Medicine, Lausanne University Hospital, CHUV, Switzerland

^bSciences Séparatives Biologiques et Pharmaceutiques, UFR STAPS/SMP, University of Franche-Comté, Besançon, France

^cLaboratoire Pharm-Ecologie Cardiovasculaire, UFRip Sciences Technologie et Santé, UAPV, Avignon, France

Corresponding author:

Justyna Szostak
Service of Vascular Medicine,
Department of Internal Medicine,
Lausanne University Hospital,
CHUV,
Ave Pierre Decker 5,
1011 Lausanne,
Switzerland

BUT DE L'ETUDE :

Le but de cette étude a donc été d'examiner l'effet de l'exercice physique sur l'activation des récepteurs nucléaires PPAR et leurs implications dans la progression de l'athérosclérose.

Notre hypothèse de travail était que l'exercice physique stimule l'expression des PPAR vasculaire, engendre des effets anti-inflammatoires à l'origine d'une diminution de la progression de l'athérosclérose.

METHODE :

Lors de ce travail, nous avons utilisé des souris ApoE^{-/-}, nourries avec un régime gras pendant 13 semaines et ayant suivi un entraînement de natation (5 fois/semaine ; 50 minutes/jour). Les souris ApoE^{-/-} sont divisées en groupes sédentaires et exercices. Afin de mieux comprendre l'implication du PPAR-γ dans la progression de l'athérosclérose, le groupe exercice présente en plus un groupe supplémentaire des souris traité avec un antagoniste de PPAR-γ : le BADGE ([Bisphenol A Diglycidyl Ether](#)).

En fin de protocole expérimental, nous avons analysé :

- La taille des lésions athéromateuses au niveau de la racine aortique.
- L'expression des ARNm des récepteurs nucléaires PPAR et de son gène cible CD36 a été analysé au niveau de la paroi aortique par RT PCR et l'expression par immunohistochimie de la protéine PPAR-γ dans la plaque d'athérosclérose située au niveau de la racine aortique.
- L'expression des ARNm des cytokines pro-inflammatoires IL-1β, TNF-α et anti-inflammatoires IL-10, IL-1Ra a été analysée au niveau de la paroi aortique par RT PCR. Nous avons également analysées par immunohistochimie, l'expression de la protéine IL-1β au niveau des lésions athéromateuses de la racine aortique.

RESULTATS PRINCIPAUX ET CONCLUSION :

L'exercice physique de natation réduit la progression des lésions athéromateuses. Dans le même temps, l'exercice augmente l'expression des ARNm des PPAR- γ vasculaires et augmente l'expression de la protéine PPAR- γ au niveau de la racine aortique. Par ailleurs, l'exercice physique stimule l'expression du CD36 ce qui témoigne de l'activité transcriptionnelle de PPAR- γ et donc de son activation. L'exercice physique diminue l'expression des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et tend à augmenter l'expression des cytokines anti-inflammatoires IL-1Ra.

De manière intéressante, chez les souris traitées avec le BADGE (inhibiteur de PPAR- γ) on n'observe pas d'effets bénéfiques de l'exercice physique sur les lésions athéromateuses.

Cette étude montre pour la première fois que l'exercice physique de natation permet d'activer les PPAR- γ au niveau vasculaire et que les effets antiathérogènes de l'exercice dépendent de l'activation des PPAR- γ .

Swimming Training Reduces Atherosclerosis Lesions in Apolipoprotein E Deficient Mice (ApoE^{-/-}) Through Increase PPAR-γ Expression and Anti-Inflammatory Effects.

Justyna Szostak^a, Carole Miguët-Alfonsi^b, Maxime Pellegrin^a, Alain Berthelot^b, Karima Bouzourene^a, Jean François Aubert^a, Lucia Mazzolai^a, Pascal Laurant^c

^aService of Vascular Medicine, Department of Internal Medicine, Lausanne University Hospital, CHUV, Switzerland

^bSciences Separatives Biologiques et Pharmaceutiques, UFR STAPS/SMP, University of Franche-Comté, Besançon, France

^cLaboratoire Pharm-Ecologie Cardiovasculaire, UFRip Sciences Technologie et Santé, UAPV, Avignon, France

Corresponding author:

Justyna Szostak
Service of Vascular Medicine,
Department of Internal Medicine,
Lausanne University Hospital,
CHUV,
Ave Pierre Decker 5,
1011 Lausanne,
Switzerland

Abstract

Objective: Physical exercise prevents cardiovascular risk and atherosclerosis lesions. However, the precise mechanisms are still unknown. Vascular Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs) seem to exert anti-atherogenic effects. We assessed the hypothesis that exercise training reduces atherosclerosis in apolipoprotein E deficient (ApoE^{-/-}) mice through PPARs implication and anti-inflammatory effects.

Methods: Male ApoE^{-/-} mice were fed with a high fat diet and randomized into two groups: one trained group underwent exercise training for 3 months, and one sedentary group. Sedentary and trained C57BL/6J mice were used as control. PPAR- α , - β/δ and - γ mRNA were measured by quantitative PCR in aorta. Inflammatory cytokines (IL-10, TNF- α , IL-1 β , IL-1Ra) mRNA were also measured.

Results: Atherosclerotic lesions were significantly lower in aorta from trained ApoE^{-/-} mice. In contrast, exercise in mice supplied with Bisphenol A-Diglycidyl Ether (BADGE), an antagonist of PPAR- γ , did not prevent the appearance of atherosclerotic lesions. Exercise significantly increased expression of PPAR- γ in aorta. PPAR- γ in aortic atherosclerosis lesions was inversely correlated with the atherosclerotic plaque area. Vascular PPAR- β/δ and - α mRNA were not changed in response to exercise training. Atherosclerosis increased the aortic mRNA expression of TNF- α , IL-1 β , IL-10, and IL-1Ra. Swimming training decreased IL-1 β mRNA expression in aorta from ApoE^{-/-} mice, but not the others cytokines. IL-1 β was also significantly lower in aortic atherosclerosis lesions from trained ApoE^{-/-}.

Conclusion: These results are in favour of PPAR- γ participation in the anti-inflammatory and anti-atherogenic effects of physical exercise to prevent progression of atherosclerosis.

Key-words: Peroxisome Proliferator-Activated Receptors – Interleukin – Exercise – Aorta – Inflammation.

Introduction

Atherosclerosis is a long-term chronic disease characterized by the accumulation of lipid and fibrous connective tissue in the arterial wall accompanied by a local inflammatory and immune response. Physical inactivity and sedentary lifestyle are believed to be independent risk factors for the occurrence of metabolic disorders leading to atherosclerosis and cardiovascular complications (1). On the other hand, there is a body of clinical and experimental evidence showing that voluntary and imposed physical exercises prevent the progression of vascular diseases and reduce cardiovascular morbidity and mortality (2, 3). Based on experimental data, it is demonstrated that exercise slows the progression of atherosclerosis in a variety of hypercholesterolemic animal models such as apolipoprotein E deficient (ApoE^{-/-}) and LDL receptor deficient (Ldlr^{-/-}) mice (4-5). Furthermore, exercise prevents conversion of plaques to a vulnerable phenotype, thus preventing the appearance of fatal lesions (6). However, the mechanisms by which physical activity exerts anti-atherogenic effects are not fully understood.

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are ligand-dependent transcription factors of the nuclear hormone receptor superfamily. These nuclear receptors are characterized by their ability to bind to specific DNA sequences and regulate gene expression when activated by ligands. The PPAR subfamily comprises three isoforms PPAR- α , PPAR- β/δ , and PPAR- γ . They are involved in numerous cellular functions, including insulin sensitivity, glucose homeostasis and fatty acid oxidation. Experimental evidence supports a beneficial role for PPARs in atherosclerosis in attenuating the development of this disease. In ApoE^{-/-} mice, activation and overexpression of PPAR (especially PPAR- γ) attenuate atherosclerosis progression and stabilizes vulnerable plaques (7, 8). PPARs activation reduces leukocyte recruitment and cell adhesion, down-regulates matrix metalloproteinases (MMP), tissue factor and PAI-1 expression suggesting that PPARs activation prevents plaque rupture and atherothrombosis events subsequent to plaque rupture (9-11). PPARs have also anti-inflammatory properties. They inhibit the expression of genes coding for range of pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-6, IL-1 β and MCP-1 (12, 13).

PPARs enable the cell to respond to extracellular stimuli such as steroids, fatty acids and xenobiotics through transcriptional regulation of gene expression. Less is known about the effect of exer-

cise as stimulus. PPAR family may represent a new target for pharmacological intervention in chronic diseases, in order to counter-regulate signalling pathways involved in the initiation of inflammation. Therefore, it would be of interest to know whether the athero-protective effect of exercise training is accompanied by change in vascular PPARs expression in ApoE^{-/-} mice.

Methods

Animals

Three-month-old male C57BL/6 (Wild Type) control mice and homozygous ApoE^{-/-} mice were used (Charles Rivers Laboratories, L'Arbresle, France). Animal care and experimental procedures were conducted in compliance with the European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes (European Union Directive 86/609EEC, 1986). ApoE^{-/-} mice were backcrossed to the C57BL/6 genetic background for at least eight generations. Mice were maintained on a 12h light-dark at 21°C, and free access to food and water through the study. ApoE^{-/-} mice were fed with a lipid-rich Western-type diet containing 0.2% cholesterol (UAR, Epinay-sur-Orge, France) to accelerate the development and progression of spontaneous atherosclerotic lesions (4). Mice were randomized into four groups and were submitted to experimental protocol for 3 months.

Sedentary control group (WTsed) on a normal mouse chow.

1. Exercise control group (WTex) on a normal mouse chow.
2. Sedentary ApoE^{-/-} group (ApoE^{-/-}sed) on the lipid rich Western diet containing 0.2% cholesterol.
3. Exercise ApoE^{-/-} group (ApoE^{-/-}ex) on the lipid rich Western diet containing 0.2% cholesterol.

In one set of experiment, ApoE^{-/-} mice were submitted to the same training protocol and concomitantly supplied with Bisphenol A-Diglycidyl Ether **4,4'-ISOPROPYLIDENEDIPHENOL DIGLYCIDYL ETHER** (BADGE), a PPAR-γ specific antagonist (**SIGMA-ALDRICH CHEMIE**, L'Isle d'Abeau Chesnes, France). BADGE (2 g/kg/day) was dispensed in mouse chow.

Exercise protocol

Mice in the exercise groups underwent a 3-month endurance swimming program (5 days/week) in water at 35-36°C. To allow for acclimatization, the length of swimming time was gradually increased be-

ginning with a 30 minute training period at 1 week and ending with a 60 min training period after 3 weeks (4). Mice were towel-dried after each training session. At the end of the experimental protocol, mice were anesthetized with isoflurane. Blood samples were drawn from the retro-orbital sinus for measurement of lipid concentrations. Aorta was taken, cleaned and placed into individual sterile polyethylene tubes. Samples were immediately quenched in liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis.

Histology and quantification of plaque size

Aortic sinus were fixed in 4% paraformaldehyde and then embedded in paraffin. They were serially cut into 3 μm sections and processed for light microscopy using standard Movat pentachrome staining. The middle sections of the biggest atherosclerosis plaque were used for atherosclerosis quantification after staining with Movats pentachrome. The preceding and following 3- μm -thick sections were used for immunohistochemistry. The cross-sectional area of the intima (total area between the lumen and the internal elastic lamina) was measured by using a digitizing morphometry image-analysis system Qwin software (Leica DC Camera, Leica system). The surface areas covered by fatty streak lesions at 3 months were quantified in oil red-O-stained samples, and specimen from exercise treated mice were compared with those from exercise untreated control or supplemented with PPAR- γ antagonist. Stained lesions were quantified with image-analysis system Qwin software (Leica DC Camera, Leica system).

Immunohistochemistry

Serial 3- μm paraffin sections of aortic sinus were dewaxed and rehydrated. Endogenous peroxidase activity was inhibited by incubation with 3% hydrogen peroxide. After blocking sections with 20% goat serum in phosphate-buffered saline, sections were incubated 5 hours at 37°C with mouse PPAR- γ (sc-7273 SantaCruz Biotechnology 1:50), rabbit IL-1 β (sc-7884 Santacruz Biotechnology 1:50 Santa Cruz SA). Sections were then washed and incubated with the appropriate biotinylated secondary antibodies. The activity of peroxidase was revealed with diaminobenzidine (Vector Peroxidase Substrat Kit). Slides were counterstained with Mayer's hematoxiline and mounted with EukittTM mounting medium. Positive areas were counted Qwin software (Leica DC Camera, Leica system) and expressed

as percentage of the whole plaque area. Negative control, included section with the IGg of another species.

Real-Time Polymerase Chain Reaction

Total RNA was isolated and purified from aorta using RNeasy® Fibrous Tissue kit according to the manufacturer's protocol. Total RNA quantity, purity were assessed by OD260/280 absorbance measurements. The isolated 500 ng RNA was converted into cDNA, by use "i Script cDNA Synthesis Kit" (BIO-RAD). Incubation was realized using thermo cycler (5min 25°C, 30min 42°C and 5min 85°C). Real-time PCR was carried out by using the CFX96 system (BIORAD). Concentration scale was realized. Reaction was performed in the 96-well format with free water, 0.3pmol/μl of forward and reverse primer and 12.5μl of syber green SYBER Green (BIORAD) SYBER Green PCR Mastermix. Protocol start by denaturation cycle at 95°C for 3 min, cycle 2 followed by 40PCR cycles 95°C for 10sec follow of 1minute to 60°C, cycle 3 95°C for 1 min, followed by step 4 1min to 60°C and cycle 5 80 PCR cycles consisting of 10 sec to 60°C and ultimate cycle 20°C as cold. 36b4 was used as a control to account for any variation due to efficiencies of reverse transcription and PCR and has previously been shown to remain stable (14). For confirming the amplification specificity, the PCR product was subjected to a melting curve analysis. Gene were expressed as mRNA level normalized to a standard housekeeping gene (36B4) using the delta CT method. The primer sequences are the following:

NM-001144 PPAR- α 5'-TATTCGGCTGAAGCTGGTGTAC-3' 5'-CTGGCATTGTTCGGTTCT -3'

NM-011145 PPAR- β 5'-TTGAGCCCAAGTTCGAGTTTG -3' 5'-CGGTCTCCACACAGAATGATG -3'

NM-001146PPAR γ 5'CACAATGCCATCAGGTTTGG3'5'GCTGGTCGATATCACTGGAGATC-3'

NM-007475 36B4 5'-ATGGGTACAAGCGCGTCCTG-3' 5'-GCCTTGACCTTTTCAGTAAG-3'

NM-013693 TNF- α 5'-TCAGCAAGGACAGCAGAGGAC-3' 5'-TGGAGCCGTGGGTCAGTATG-3'

NM-008361 IL-1 β 5'-TCGCAGCAGCACATCAACAAG-3'5'-TCCACGGGAAAGACACAGGTAG-3'

NM-001039701 IL-1Ra 5'-TTCTTGTTGCCTCTGCCACTCG-3'5'-GATTGGTCTGGACTGTGGAAGTG-3'

NM-010548 IL-10 5'-GCACTACCAAAGCCACAAAGC-3' 5'-GTCAGTAAGAGCAGGCA-3'

NM-001159555 CD36 5'-CCTCCAAACACAGCCAGGAC-3' 5'-CCGGGCCACGTAGAAAACA -3'

Skeletal muscle oxidative enzyme activity

The activity of citrate synthase, a representative inducible mitochondrial enzyme, as an indicator of muscle oxidative capacity, was measured in gastrocnemius muscle. Maximal citrate synthase activity was assayed spectrophotometrically on muscle homogenates as previously described (15).

Lipids measurements

Blood samples were collected in test tubes containing heparin and were centrifuged at 4000 tr/min for 10 min. Plasma was stored at -80°C until assayed. Total cholesterol, triglyceride, and high-density lipoprotein (HDL) cholesterol levels were determined enzymatically (ADVIA® 1650).

Statistical analysis

Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M. Comparisons of single means from multiple groups were made by two-way ANOVA followed by Tukey's test. Significance was considered present when probability values were <0.05 . The statistical software XLSTAT was used for analysis.

Results

Quantification of physical activity and lipid levels

Body weight was significantly greater in ApoE^{-/-} sed mice than WT sed mice ($p < 0.05$). Physical exercise did not change body weight in WT mice. However, it was significantly smaller in ApoE^{-/-} ex mice compared to ApoE^{-/-} sed mice ($p < 0.05$).

Citrate synthase activity in gastrocnemius muscle was significantly increased in response to the exercise training in both WT and ApoE^{-/-} groups ($p < 0.05$). Citrate synthase activity was not affected by genotype mouse (Table 1).

Plasma levels of total cholesterol, LDL-cholesterol and triglycerides were significantly greater in ApoE^{-/-} mice than WT mice ($p < 0.05$) (Table 1). Plasma HDL-cholesterol was however significantly lower in ApoE^{-/-} sed mice compared to WT sed mice ($p < 0.05$). Exercise training had no effect on total cholesterol, LDL- and HDL-cholesterol concentrations in both WT and ApoE^{-/-} mice. However, training significantly reduced the level of triglycerides in comparison to sedentary groups ($p < 0.05$).

Effect of exercise training on Atherosclerosis lesion area

Histological examination of aorta revealed the absence of atherosclerotic lesions in the aortic roots of WT mice, whereas ApoE^{-/-} mice developed atheromatous plaques. Aortic root plaque area was significantly lower in ApoE^{-/-} ex as compared to ApoE^{-/-} sed mice ($p < 0.05$) (Fig 1A). Similar decrease of atherosclerosis lesions in ApoE^{-/-} exercised mice were found in oil red O-stained samples (Fig.1B). Atherosclerotic lesions size was similar between ApoE^{-/-} ex mice supplemented with BADGE and ApoE^{-/-} sed mice.

PPAR expression and activation in aorta

Atherosclerosis and/or training did not significantly modify aortic PPAR- α and - β mRNA expression in arterial wall. PPAR- γ mRNA expression was not different between WT and ApoE^{-/-} mice. However, swimming training significantly increased PPAR- γ expression in both: WT and ApoE^{-/-} mice ($p < 0.05$) (Fig 2A). A positive correlation was found between PPAR- γ and CD36 mRNA ($p < 0.001$) (Fig 2B). PPAR- γ protein was present in atherosclerosis lesion of the aorta and immunohistochemical

staining revealed that PPAR- γ was increased by 57% in response to training in ApoE^{-/-} mice (Fig.3A). PPAR- γ mRNA expression in aortic atherosclerosis lesions was significantly and inversely correlated with the size of atherosclerosis lesion ($p < 0.05$) (Fig.3B).

Effect of exercise on cytokines levels in Aorta

Atherosclerosis increased the aortic mRNA ratio of the pro-inflammatory cytokines TNF- α (5fold) and IL-1 β (10 fold), and the anti-inflammatory IL-10 and IL-1Ra (Fig 4). Swimming training did not change aortic mRNA TNF- α , IL-10 and IL-1Ra expression. IL-1 β mRNA expression was, however, significantly lower in aorta from ApoE^{-/-}ex than in ApoE^{-/-}sed. Exercise did not modify IL-1 β mRNA expression in WT mice (Fig.4). To confirm qPCR data, we also measured tissue protein IL-1 β level in aortic atherosclerosis lesions. IL-1 β was significantly lower in aorta from ApoE^{-/-}ex mice compared to ApoE^{-/-}sed mice ($p < 0.01$) (Fig.5).

DISCUSSION

In the present study, it is shown that swimming training prevents atherosclerosis progression in ApoE^{-/-} mice and stimulates expression of vascular PPAR-γ whose anti-atherogenic and anti-inflammatory effects seem to be well-established. Furthermore, it is noteworthy that the athero-protective effect of training requires necessarily PPAR-γ since aortic atherosclerotic lesions were not prevented in trained ApoE^{-/-} mice treated with BADGE.

Compelling evidence shows that physical activity is clearly effective in primary and secondary prevention of cardiometabolic and atherosclerotic cardiovascular diseases (16). Physical exercise attenuates the cardiovascular risk of morbidity and mortality by reducing all the atherosclerotic risk factors such as elevated blood pressure, insulin resistance and glucose intolerance, decreased HDL-cholesterol concentrations, elevated LDL-cholesterol and triglyceride concentrations, and obesity (3). Based on experimental data, it is demonstrated that exercise slows the progression of atherosclerosis in a variety of hypercholesterolemic animal including ApoE^{-/-} mice, promotes plaque stabilization and prevents plaque rupture (4-6, 17). It is noteworthy that exercise prevents plaque vulnerability and atherosclerosis progression without necessarily correcting classic risk factors such as high blood pressure, dyslipidemia, and high caloric intake (6), suggesting that exercise can directly act on endothelium and vascular wall and affect plaque composition and phenotype.

The precise molecular mechanisms behind the athero-protective effect of exercise are largely unknown. Among molecules potentially candidate, PPARs appears to be important transcription factors that regulate lipid and lipoprotein metabolism, glucose homeostasis, hemostasis and the inflammatory response, and are involved in atherosclerosis progression (18). In the present study, aortic PPAR-α and -β mRNA expression are not changed by exercise and atherosclerosis. However, vascular mRNA expression of PPAR-γ is increased with training in both wild-type and ApoE^{-/-} mice. It is also shown that protein expression of PPAR-γ is greater in existing atherosclerotic plaque from trained ApoE^{-/-} than in those from sedentary ApoE^{-/-} mice and is inversely related to the atherosclerotic lesion size. These data are in accordance with others showing that activation of PPAR-γ by synthetic agonists, such as thiazolidinediones, increases its expression and reduces atherosclerosis in ApoE^{-/-} and Ldlr^{-/-} mice (19, 20). Recently, it has been shown that PPAR-γ1 gene therapy not only reduces plaque

size but also reverses plaque instability in ApoE^{-/-} mice (7) indicating that PPAR-γ is effective against atherosclerosis. In the present study, the fact that the beneficial effect of swimming training against the progression of atheroma did not appear when ApoE^{-/-} mice received BADGE, a specific PPAR-γ antagonist, strongly suggests that PPAR-γ might play a pivotal role in the athero-protective effect of training.

PPAR-γ is expressed by endothelial cells. Strong evidence supports the importance of laminar flow or shear stress applied on endothelial cells, to sustain a natural anti-atherogenic phenotype of endothelial cells and prevent atherosclerosis development (21). Elevation of shear stress contributes to preserve bioavailability of nitric oxide (NO) - a critical mediator in the maintenance of normal vascular biology – via stimulation of endothelial mechano-receptors and activation of an anti-atherogenic cascade, the akt/eNOS signaling pathway (22). It has been shown that shear stress applied on endothelial cells activates Peroxisome Proliferator Response Element (PPRE), leading to the increased expression of PPAR-γ target genes such as CD36 and suppression of cytokine-induced NF-κB activation (23). Furthermore, studies show that PPAR-γ agonists stimulate the endothelial akt/eNOS signalling pathway phosphorylation and production of NO (24, 25), and improve impaired endothelial function (26). All these findings suggest that elevation of shear stress by exercise may directly stimulate endogenous endothelial PPAR-γ which modulates expression of genes leading to anti-inflammatory and anti-atherogenic effects.

In atherosclerotic lesions and activated macrophages, PPAR-γ is markedly expressed. In the vessel wall, PPAR-γ seems to decrease accumulation of atherogenic oxidised LDL-cholesterol by increasing both macrophage uptake and efflux via upregulation of CD36 gene (27). It also inhibits the monocyte activity of NF-κB, transcription factor (13). Furthermore, PPAR-γ promotes differentiation of pro-atherogenic M1 macrophages into an alternative anti-inflammatory phenotype M2 in human atherosclerotic lesions (28). PPAR-γ agonists reduce monocyte/macrophage secretion and gene expression of specific M1-phenotype cytokines (TNF-α, IL-1β), and increase M2-phenotype markers (mannose receptor CD206, CD36, Arginase-1) (28-29). In the present study, swimming exercise is able to decrease aortic mRNA expression and protein production of IL-1β in atherosclerotic lesions of ApoE^{-/-} mice. Furthermore, it is demonstrated a significant positive relation between PPAR-γ and CD36 mRNA

expressions in aorta. Recently, it has been shown that exercise increases human leukocytes PPAR- γ activation and up-regulates markers providing from M2 macrophages and down-regulated those from M1 markers (30). The same authors propose an association between PPAR- γ activation and M2 macrophage polarisation during exercise, and suppression of pro-inflammatory signalling. All these findings clearly support the notion that exercise can modify phenotype of monocytes/macrophages subpopulations by a biological mechanism which remains to determine. Although others studies are needed, it is speculate that exercise, via cellular PPAR- γ activation, can mediate macrophage activity and function which could protect against the development of atherosclerosis and plaque vulnerability.

In conclusion, swimming training prevents atherosclerosis lesion progression through PPAR- γ activation. It is shown that the protective effects of exercise are linked to the up-regulation of PPAR- γ mRNA in arterial wall, which could initiated local anti-inflammatory and anti-atherogenic effects.

REFERENCES

1. Booth FW, Laye MJ, Lees SJ, Rector RS, Thyfault JP: Reduced physical activity and risk of chronic disease: the biology behind the consequences. *Eur J Appl Physiol* 2008, 102:381-390.
2. Joyner MJ, Green DJ: Exercise protects the cardiovascular system: effects beyond traditional risk factors. *J Physiol* 2009, 587:5551-5558.
3. Thompson PD: Exercise and physical activity in the prevention and treatment of atherosclerotic cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003, 23:1319-1321.
4. Pellegrin M, Berthelot A, Houdayer C, Gaume V, Deckert V, Laurant P: New insights into the vascular mechanisms underlying the beneficial effect of swimming training on the endothelial vasodilator function in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis* 2007, 190:35-42.
5. Ramachandran S, Penumetcha M, Merchant NK, Santanam N, Rong R, Parthasarathy S: Exercise reduces preexisting atherosclerotic lesions in LDL receptor knock out mice. *Atherosclerosis* 2005, 178:33-38.
6. Pellegrin M, Alonso F, Aubert JF, Bouzourene K, Braunersreuther V, Mach F, Haefliger JA, Hayoz D, Berthelot A, Nussberger J, et al.: Swimming prevents vulnerable atherosclerotic plaque development in hypertensive 2-kidney, 1-clip mice by modulating angiotensin II type 1 receptor expression independently from hemodynamic changes. *Hypertension* 2009, 53:782-789.
7. Hu Q, Zhang XJ, Zhang C, Zhao YX, He H, Liu CX, Feng JB, Jiang H, Yang FL, Zhang CX, et al.: Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma1 gene therapy attenuates atherosclerosis and stabilizes plaques in apolipoprotein E-deficient mice. *Hum Gene Ther* 2008, 19:287-299.
8. Levi Z, Shaish A, Yacov N, Levkovitz H, Trestman S, Gerber Y, Cohen H, Dvir A, Rhachmani R, Ravid M, et al.: Rosiglitazone (PPARgamma-agonist) attenuates atherogenesis with no effect on hyperglycaemia in a combined diabetes-atherosclerosis mouse model. *Diabetes Obes Metab* 2003, 5:45-50.
9. Shu H, Wong B, Zhou G, Li Y, Berger J, Woods JW, Wright SD, Cai TQ: Activation of PPARalpha or gamma reduces secretion of matrix metalloproteinase 9 but not interleukin 8 from human monocytic THP-1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000, 267:345-349.
10. Fruchart JC: Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPARalpha): at the crossroads of obesity, diabetes and cardiovascular disease. *Atherosclerosis* 2009, 205:1-8.
11. Hamblin M, Chang L, Fan Y, Zhang J, Chen YE: PPARs and the cardiovascular system. *Antioxid Redox Signal* 2009, 11:1415-1452.
12. Delerive P, De Bosscher K, Besnard S, Vanden Berghe W, Peters JM, Gonzalez FJ, Fruchart JC, Tedgui A, Haegeman G, Staels B: Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1. *J Biol Chem* 1999, 274:32048-32054.
13. Jiang C, Ting AT, Seed B: PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* 1998, 391:82-86.
14. Akamine R, Yamamoto T, Watanabe M, Yamazaki N, Kataoka M, Ishikawa M, Ooie T, Baba Y, Shinohara Y: Usefulness of the 5' region of the cDNA encoding acidic ribosomal phosphoprotein P0 conserved among rats, mice, and humans as a standard probe for gene expression analysis in different tissues and animal species. *J Biochem Biophys Methods* 2007, 70:481-486.
15. Serre PA. Citrate synthase. In: Lowenstein JM, editor. *Methods in Enzymology*. Vol. 13. New York, NY: Academic Press; 1969. p. 3.
16. Hambrecht R, Walther C, Mobius-Winkler S, Gielen S, Linke A, Conradi K, Erbs S, Kluge R, Kendrick K, Sabri O, et al.: Percutaneous coronary angioplasty compared with exercise training in patients with stable coronary artery disease: a randomized trial. *Circulation* 2004, 109:1371-1378.
17. Napoli C, Williams-Ignarro S, de Nigris F, Lerman LO, D'Armiento FP, Crimi E, Byrns RE, Casamassimi A, Lanza A, Gombos F, et al.: Physical training and metabolic supplementation reduce spontaneous atherosclerotic plaque rupture and prolong survival in hypercholesterolemic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, 103:10479-10484.
18. Robinson E, Grieve DJ: Significance of peroxisome proliferator-activated receptors in the cardiovascular system in health and disease. *Pharmacol Ther* 2009, 122:246-263.
19. Chen Z, Ishibashi S, Perrey S, Osuga J, Gotoda T, Kitamine T, Tamura Y, Okazaki H, Yahagi N, Iizuka Y, et al.: Troglitazone inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice: pleiotropic effects on CD36 expression and HDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001, 21:372-377.
20. Collins AR, Meehan WP, Kintscher U, Jackson S, Wakino S, Noh G, Palinski W, Hsueh WA, Law RE: Troglitazone inhibits formation of early atherosclerotic lesions in diabetic and nondiabetic low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001, 21:365-371.

21. Szostak J, Laurant P: The forgotten face of regular physical exercise: a 'natural' anti-atherogenic activity. *Clin Sci (Lond)* 2011, 121:91-106.
22. Laughlin MH, Newcomer SC, Bender SB: Importance of hemodynamic forces as signals for exercise-induced changes in endothelial cell phenotype. *J Appl Physiol* 2008, 104:588-600.
23. Liu Y, Yin G, Surapisitchat J, Berk BC, Min W: Laminar flow inhibits TNF-induced ASK1 activation by preventing dissociation of ASK1 from its inhibitor 14-3-3. *J Clin Invest* 2001, 107:917-923.
24. Calnek DS, Mazzella L, Roser S, Roman J, Hart CM: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands increase release of nitric oxide from endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003, 23:52-57.
25. Cho DH, Choi YJ, Jo SA, Jo I: Nitric oxide production and regulation of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation by prolonged treatment with troglitazone: evidence for involvement of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma-dependent and PPARgamma-independ. *J Biol Chem* 2004, 279:2499-2506.
26. Yu J, Zhang Z, Li Z, Feng X, He L, Liu S, Mao J, Wang G, Wang X: Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma(PPARgamma) agonist improves coronary artery endothelial function in diabetic patients with coronary artery disease. *J Int Med Res* 2010, 38:86-94.
27. Zhang L, Chawla A: Role of PPARgamma in macrophage biology and atherosclerosis. *Trends Endocrinol Metab* 2004, 15:500-505.
28. Bouhrel MA, Derudas B, Rigamonti E, Dievart R, Brozek J, Haulon S, Zawadzki C, Jude B, Torpier G, Marx N, et al.: PPARgamma activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties. *Cell Metab* 2007, 6:137-143.
29. Charo IF: Macrophage polarization and insulin resistance: PPARgamma in control. *Cell Metab* 2007, 6:96-98.
30. Yakeu G, Butcher L, Isa S, Webb R, Roberts AW, Thomas AW, Backx K, James PE, Morris K: Low-intensity exercise enhances expression of markers of alternative activation in circulating leukocytes: roles of PPARgamma and Th2 cytokines. *Atherosclerosis* 2010, 212:668-673.

Table 1:

	Body Weight (g)	Total cholesterol (g/L)	HDL-chol (g/L)	LDL-chol (g/L)	Triglycerides (g/L)	Citrate Synthase Activity (μ mol/min/g)
WT SED	26.7 $\pm$ 0.2	1 $\pm$ 0.1	0.5 $\pm$ 0.1 ^{∞}	0.3 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.1	87.5 $\pm$ 5.1 ^{∞}
WT EX	25.1 $\pm$ 0.4	0.8 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.1	111.4 $\pm$ 1.6
APO E ^{-/-} SED	34.6 $\pm$ 0.5 [*] ^{∞}	11.3 $\pm$ 0.9 [*]	0.1 $\pm$ 0.1 [*]	10.9 $\pm$ 0.9 [*]	1.6 $\pm$ 0.2 [*] ^{∞}	88.8 $\pm$ 1.3 ^{∞}
APO E ^{-/-} EX	28.5 $\pm$ 0.2 [*]	9.2 $\pm$ 0.8 [*]	0.1 $\pm$ 0.1 [*]	8.8 $\pm$ 0.8 [*]	1.2 $\pm$ 0.1 [*]	119.98 $\pm$ 3.33

Table 1: Body Weight, Lipid profile (g/l) and Citrate Synthase Activity measured in sedentary (WT SED), trained (WT EX) C57BL/6 control mice, sedentary (ApoE^{-/-} SED) and trained (ApoE^{-/-} EX) ApoE^{-/-} mice. (n=8 to 12 mice per group) *p<0.05 versus WT groups; ^{∞} p<0.05 versus corresponding exercise group.

Figure 1:

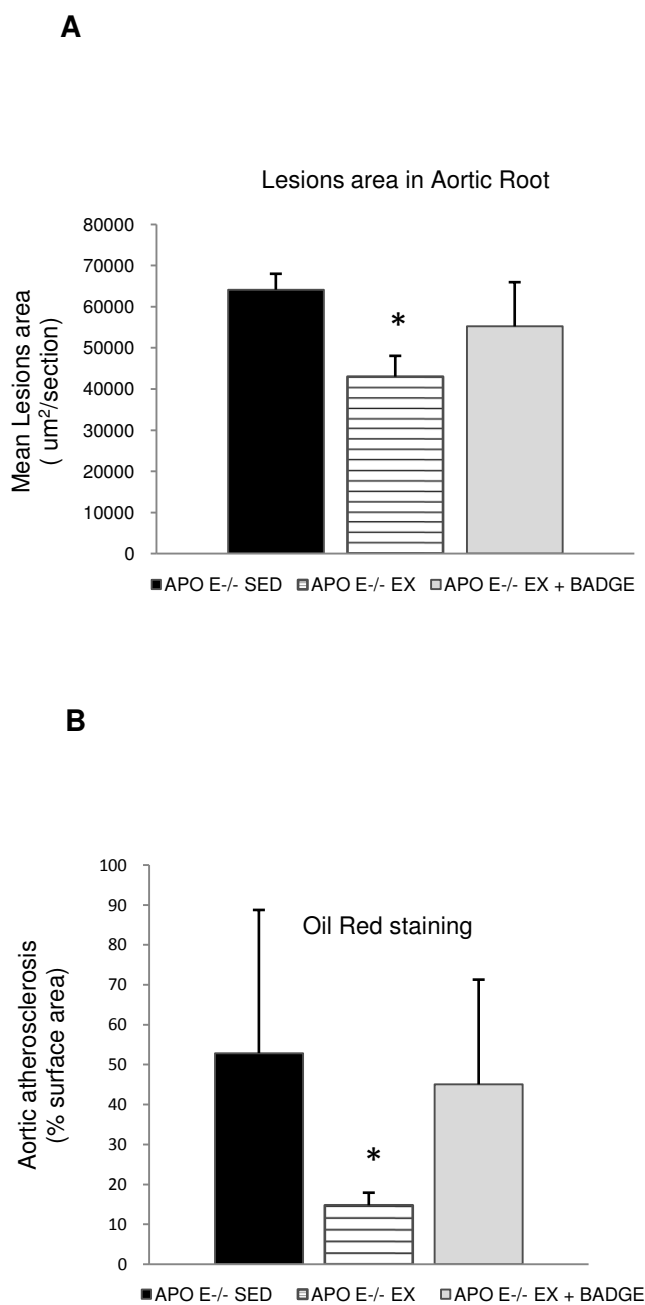
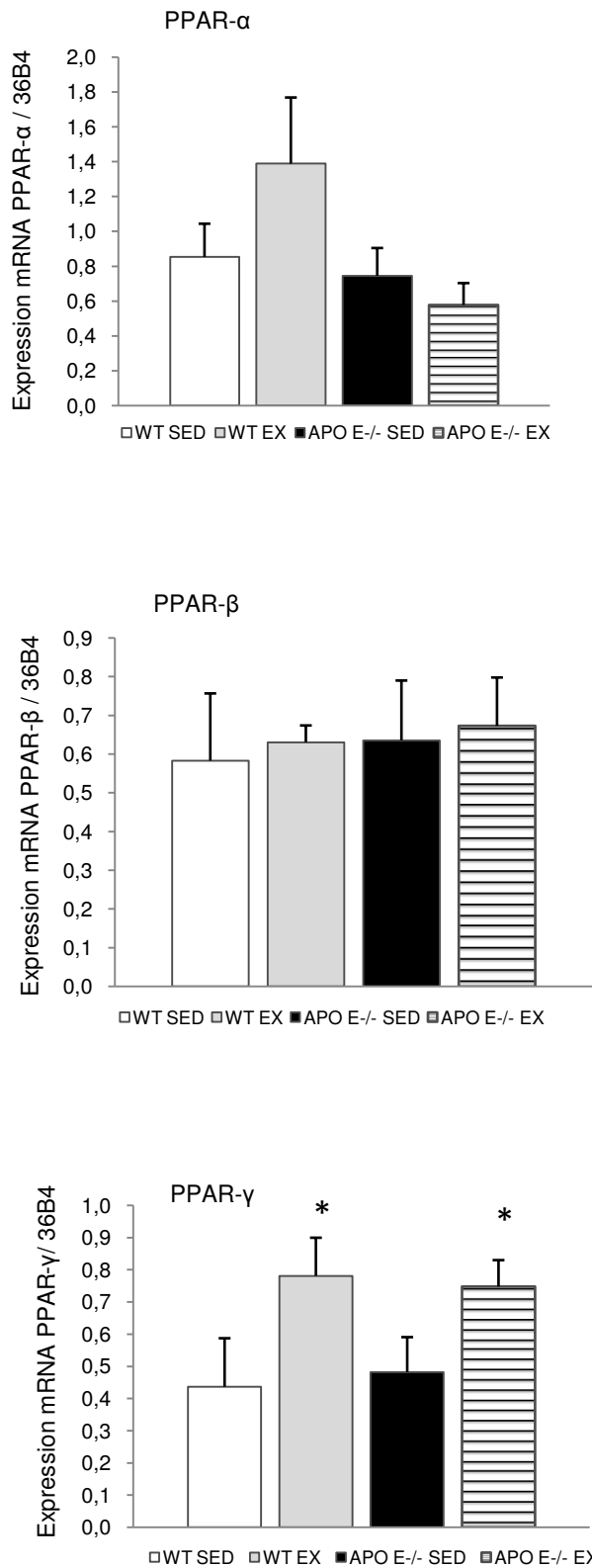


Figure 1: (A) Effect of exercise training on extension of atherosclerotic lesions measured by Movats staining in aortic sinus (n=5 to 7 mice per group) and (B) extension of ATH measured by oil-red-stained percentages of plaques over the total surface area of aorta (n=3 to 4 per group) from sedentary (ApoE^{-/-} SED), trained (ApoE^{-/-} EX), and trained ApoE^{-/-} EX mice treated with BADG *p<0.05 versus ApoE^{-/-} sed mice.

Figure 2:

A



B

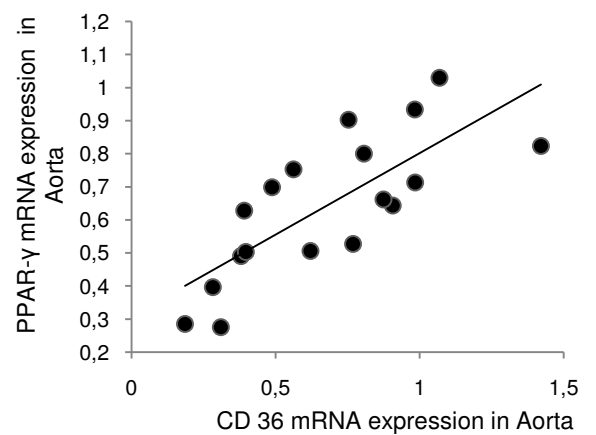
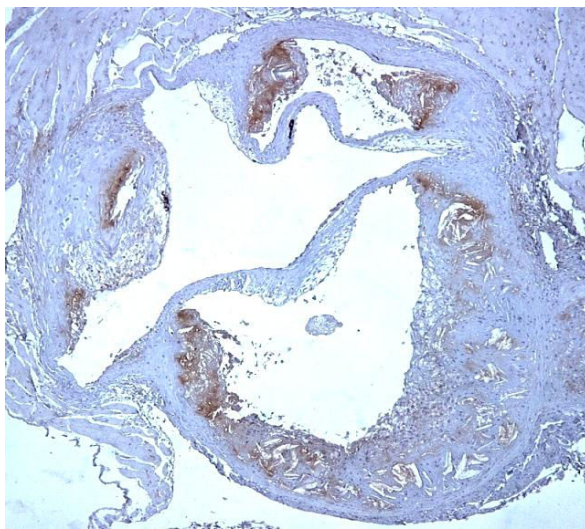
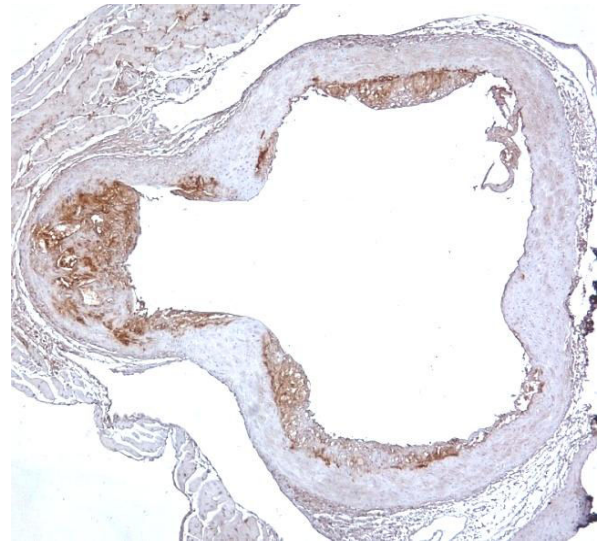


Figure 2: A) Effect of exercise training on mRNA expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR-α, PPAR-β, PPAR-γ) in arterial wall of sedentary (WT SED), trained (WT EX) wild type mice, and sedentary (ApoE^{-/-}SED) and trained (ApoE^{-/-}EX) ApoE^{-/-} mice. B) Positive correlation between PPAR-γ and CD36 mRNA expression in arterial wall $p < 0.05$ ($n = 4$ to 7 per group).

Figure 3:



ApoE^{-/-} SED



ApoE^{-/-} EX

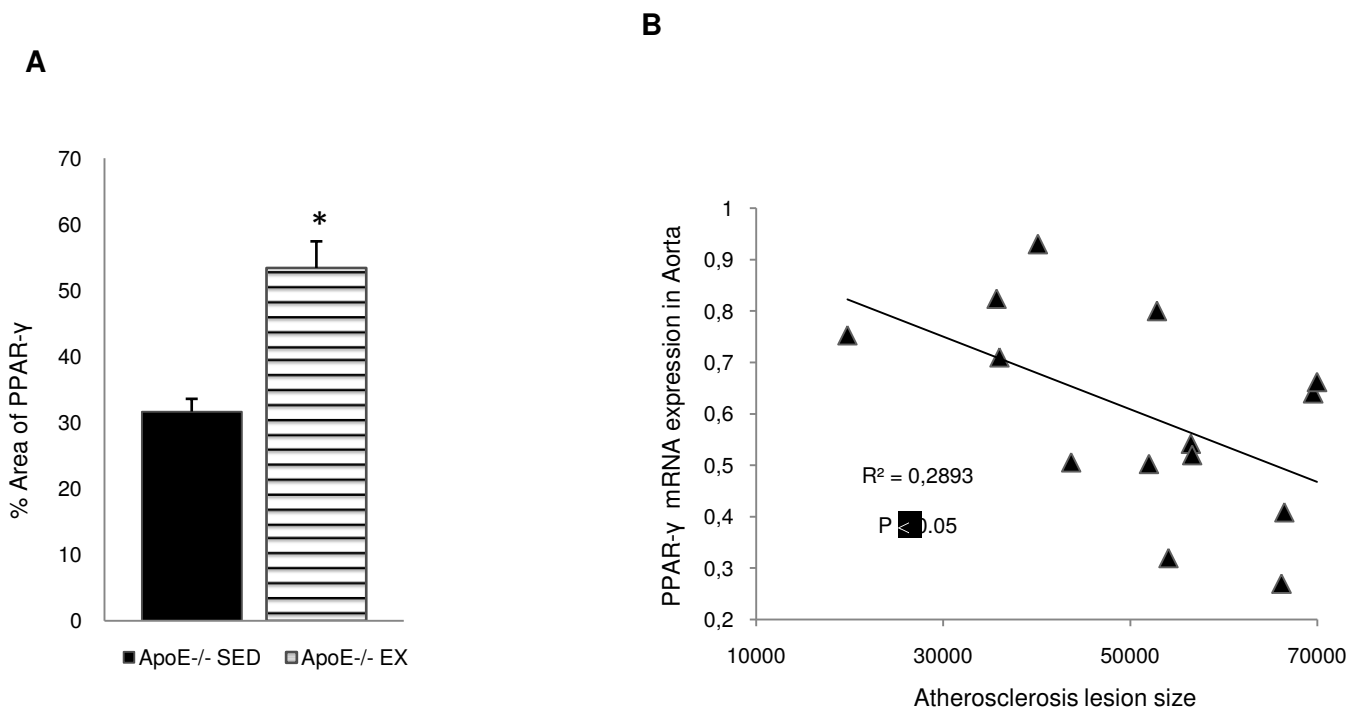


Figure 3: A) Effect of exercise training on PPAR-γ protein expression in atherosclerosis lesions within aortic sinus of sedentary (ApoE^{-/-}SED) and trained (ApoE^{-/-}EX) ApoE^{-/-} mice *p<0.01 versus sedentary group. B) Pearson negative correlation between PPAR-γ mRNA expression and atherosclerotic lesions extension p<0.05 (n=5 to 8 per group).

Figure 4:

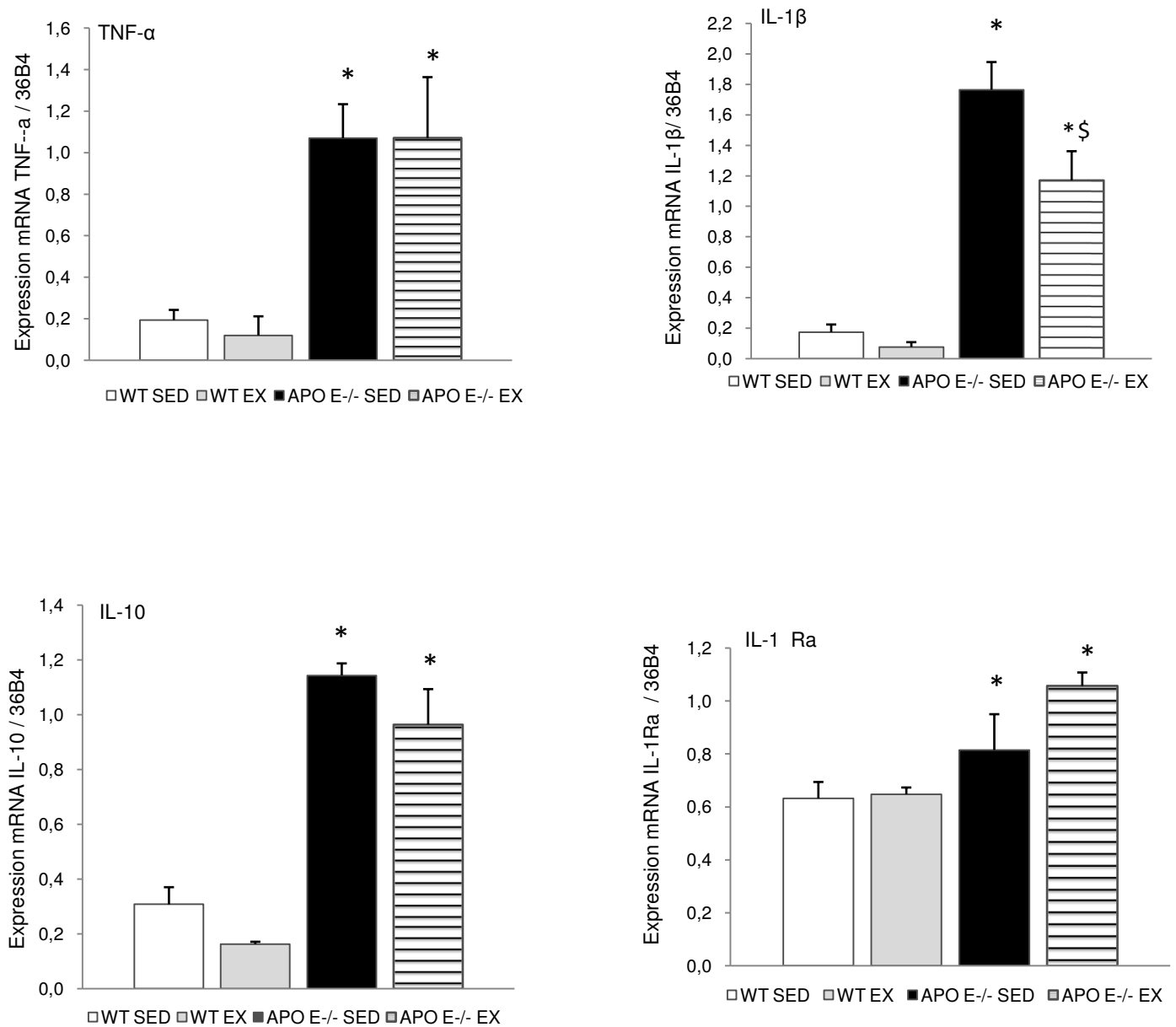


Figure 4: Effect of exercise training on pro-inflammatory (TNF-α, IL-1β) and anti-inflammatory (IL-10, IL-1Ra) cytokines mRNA expression in arterial wall of sedentary (WT SED), trained (WT EX) wild type mice, and sedentary (ApoE^{-/-}SED) and trained (ApoE^{-/-}EX) ApoE^{-/-} mice *p<0.01 versus respective control group; §p<0.01 versus ApoE^{-/-} SED group (n=4 to 7 per group).

Figure 5:

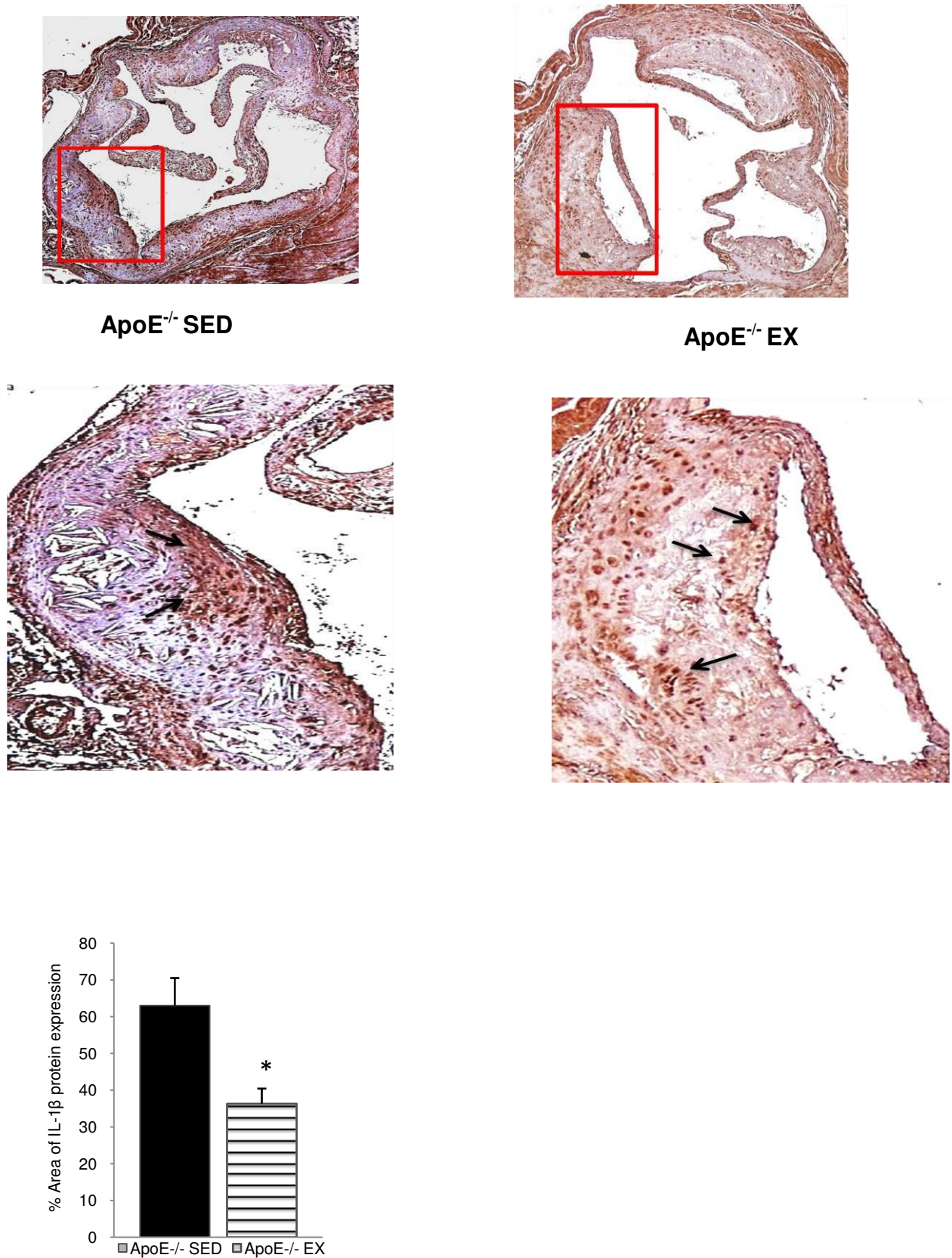


Figure 5: Effect of exercise training on IL-1 β protein expression in aortic root of atherosclerosis lesions of sedentary (ApoE^{-/-} SED) and trained (ApoE^{-/-} EX) ApoE^{-/-} mice *p<0.01 versus sedentary group. Black arrow shows a positive staining for IL-1 β in atherosclerosis lesions (n=5 to 8 per group).

DEUXIEME PARTIE:

Type of exercise training differently influences atherosclerosis progression and inflammatory markers in a mouse model of advanced atherosclerosis

Justyna Szostak^{a,b}, Karima Bouzourene^a, Jean François Aubert^a, Alain Berthelot^b, Juerg Nussberger^a, Pascal Laurant^c, Lucia Mazzolai^a

^aService of Vascular Medicine, Department of Internal Medicine, Lausanne University Hospital, CHUV, Switzerland

^bSciences Separatives Biologiques et Pharmaceutiques, UFR STAPS/SMP, University of Franche-Comté, Besançon, France

^cLaboratoire Pharm-Ecologie Cardiovasculaire, UFRip Sciences Technologie et Santé, UAPV, Avignon, France

Corresponding author:

Lucia Mazzolai

Division of Angiology, Lausanne University Hospital, Lausanne, Switzerland

Tel: +41-21-3140750

Fax: +41-21-3140761

e-mail: lucia.mazzolai@chuv.ch

BUT DE L'ETUDE :

Le but de cette étude était d'étudier le rôle des différents types d'exercice physique (volontaire et soumis) sur la progression et la stabilité des lésions athéromateuses en comparaison à un traitement pharmacologique de type inhibiteur du SRA : Le *Telmisartan*, un antagoniste des récepteurs AT1.

Nous supposons que l'exercice physique permet de réduire et stabiliser la progression des lésions athéromateuses d'une manière comparable à ce qu'un traitement pharmacologique Telmisartan pourrait induire. Nous supposons que l'activation du récepteur nucléaire PPAR- γ , au niveau vasculaire, pourrait être responsable en partie des bénéfices observés.

METHODE :

Lors de cette étude nous allons utiliser les souris ApoE^{-/-} 2K1C :

Les souris 2K1C seront randomisées en groupes sédentaires, exercice ou traitement pharmacologique, pendant une période de 5 semaines.

- Le groupe contrôles représenté par des souris sédentaires sans accès à l'exercice physique.

- Le groupe exercice qui comprend :

- un groupe de souris soumises à un protocole d'exercice de course (5 fois/semaine, 60min/jour) sur tapis à une vitesse de 14 m/min (ce qui correspond à 50-60 % de la VO₂Max). Les capacités de Vo₂ Max des souris ont été déterminées préalablement en collaboration avec le **Metabolic Evaluation Facility (MEF)**, au Centre Intégré de Génomique (CIG) à l'Université de Lausanne. Le protocole consistait à placer la souris dans une cage calorimétrique étanche, équipé d'un tapis de course individuelle incliné à 25° et relié à des capteurs de mesures d'oxygène O₂ et de dioxyde de carbone CO₂. Les mesures de O₂ et de CO₂ ont été réalisées toutes les minutes (model CT-2, Columbus Instrument). Les valeurs basales de O₂ et CO₂ ont été prélevées après une période d'acclimatation de 15 minutes. Le protocole démarre par une vitesse de 5m/min, augmentée toutes

les deux minutes de 3m/min jusqu'à épuisement. La fin du protocole était achevée lorsque la souris ne parvenait plus à se réengager sur le tapis de course.

-un groupe de souris ayant à leurs dispositions une roue d'entraînement dans la cage avec un libre accès à la roue.

- Le groupe traitement pharmacologique : les souris seront traitées pendant 5 semaines avec un inhibiteur des récepteurs AT1 : Telmisartan (*Micardis® Boehringer Ingelheim 80mg*). La dose de 25 mg/kg/day était délivrée dans la boisson.

En fin de protocole expérimental, nous avons mesuré :

- Les paramètres hémodynamiques (pression artérielle, fréquence cardiaque) et les concentrations plasmatiques de la rénine.
- La taille et la vulnérabilité des lésions athéromateuses au niveau du sinus aortique, par une méthode immunohistochimique. La taille a été évaluée en mesurant la surface des lésions athéromateuses. La vulnérabilité des lésions athéromateuses a été mesurée après quantification de l'inflammation par l'analyse de l'infiltration des macrophages au niveau des lésions athéromateuses, et après quantification du nombre de cellules musculaires lisses (CML) qui donne des précisions sur la stabilité de la plaque (Naghavi et al, 2003)
- L'expression des ARNm des récepteurs nucléaires PPAR- γ et du gène cible CD36 au niveau de la paroi vasculaire par RT PCR.
- L'expression des ARNm des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , TNF- α , IL-2 et anti-inflammatoires IL-10, IL1Ra ont été analysé au niveau de la paroi artérielle.
- L'expression des ARNm des marqueurs de l'activation des macrophages M1/M2 Macrophages classiques M1 : CD11c et Macrophages alternatifs M2 : CD206 ont été analysé au niveau de la paroi artérielle.

RESULTATS PRINCIPAUX ET CONCLUSION :

L'exercice physique permet de stabiliser les lésions athéromateuses de manière comparable au traitement pharmacologique Telmisartan. On observe une diminution de l'infiltration des macrophages et une augmentation de la quantité de cellules musculaires lisses comparable entre les groupes « exercices » et le groupe « Telmisartan ». Par ailleurs, les résultats montrent que, « l'exercice volontaire » diminue la progression des lésions athéromateuse de manière comparable au « Telmisartan ». **« L'Exercice volontaire » semble plus efficace que « l'Exercice soumis » pour réduire la progression de lésions athéromateuses.**

L'étude des mécanismes cellulaires montre des mécanismes distincts entre les deux types d'exercices physiques. En effet, on remarque que l'expression aortique du récepteur PPAR- γ et de son gène cible CD36 sont augmentée dans le groupe « exercice soumis » et dans le groupe « telmisartan ». Cette activation du PPAR- γ témoigne d'un mécanisme protecteur similaire entre le « telmisartan » et « l'exercice soumis ». L'analyse de l'expression de cytokines pro-inflammatoires montre que « l'exercice soumis » sur tapis roulant réduit l'expression des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , TNF- α et IL-2. Des données similaires ont été retrouvées dans le groupe « telmisartan ». Ces résultats renforcent l'idée que les mécanismes protecteurs avec une diminution de l'expression de cytokines pro-inflammatoires sont comparables dans le groupe « telmisartan » et « exercice soumis ». Par ailleurs, ces données suggèrent que les cellules inflammatoires à l'origine de la sécrétion de ces cytokines présente un profil moins inflammatoires et pourrait être la cause d'une désactivation des cellules inflammatoires (macrophages et lymphocytes T) favorable à la stabilisation des lésions athéromateuses. Cependant chez les souris avec « exercice volontaire », il n'y a pas de modification de l'expression des PPAR- γ au niveau aortique, ni de modification des cytokines pro-inflammatoires. Ceci renforce l'idée que les mécanismes mis en jeu lors d'un « exercice volontaire » et « soumis » ne sont pas les mêmes.

De manière intéressante, « l'exercice volontaire » augmente de manière significative l'expression de la cytokine anti-inflammatoire IL-1Ra. Par ailleurs, l'analyse des marqueurs de macrophages M1

et M2 montre que « l'exercice volontaire » augmente de manière significative l'expression des marqueurs de macrophages anti-inflammatoire M2 : CD206. De plus, l'analyse de la balance inflammatoire M1/M2 montre que les groupes « telmisartan » et « exercice volontaire » induisent une balance en faveur des macrophages M2. Plus précisément, le telmisartan diminue l'expression des marqueurs M1 tandis que « l'exercice volontaire » induit l'expression des marqueurs M2. Par ailleurs, cette balance est significativement corrélée à la diminution de la progression de l'athérosclérose, observée dans les groupes exercice volontaire et telmisartan.

Les exercices physiques « volontaire » et « soumis » possèdent donc des mécanismes d'actions distincts. Bien que « l'exercice soumis » permette d'inhiber le processus pro-inflammatoire vasculaire favorable à la stabilité des lésions athéromateuses, « l'exercice volontaire » de longue durée apparaît plus efficace pour réduire la progression de l'athérosclérose.

Par ailleurs, l'exercice physique « volontaire » est aussi efficace que le traitement pharmacologique « telmisartan » dans le traitement de l'athérosclérose.

Type of exercise training differently influences atherosclerosis progression and inflammatory markers in a mouse model of advanced atherosclerosis

Justyna Szostak^{a,b}, Alain Berthelot^b, Karima Bouzourene^a, Jean François Aubert^a, Pascal Laurant^c, Lucia Mazzolai^a,

^aService of Vascular Medicine, Department of Internal Medicine, Lausanne University Hospital, CHUV, Switzerland

^bSciences Separatives Biologiques et Pharmaceutiques, UFR STAPS/SMP, University of Franche-Comté, Besançon, France

^cLaboratoire Pharm-Ecologie Cardiovasculaire, UFRip Sciences Technologie et Santé, UAPV, Avignon, France

Corresponding author:

Lucia Mazzolai; Szostak justyna

Division of Angiology, Lausanne University Hospital, Lausanne, Switzerland

Tel: +41-21-3140750

Fax: +41-21-3140761

e-mail: lucia.mazzolai@chuv.ch

Type of exercise training differently influences atherosclerosis progression and inflammatory markers in a mouse model of advanced atherosclerosis

Justyna Szostak^{a,b}, Karima Bouzourene^a, Jean François Aubert^a, Alain Berthelot^b, Juerg Nussberger^a, Pascal Laurant^c, Lucia Mazzolai^a

^a Division of Angiology, Lausanne University Hospital, Lausanne, Switzerland

^b Sciences Séparatives Biologiques et Pharmaceutiques, UFR STAPS/SMP, University of Franche-Comté, Besançon, France

^c Laboratoire Pharm-Ecologie Cardiovasculaire, UFRip Sciences Technologie et Santé, UAPV, Avignon, France

Corresponding author:

Lucia Mazzolai

Division of Angiology, Lausanne University Hospital, Lausanne, Switzerland

Tel: +41-21-3140750

Fax: +41-21-3140761

e-mail: lucia.mazzolai@chuv.ch

ABSTRACT

Aims: Regular exercise is recommended for the Atherosclerosis treatment because of the benefits on atherosclerosis initiation, progression and plaque stabilization. Exercise decrease ATH progression, decrease inflammation and modulated macrophages polarisation (Yakeu et al, 2010; Kawanishi et al, 2010; Brechot et al, 2008). The present study was designed to compare and evaluate the effect and mechanism of voluntary wheel exercise, forced treadmill exercise and pharmacological Telmisartan treatment on ATS progression, stability and inflammatory markers. Our hypothesis is that voluntary and forced training exercises have beneficial effect on ATH in the comparable level that pharmacological treatment, whereas mechanisms diverge.

Methods and Results: In this study we have used a model of mice with advanced plaque ApoE^{-/-} 2K1C. 2K1C mice were divided into 4 groups: 1) sedentary (n=10), 2) forced treadmill exercise (n=10), 3) voluntary wheel exercise (n=10), and 4) and Telmisartan treated (n=10). Experimental protocol lasted 5 weeks. Results shown, that wheel and treadmill exercise regimens have different beneficial effects on ATS. Both treadmill and wheel exercise prevent plaque vulnerability in the comparable manner like Telmisartan. But, lesion size was only significantly decreased in mice undergoing wheel training, in the same level like Telmisartan. Mechanisms of ATS protection diverge between voluntary wheel and submitted treadmill exercise. Treadmill training increase PPAR- γ expression and decreased pro-inflammatory cytokines expression in arterial wall whereas wheel exercise have any effect on these pathways but increased anti-inflammatory cytokines and affected macrophage polarization towards the M2 anti inflammatory phenotype. Moreover macrophages polarization towards M2 decrease atherosclerosis progression in wheel and telmisartan treated mice.

Conclusion: Voluntary and forced exercise present two different mechanisms. Forced treadmill exercise decrease plaque inflammation and support plaque stability. Whereas, wheel exercise shift macrophages towards an M2 phenotype which decrease atherosclerosis progression

Keywords: Atherosclerosis, Inflammation, Exercise, Macrophages, ApoE^{-/-}

INTRODUCTION

Atherosclerosis (ATS) is the leading cause of morbidity and mortality in developed nations. Atherosclerotic plaque rupture leads to arterial occlusion, myocardial infarction, and stroke. Plaque rupture prevention, through vulnerable plaque stabilization, is therefore a major challenge in cardio-vascular medicine. Management of cardio-vascular patients includes, in addition to pharmacological and interventional treatment, exercise training. In clinical studies, physical exercise decreases ATS progression and cardio-vascular events. This is especially true for diabetic and overweighs man (Kim et al, 2006). Observational and experimental studies indicate that regular exercise has beneficial effects on many ATS risk factors such as arterial blood pressure (Fagard et al, 2007), LDL-c (Mora et al, 2006), diabetes (Lindstrom et al, 2006). Physical exercises was also shown to be accompanied by a decrease in carotid intima media thickness, a parameter correlated with cardio-vascular events (Kadoglou et al, 2008). Moreover, numerous studies have shown that exercise, swimming, voluntary wheel running, or treadmill training, slow down ATS progression in a variety of hypercholesterolemic animal models such as the apolipoprotein E (ApoE^{-/-}) and LDL receptor (LdLr^{-/-}) deficient mice (Napoli et al, 2006; Okabe et al. 2007; Pellegrin et al, 2009; Pynn et al, 2004; Ramachandran et al, 2005). Exercise is a general term including physical training of various modalities and intensities ranging from active life-style to cycling, swimming, treadmill training etc. Choice of exercise type may be particularly important in treatment and prevention of ATS disease. Indeed, several lines of evidence suggest that “voluntary” (spontaneous wheel running) exercise wheel exercise is more optimal because he increase survival and kept body fat lower than “forced” (treadmill training) in Sprague-Dawley rats (Narath et al, 2001; Ploughman et al, 2005). The reasons remain unclear, but recent studies have reported the potential importance of neurotrophins, such as brain-derived neurotrophic factor (BDNF), in atherosclerosis and related disorders. BDNF might be a protective biomarker for the clinical manifestation of atherosclerosis. It would be of paramount importance to compare various types of exercises, performed under controlled experimental conditions, assessing their relative contribution to ATS burden reduction (i.e. “forced” vs “voluntary”). This would allow determining optimal management strategy for our cardio-vascular patients.

Additionally, studies addressing the question of mechanisms of beneficial effects are warranted to better design appropriate therapeutical strategies. Recent works have suggested a role for exercise in pro-inflammatory cytokines reduction using ATS mouse models (Fukao et al, 2010; Ajjola et al, 2009; Kawanishi et al, 2010). Moreover, in human, 8 weeks of low intensity exercise program (walking 10,000steps/day, three times/week) modulated macrophage polarization: de-

creasing pro-inflammatory M1 macrophages markers and increasing the M2 macrophages markers in circulating leucocytes (Yakeu et al, 2010) The effect of exercise on ATS can also be attributable to an anti-oxidant effect (Pellegrin et al, 2007; Napoli et al, 2006; Shimada et al, 2007).

In light of these observations aim of present study was to evaluate the effect of two types of exercise: voluntary wheel running (mimicking active way of life in humans) and forced treadmill training (mimicking sustained work load in humans) on ATS progression using a mouse model of advanced ATS: the ApoE^{-/-} two-kidney, one clip (2K1C) (Mazzolai et al, 2004). Effect of these two types of exercise on inflammatory profile was also assessed; sedentary and pharmacy treated animals were used as controls.

MATERIALS AND METHODS

Mouse models

Fourteen-16 week-old ApoE^{-/-} (C57BL/6J) mice were used to generate a model of advanced atherosclerosis: the renovascular hypertension two-kidney, one clip-2K1C model as previously described. Briefly, mice were anesthetized by halothane inhalation (1% to 2% in oxygen), left kidney exposed and left renal artery clipped to reduce renal perfusion (Mazzolai et al, 2004). ApoE^{-/-} 2K1C mice were fed regular rodent chow and water ad libitum throughout the study. Both male and female mice were used. All experiments were approved by local institutional animal committee.

Study protocol

ApoE^{-/-} 2K1C mice were divided into 4 groups: 1) sedentary (n=10), 2) forced treadmill exercise (n=10), 3) voluntary wheel exercise (n=10), and 4) Telmisartan treated (n=10). Experimental protocol lasted 5 weeks. Forced treadmill exercise mice were trained on a motorized treadmill (Columbus Instruments, Columbus OH) for 60 min/day at 50-60 % Vo2 Max (14m/min). Vo2 Max capacity was determined in a pilot experiment in collaboration with the metabolic evaluation facility of our institution (Centre Intégratif de Génomique, Lausanne University). Briefly, ApoE^{-/-} 2K1C mice were placed on a treadmill at a constant 25° angle enclosed by a metabolic chamber allowing oxygen (O₂) and carbon dioxide (CO₂) outflow measurements once every minute (model CT-2, Columbus Instrument). After a 15-min period of acclimatation, basal measurement of O₂ and CO₂ were obtained. Subsequently, mice were started on the treadmill at 5m/min and speed was increased 3m/min every 2 minutes until exhaustion. Exhaustion was defined as spending time on

the shocker plate without attempting to reengage in the treadmill. O₂ uptake, CO₂ production, running distance, and running speed data were collected and analyzed to determine VO₂ max.

For the voluntary wheel running exercise, ApoE^{-/-} 2K1C mice were housed in custom-made cages with a freely 24h/day accessible running wheel. Total wheel revolutions were recorded daily by a magnetic switch. Daily distance was calculated by multiplying the number of wheel rotations by wheel circumference.

Pharmacological treatment with the Ang II AT1 blocker Telmisartan (Micardis® Boehringer Ingelheim) was administered at a dose of 25 mg/kg/day in drinking water.

Body weight, heart rate, mean blood pressure, plasma renin concentration

After 5 weeks from clipping, mean arterial blood pressure (MBP), and heart rate (HR) were measured as previously described (Mazzolai et al, 2004).

Plasma renin concentration (PRC) was determined at the end of the 5-week experimental period using a modified microassay based on Ang I trapping by an antibody developed in our laboratory (Nussberger et al, 2008).

Histology, immunohistochemistry and quantification of plaques

Hearts were dissected, fixed in 4% paraformaldehyde and subsequently paraffin embedded. Hearts were serially cut into 3 µm sections and processed for Movats pentachrome staining and immunohistochemistry as previously described (Mazzolai *et al*, 2004). For immunohistochemistry, the macrophage Anti –Mouse Mac-2 monoclonal antibody 5 µg/ml (CL-8942AP Rattus) Cederlane, and the α-SM actin (1/200) antibodies provided by the Pathology Service Geneva were used. Macrophage and smooth muscle content were quantified using the Qwin software (Leica DC Camera, Leica system) and expressed as percentage of the whole plaque area. Cross-sectional plaque area (total area between the lumen and the internal elastic lamina) was measured by using digitizing morphometry image-analysis system Qwin software (Leica DC Camera, Leica system).

Real-Time Polymerase Chain Reaction

Total RNA was isolated and purified from aortas of mice using “RNeasy® Fibrous Tissue kit” (Cat. No 74704 QIAGEN GmbH, D-40724 Hilden) according to manufacturer’s protocol. Total RNA quantity and purity were assessed by OD260/280 absorbance measurements. One µg RNA was then reversed transcribed into cDNA, by using the “iScriptTTM cDNA Synthesis Kit” (BIO-RAD 170-8891, Laboratories AG Reinach, Switzerland) following manufacturer’s protocol. Real time PCR was performed on the CFX96 Real-Time PCR Detection System (BIORAD, Laboratories AG

Reinach, Switzerland) using the “iQ™ SYBER Green PCR Mastermix” (BIORAD, 170-8884, Laboratories AG Reinach, Switzerland) according to manufacturer’s protocol. Reaction was performed in the 96-well format and PCR started with a standart protocol. To confirm the amplification specificity, the PCR product was subjected to a melting curve analysis. Genes (PPAR-γ, CD36, TNF-α, IL-1β, IL-1Ra, IL-10, CD11c, CD206) were expressed as mRNA level normalized to a standard houskepping gene (36B4) using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (Livak et al, 2001).

The primer sequences are as follows:

NM-001146 PPAR-γ 5'-CACAATGCCATCAGGTTTGG-3' 5'-GCTGGTCGATATCACTGGAGATC-3'

NM-007475 36B4 5'-ATGGGTACAAGCGCGTCCTG-3' 5'-GCCTTGACCTTTTCAGTAAG-3'

NM-013693 TNF-α 5'-TCAGCAAGGACAGCAGAGGAC-3' 5'-TGGAGCCGTGGGTCAGTATG-3'

NM-008361 IL-1β 5'-TCGCAGCAGCACATCAACAAG-3' 5'-TCCACGGGAAAGACACAGGTAG-3'

NM-001039701 IL-1Ra 5'-TTCTTGTTGCCTCTGCCACTCG-3' 5'-GATTGGTCTGGACTGTGGAAGTG-3'

NM-010548 IL-10 5'-GCACTACCAAAGCCACAAAGC-3' 5'-GTCAGTAAGAGCAGGCA-3'

NM-021334 CD11c 5'-ACACAGTGTGCTCCAGTATGA-3' 5'-GCCCAGGGATATGTTTCACAGC-3'

NM-008625 CD206 5'-CATGGATGTTGATGGCTACTGGAG-3' 5'-GTCTGTTCTGACTCTGGAACACTTG-3'

NM-001159555 CD36 5'-CCTCCAAACACAGCCAGGAC-3' 5'-CCGGGCCACGTAGAAAACA -3'

Statistical analysis

Data are expressed as mean ± SEM. Comparisons of single means from multiple groups were performed by two-way ANOVA analysis followed by Fisher test. Significance was considered when probability values were <0.05. The statistical software XLSTAT Pro (Addinsoft 40, rue Damrémont 75018 PARIS, France) was used for analysis.

RESULTS

General characteristics of mice are described in table 1. Body weight was not significantly different among the 4 groups of mice while HR significantly decreased in wheel exercised compared to telmisartan treated animals. As expected, sedentary 2K1C mice were hypertensive and showed significantly increased PRC levels (Table 1). Exercised animals remained hypertensive although MBP in wheel exercised mice was significantly lower than in those undergoing treadmill training. As expected, telmisartan treatment normalized MBP and significantly further increased PRC levels (Table 1).

Distance covered and time spent running

Treadmill exercise is a shortly lasting (60 min) effort compared to voluntary wheel training (24 hrs). Distance covered by mice undergoing wheel voluntary exercise was almost twice that observed in treadmill animals ($1718,94 \pm 149,63$ m/day in wheel exercised mice versus 960 m/day in treadmill exercised mice).

Atherosclerosis extension and plaque vulnerability

ATS extension and plaque phenotype were assessed in all groups of mice. Analysis of cross-sectional lesion area showed a significant 40-50% decrease in ATS extension of free wheel exercised and telmisartan treated mice compared to sedentary ones (Fig. 1A-B). On the contrary, no significant change was observed in mice undergoing forced treadmill training compared to sedentary animals (Fig. 1A-B). Plaque phenotype analysis showed a significant decrease in plaque macrophage content, accompanied by a significant increase in plaque α -SMA content in all exercised and telmisartan treated mice compared to sedentary ones (Fig. 2A-B). α -SMA/Mac 2 ratio was therefore significantly increased in wheel (2.8 fold), treadmill (3.4 fold), and telmisartan (2.4 fold) groups of mice (Fig. 2C).

Effect of exercise on PPAR- γ and AT-1 expression in arterial wall

Treadmill exercise significantly increased PPAR- γ expression as well as that of its CD36 target gene by 1.52-fold and 1.44 fold, respectively (Fig. 3AB). Also in telmisartan treated mice PPAR- γ significantly increased 1.3-fold and CD36 1.37 fold. Wheel exercise did not seem to affect PPAR- γ expression in arterial wall (Fig. 3AB). Neither exercise nor telmisartan affected AT-1 or AT-2 expression in arterial wall (data not shown).

Effect of exercise on inflammatory cytokine profile and macrophage polarization

Treadmill exercise significantly reduced pro-inflammatory TNF- α , IL-2, and IL-1 β expression by 47%, 47%, and 63%, respectively (Fig. 4. A-C). Wheel exercise did not show any significant effect on these cytokines (Fig. 4 A-C) while telmisartan treatment significantly decreased IL-2 and IL-1 β expression levels (Fig. 4B-C). Anti-inflammatory IL-10 expression was not affected by wheel exercise and telmisartan treatment (Fig. 4D). On the contrary, treadmill training significantly decreased, by 50%, IL-10 mRNA expression compared to sedentary animals (0.50 ± 0.06 vs 1 ± 0.17 , respectively) (Fig. 4D). Wheel exercise increased anti-inflammatory IL-1Ra cytokine expression by 43% compared to sedentary mice (sedentary 1 ± 0.07 , wheel 1.43 ± 0.015) (Fig. 4E). Treadmill exercise and telmisartan treatment on the contrary, showed no effect on IL-1Ra (treadmill 1.08 ± 0.09 , and telmisartan 0.98 ± 0.13) (Fig. 4E). Net balance between pro-inflammatory IL-1 β and anti-inflammatory IL1Ra was significantly in favor of anti-inflammatory status in wheel and treadmill exercised mice. Telmisartan didn't significantly affect IL-1B/IL-1Ra ratio (Fig. 4F). Analysis of arterial macrophage phenotype showed a significant decrease in pro inflammatory M1 macrophages in telmisartan treated animals only (Fig. 5A). On the contrary, wheel exercised mice presented a significant increase in anti inflammatory M2-type macrophages (Fig. 5B). Therefore, in this latter group of mice a significant 43% decrease in macrophage M1/M2 ratio was evident compared to the other groups (Fig. 5C). A similar trend, although not significant, was observed also in telmisartan treated mice (Fig. 5C). Treadmill exercised mice showed no significant change in M1/M2 ratio compared to sedentary animals (Fig. 5C). A significant correlation between atherosclerosis extension and M1/M2 ratio was observed (Fig. 6).

DISCUSSION

The present study shows the beneficial effect of voluntary wheel and forced treadmill exercise on ATS progression and plaque stability in a mouse model of advanced ATS. Compared to sedentary mice, plaques from animals undergoing exercises displayed a more stable phenotype, similar to that observed in animals treated with the Ang II AT1 receptor blocker telmisartan. Additionally, wheel voluntary exercised mice displayed significantly less extended ATS burden similarly to what observed after telmisartan treatment.

Inflammation plays a major role in ATS progression and destabilization. Recent research showed that inflammation, hyperlipidemia, obesity, and hypertension are associated with an increase of pro-inflammatory cytokines and an increase of M1 polarized macrophage further contributing to disease progression (Devaraj et al, 2011; Swirski et al, 2007; Lumeng et al, 2007, Fujisaka et al, 2009; Feig et al, 2011). Pharmacological treatment like used in ATS complication prevention like Troglitazone or Telmisartan (PPAR- γ agonist or AT1 antagonist) (Bouhrel et al, 2007; Fujisaka et al, 2009; Fujisaka et al, 2011; Matsumura et al, 2011) and physical exercise in mice (treadmill at 12-20 m/min for 60 min/day for 16 weeks) or in human (8-week low-intensity exercise programme (walking 10,000steps/day, three times/week) decrease inflammatory cytokines expression and modulate macrophage polarization by a decrease expression of M1 macrophages markers and by an increase of M2 macrophages markers (Kawanishi et al, 2010, Yakeu et al, 2010). In the present study, not only the beneficial effect of exercise on ATS progression is further substantiated but evidence is provided suggesting that treadmill and wheel exercise appear to differently affect inflammation profile in ATS mice. Forced treadmill exercise, similarly to what observed with telmisartan treatment, significantly increased arterial PPAR- γ expression and up regulated PPAR- γ CD36 target gene. This suggests that treadmill exercise can selectively, similarly to a pharmacological treatment, activate nuclear PPAR- γ receptor. On the contrary, wheel exercise did not show any effect on PPAR- γ activation. Along with PPAR- γ activation, similarly to what observed with telmisartan treatment, treadmill forced exercise also strongly inhibited pro-inflammatory genes expression such as TNF- α , IL-2, and IL-1 β . This decrease in pro-inflammatory cytokines may be secondary to PPAR- γ activation. In fact, Li *et al*, (2004) showed that PPARs agonists may inhibit inflammatory gene expression including TNF- α , IL-1 β and IL-2 in macrophages. Wheel exercise had no effect on pro-inflammatory gene expression but modulated anti-inflammatory ones significantly increasing IL-1Ra, the natural inhibitor of IL-1 β . IL-1Ra plays an important role in ATS progression. In fact, subcutaneous administration of sIL-1Ra in mice or genetic IL-1Ra over expression decreased ATS lesions size both in the ApoE^{-/-} or LDL^{-/-} mouse models (Elhage et al, 1998; Devlin et al, 2002). Interestingly, analysis of IL1 β /IL1Ra ratio showed a similar significant net anti-inflammatory effect both in wheel and treadmill exercise. However,

mechanisms diverged depending on type of exercise performed (wheel vs treadmill). Another divergent effect depending on type of exercise was noticed on macrophage polarization. Mice undergoing wheel exercise showed a shift of macrophage polarization towards an M2 dominant anti-inflammatory phenotype compared to both sedentary and treadmill trained animals. Macrophage M1/M2 ratio was in fact significantly decreased in this former group of mice similarly to what observed (although not significantly) in the telmisartan treated animals. However, once again, mechanisms diverged since telmisartan treatment, contrary to wheel exercise, mainly affected pro-inflammatory macrophage phenotype. A positive correlation between M1/M2 ratio and ATS lesion size ($p < 0.023$) was observed suggesting a role for macrophages in ATS development. Khallou-Laschet et al (2010) showed an increase of M1/M2 ratio with increase of ATS size in ApoE^{-/-} older 55 weeks mice in comparison to young 20 weeks old mice. Recently, Feig et al (2011) have shown reduced macrophage M1 markers expression and up regulated M2 markers during plaque regression. Along the same line, Bouhlef et al, (2007) showed that a shift towards M2 polarization may prevent ATS progression. Taken together, these results suggest a pivotal role of M1/M2 shift towards an M2 phenotype in ATS regression. Indeed, in our study, treadmill trained mice in which M1/M2 ratio was unchanged, showed no decrease in lesion size. The divergent, more beneficial effect of wheel compared to treadmill training on ATS progression can be partially explained by the different pattern, duration, and hemodynamic effect of exercise modality. Wheel exercised mice run with a “stop and go” motion at intermittency all day whereas treadmill training requires sustained short timed workload once daily. Wheel voluntary running appears more physiological since mice exhibit an intermittent, “stop and go” motion. This may improve wheel running performances and lead to higher endurance levels (Ghosh et al, 2010). The more beneficial effect of voluntary running has also been shown by others in contexts other than ATS. Sennott et al (2008) showed that running wheel but not forced treadmill training improved blood glucose levels and decreased body weight in db/db mice over a 12 week period. Pattern of wheel exercise (longer distance covered in a longer laps of time) may modulate cytokines expression towards an increase in anti-inflammatory (IL-4; IL-13) and a decrease in pro-inflammatory ones (TNF- α ; IL-1 β) which can polarize native monocytes towards an M2 phenotype (Bouhlef et al, 2007; Aijola et al, 2009). Moreover, longer distance covered in wheel voluntary exercise can explain a decrease on ATS progression. In fact, beneficial effect of exercise are proportional to distance covered. In fact, Myers et al, (2002) showed that more distance covered by exercise are important more survival are increased. He showed that, 1-MET increase in exercise capacity conferred a 12 percent improvement in survival.

Stress experienced during forced treadmill training may also affect hemodynamic parameters in mice. In our study, treadmill training increased MBP by 6 mmHg, compared to sedentary ani-

mals, and by 12 mmHg compared to wheel exercised mice. Higuchi et al 1985 showed similar MBP increases (+ 12,8 mmHg) in response to treadmill training vs wheel using spontaneously hypertensive rats (SHR). We and others, (Mazzolai et al, 2004, Weiss et al, 2000, Daugherty et al, 2000) have previously shown the role of hypertension in ATS progression in mouse models of atherosclerosis as well as the beneficial effect of blood pressure lowering on ATS progression (Mazzolai et al, 2004, Daugherty et al, 2000). The increased blood pressure in mice undergoing treadmill training may partially explain the lack of effect of this exercise modality on ATS lesion size. Contrarily, ATS lesion reduction observed after wheel exercise may be favoured by the concomitant MBP decrease.

In conclusion, results presented herein demonstrate that 1) exercise can be as effective as pharmacological treatment in ATS plaque development progression, and 2) that type of exercise is important when determining beneficial effects on ATS. Furthermore, we show for the first time that different types of exercise induce (beneficial) effects on ATS by different mechanisms. We previously reported (Pellegrin et al, 2009) the beneficial effect of swimming on ATS progression using the same mouse model described herein. In these swimming mice a significant decrease in AT1 vascular expression was observed. In the present study, neither telmisartan nor exercise regimens affected vascular AT1 or AT2 mRNA expression. This once more confirms the hypothesis that different types of exercises (swimming, wheel, treadmill...) reduce ATS by different mechanisms.

These results may have important clinical implications, if confirmed in clinical studies, for our cardio-vascular patients with ATS guiding physicians in the choice of exercise treatment. In fact, based on our results one would rather suggest to patients a form of “voluntary” exercise characterized by regular walking exercise and an active life style rather than “forced” training.

Acknowledgements

Authors wish to thank Sylvie Bertholet for her technical help in measuring PRC and PRA. The metabolic evaluation facility of our institution (Centre Intégréatif de Génomique, Lausanne University) for pilot experiments to determine VO₂ max in our mice undergoing treadmill exercise.

REFERENCES :

- Aijola, O. A., Dong, C., Herderick, E. E., Ma, Q., Goldschmidt-Clermont, P. J., and Yan, Z. (2009). Voluntary running suppresses proinflammatory cytokines and bone marrow endothelial progenitor cell levels in apolipoprotein-E-deficient mice. *Antioxid Redox Signal* **11**, 15-23.
- Bouhrel MA, Derudas B, Rigamonti E, Dievart R, Brozek J, Haulon S, Zawadzki C, Jude B, Torpier G, Marx N, et al.: PPARgamma activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties. *Cell Metab* 2007, 6:137-143.
- Brechot, N., Gomez, E., Bignon, M., Khallou-Laschet, J., Dussiot, M., Cazes, A., Alanio-Brechot, C., Durand, M., Philippe, J., Silvestre, J. S., Van Rooijen, N., Corvol, P., Nicoletti, A., Chazaud, B., and Germain, S. (2008). Modulation of macrophage activation state protects tissue from necrosis during critical limb ischemia in thrombospondin-1-deficient mice. *PLoS One* **3**.
- Daugherty, A., Manning, M. W., and Cassis, L. A. (2000). Angiotensin II promotes atherosclerotic lesions and aneurysms in apolipoprotein E-deficient mice. *J Clin Invest* **105**, 1605-1612.
- Devaraj, S., and Jialal, I. (2011). C-reactive protein polarizes human macrophages to an M1 phenotype and inhibits transformation to the M2 phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **31**, 1397-1402.
- Devlin CM, Kuriakose G, Hirsch E, Tabas I: Genetic alterations of IL-1 receptor antagonist in mice affect plasma cholesterol level and foam cell lesion size. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, 99:6280-6285.
- Elhage R, Maret A, Pieraggi MT, Thiers JC, Arnal JF, Bayard F: Differential effects of interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor binding protein on fatty-streak formation in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 1998, 97:242-244.
- Fagard, R. H. (2006). Exercise is good for your blood pressure: effects of endurance training and resistance training. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **33**, 853-856.
- Fujisaka, S., Usui, I., Bukhari, A., Ikutani, M., Oya, T., Kanatani, Y., Tsuneyama, K., Nagai, Y., Takatsu, K., Urakaze, M., Kobayashi, M., and Tobe, K. (2009). Regulatory mechanisms for adipose tissue M1 and M2 macrophages in diet-induced obese mice. *Diabetes* **58**, 2574-2582.
- Fujisaka, S., Usui, I., Kanatani, Y., Ikutani, M., Takasaki, I., Tsuneyama, K., Tabuchi, Y., Bukhari, A., Yamazaki, Y., Suzuki, H., Senda, S., Aminuddin, A., Nagai, Y., Takatsu, K., Kobayashi, M., and Tobe, K. (2011). Telmisartan improves insulin resistance and modulates adipose tissue macrophage polarization in high-fat-fed mice. *Endocrinology* **152**, 1789-1799.
- Fukao, K., Shimada, K., Naito, H., Sumiyoshi, K., Inoue, N., Iesaki, T., Kume, A., Kiyanagi, T., Hiki, M., Hirose, K., Matsumori, R., Ohsaka, H., Takahashi, Y., Toyoda, S., Itoh, S., Miyazaki, T., Tada, N., and Daida, H. (2010). Voluntary exercise ameliorates the progression of atherosclerotic lesion formation via anti-inflammatory effects in apolipoprotein E-deficient mice. *J Atheroscler Thromb* **17**, 1226-1236.
- Kawanishi, N., Yano, H., Yokogawa, Y., and Suzuki, K. (2010). Exercise training inhibits inflammation in adipose tissue via both suppression of macrophage infiltration and acceleration of phenotypic switching from M1 to M2 macrophages in high-fat-diet-induced obese mice. *Exerc Immunol Rev* **16**, 105-118.
- Khallou-Laschet, J., Varthaman, A., Fornasa, G., Compain, C., Gaston, A. T., Clement, M., Dussiot, M., Levillain, O., Graff-Dubois, S., Nicoletti, A., and Caligiuri, G. (2010). Macrophage plasticity in experimental atherosclerosis. *PLoS One* **5**.
- Li AC, Brown KK, Silvestre MJ, Willson TM, Palinski W, Glass CK: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest* 2000, 106:523-531.
- Lindstrom, J., Ilanne-Parikka, P., Peltonen, M., Aunola, S., Eriksson, J. G., Hemio, K., Hamalainen, H., Harkonen, P., Keinanen-Kiukkaanniemi, S., Laakso, M., Louheranta, A., Mannelin, M., Paturi, M., Sundvall, J., Valle, T. T., Uusitupa, M., and Tuomileh. (2006). Sustained reduction in the incidence of type 2 diabetes by lifestyle intervention: follow-up of the Finnish Diabetes Prevention Study. *Lancet* **368**, 1673-1679.
- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402-408.
- Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR: Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest* 2007, 117:175-184.

- Mazzolai L, Duchosal MA, Korber M, Bouzourene K, Aubert JF, Hao H, Vallet V, Brunner HR, Nussberger J, Gabbiani G, et al.: Endogenous angiotensin II induces atherosclerotic plaque vulnerability and elicits a Th1 response in ApoE^{-/-} mice. *Hypertension* 2004, 44:277-282.
- Mora, S., Lee, I. M., Buring, J. E., and Ridker, P. M. (2006). Association of physical activity and body mass index with novel and traditional cardiovascular biomarkers in women. *JAMA* **295**, 1412-1419.
- Napoli C, Williams-Ignarro S, de Nigris F, Lerman LO, D'Armiento FP, Crimi E, Byrns RE, Casamassimi A, Lanza A, Gombos F, et al.: Physical training and metabolic supplementation reduce spontaneous atherosclerotic plaque rupture and prolong survival in hypercholesterolemic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, 103:10479-10484.
- Narath, E., Skalicky, M., and Viidik, A. (2001). Voluntary and forced exercise influence the survival and body composition of ageing male rats differently. *Exp Gerontol* **36**, 1699-1711.
- Okabe TA, Shimada K, Hattori M, Murayama T, Yokode M, Kita T, Kishimoto C: Swimming reduces the severity of atherosclerosis in apolipoprotein E deficient mice by antioxidant effects. *Cardiovasc Res* 2007, 74:537-545.
- Pellegrin M, Alonso F, Aubert JF, Bouzourene K, Brauersreuther V, Mach F, Haefliger JA, Hayoz D, Berthelot A, Nussberger J, et al.: Swimming prevents vulnerable atherosclerotic plaque development in hypertensive 2-kidney, 1-clip mice by modulating angiotensin II type 1 receptor expression independently from hemodynamic changes. *Hypertension* 2009, 53:782-789.
- Pellegrin, M., Berthelot, A., Houdayer, C., Gaume, V., Deckert, V., and Laurant, P. (2007). New insights into the vascular mechanisms underlying the beneficial effect of swimming training on the endothelial vasodilator function in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis* **190**, 35-42.
- Ploughman, M., Granter-Button, S., Chernenko, G., Tucker, B. A., Mearow, K. M., and Corbett, D. (2005). Endurance exercise regimens induce differential effects on brain-derived neurotrophic factor, synapsin-I and insulin-like growth factor I after focal ischemia. *Neuroscience* **136**, 991-1001.
- Pynn M, Schafer K, Konstantinides S, Halle M: Exercise training reduces neointimal growth and stabilizes vascular lesions developing after injury in apolipoprotein e-deficient mice. *Circulation* 2004, 109:386-392.
- Ramachandran S, Penumetcha M, Merchant NK, Santanam N, Rong R, Parthasarathy S: Exercise reduces preexisting atherosclerotic lesions in LDL receptor knock out mice. *Atherosclerosis* 2005, 178:33-38..
- Sennott, J., Morrissey, J., Standley, P. R., and Broderick, T. L. (2008). Treadmill exercise training fails to reverse defects in glucose, insulin and muscle GLUT4 content in the db/db mouse model of diabetes. *Pathophysiology* **15**, 173-179.
- Shimada, K., Kishimoto, C., Okabe, T. A., Hattori, M., Murayama, T., Yokode, M., and Kita, T. (2007). Exercise training reduces severity of atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice via nitric oxide. *Circ J* **71**, 1147-1151.
- Swirski, F. K., Libby, P., Aikawa, E., Alcaide, P., Luscinskas, F. W., Weissleder, R., and Pittet, M. J. (2007). Ly-6Chi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytois and give rise to macrophages in atheromata. *J Clin Invest* **117**, 195-205.
- Weiss, D., Kools, J. J., and Taylor, W. R. (2001). Angiotensin II-induced hypertension accelerates the development of atherosclerosis in apoE-deficient mice. *Circulation* **103**, 448-454.
- Yakeu, G., Butcher, L., Isa, S., Webb, R., Roberts, A. W., Thomas, A. W., Backx, K., James, P. E., and Morris, K. (2010). Low-intensity exercise enhances expression of markers of alternative activation in circulating leukocytes: roles of PPARgamma and Th2 cytokines. *Atherosclerosis* **212**, 668-673.

FIGURE LEGEND

Figure 1: Atherosclerosis evaluation. A) Effects of exercise training and Telmisartan treatment on atherosclerosis lesions surface in aortic root. B) Representative Movat's stained lesions in aortic roots of sedentary, exercised and telmisartan treated mice. The values are the means $\pm$ SEM * $p < .05$ versus sedentary. N=8 to 10 mice in each group.

Figure 2: Macrophages and smooth muscle actin content in ATS plaques. A) Macrophages content, B) α -SMA content, C) α -SMA/ macrophage ratio. The values are the means $\pm$ SEM * $p < .05$ versus sedentary. N=8 to 10 mice in each group.

Figure 3: Effects of exercise training and telmisartan treatment on PPAR- γ and CD36 mRNA expression in arterial wall. A) PPAR- γ mRNA folds expression. B) CD36, PPAR- γ target gene mRNA folds expression. The values are the means $\pm$ SEM * $p < .05$ versus sedentary; $\ddagger p < 0,05$ versus wheel. N=8 to 10 mice in each group.

Figure 4: Effects of exercise training and telmisartan treatment on pro-inflammatory A) TNF- α ; B) IL-2; C) IL-1 β and anti-inflammatory D) IL-10; E) IL-1Ra cytokines mRNA gene fold expression in arterial wall. F) Effects of different treatment on inflammatory IL1B/IL1Ra balance in arterial wall. The values are the means $\pm$ SEM * $p < .05$ versus sedentary; $\ddagger p < .05$ versus wheel; $\dagger p < .05$ versus telmisartan N=8 to 10 mice in each group.

Figure 5: Effects of exercise training and telmisartan treatment on A) pro-inflammatory activated macrophages (M1:CD11c) B) anti-inflammatory activated macrophages (M2: CD206) markers and C) M1/M2 Ratio in arterial wall. The values are the means $\pm$ SEM * $p < .05$ versus sedentary. N=6 to 8 mice in each group.

Figure 6: Correlation between atherosclerosis extension and M1/M2 Ratio. The values are the means $\pm$ SEM * $p < .05$ versus sedentary.

Table 1:

	BW (g)	HR (bpm)	MBP (mm Hg)	PRC (ng/ml per h)
SEDENTARY	24,7±1	619,9±13.2	142,1±2.5†	1765,1±291.8†
WHEEL	27,7±1.4	585,8±20.8†	136,8±2.8 § †	2034,9±302.2†
TREADMILL	26,7±1.3	623,8±16.9	148,8±2.7†	1334,5±377.8 †
TELMISARTAN	25,4±1	653,2±33.4	113,9±5.2	11622,3±1560.8

Body Weight (BW), Hemodynamic profile Hear Rate (HR), Mean Blood Pressure (MBP), Plasma Renin Concentration (PRC). The values are the means ± SEM †p<0,05 versus telmisartan. § p<0,05 versus treadmill.

Fig. 1

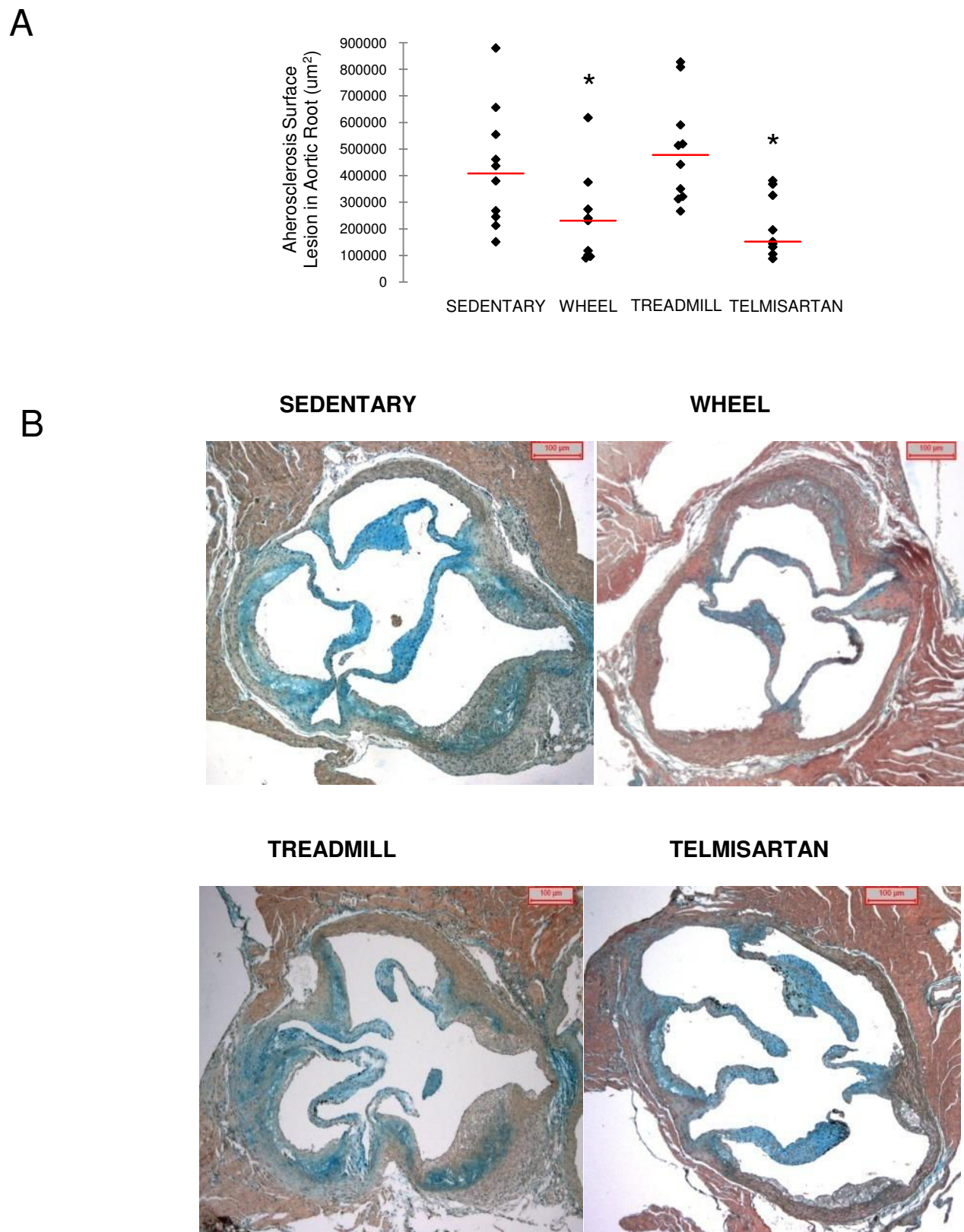
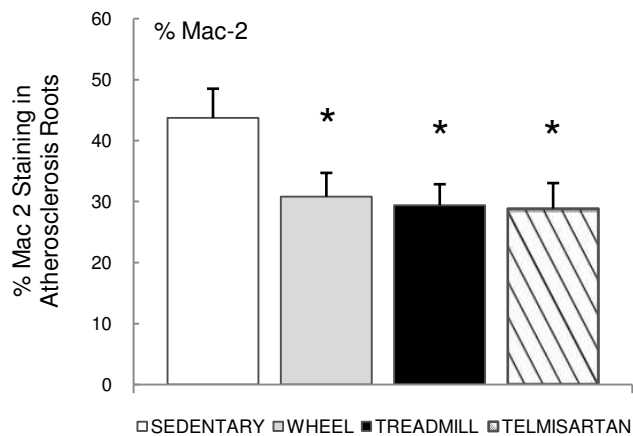


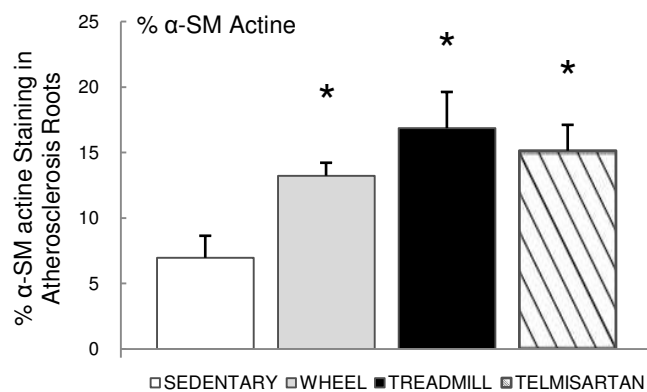
Figure 1: Atherosclerosis evaluation. A) Effects of exercise training and Telmisartan treatment on atherosclerosis lesions surface in aortic root. B) Representative Movat's stained ATH lesions in aortic roots of exercises and telmisartan treated mice. The values are the means $\pm$ SEM * $p < .05$ versus sedentary. N=8 to 10 mice in each group.

Fig. 2

A



B



C

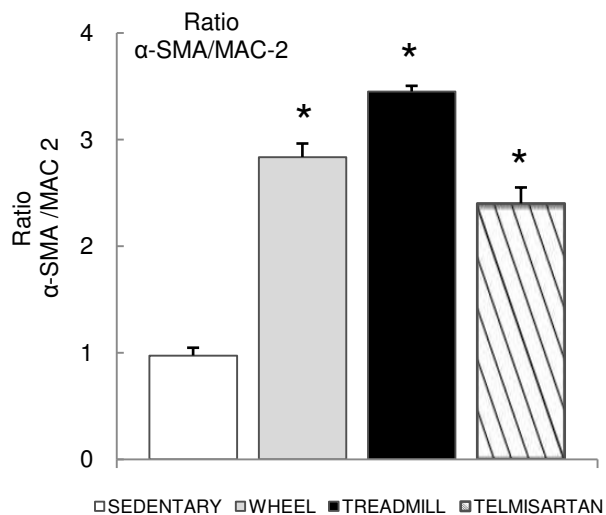
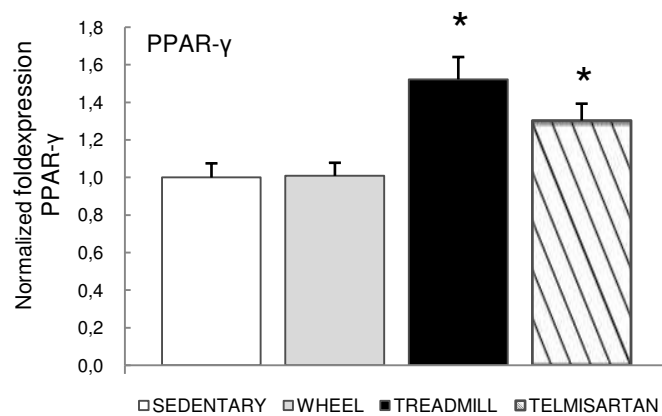


Figure 2: Macrophages and smooth muscle actin content in ATS plaques. A) Macrophages content, B) α-SMA content, C) α-SMA/ macrophage ratio. The values are the means $\pm$ SEM * $p < .05$ versus sedentary. N=8 to 10 mice in each group.

Fig. 3

A



B

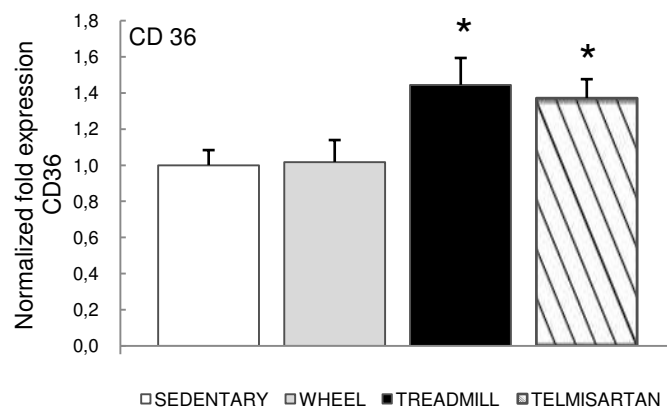


Figure 3: Effects of exercise training and telmisartan treatment on PPAR-γ and CD36 mRNA expression in arterial wall. A) PPAR-γ mRNA folds expression. B) CD36, PPAR-γ target gene mRNA folds expression. The values are the means $\pm$ SEM * $p < .05$ versus sedentary; ‡ $p < 0.05$ versus wheel. N=8 to 10 mice in each group.

Fig. 4

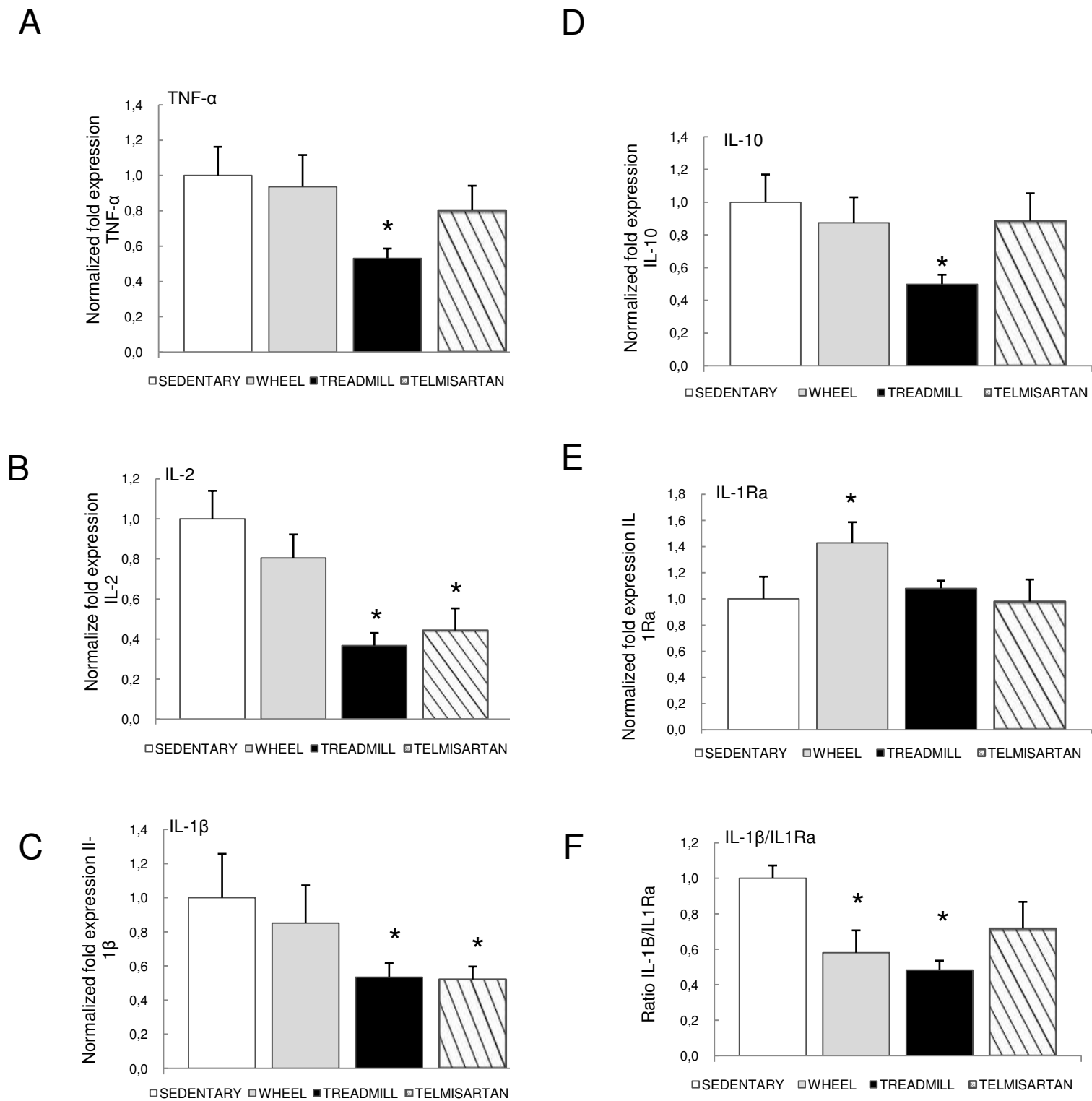
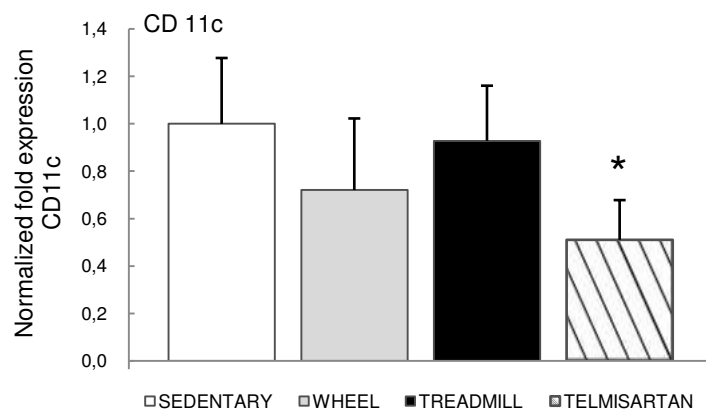


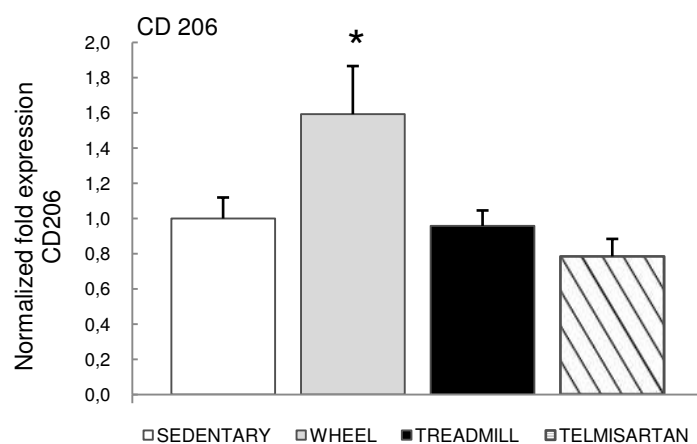
Figure 4: Effects of exercise training and telmisartan treatment on pro-inflammatory A) TNF- α ; B) IL-2 ; C) IL-1 β and anti-inflammatory D) IL-10; E) IL-1Ra cytokines mRNA gene fold expression in arterial wall. F) Effects of different treatment on inflammatory IL1 β /IL1Ra balance in arterial wall. The values are the means $\pm$ SEM * $p < .05$ versus sedentary; ‡ $p < .05$ versus wheel; † $p < .05$ versus telmisartan N=8 to 10 mice in each group.

Fig. 5

A



B



C

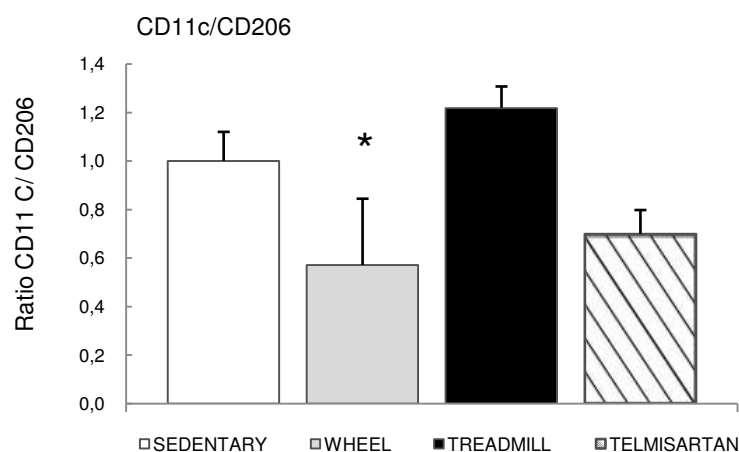
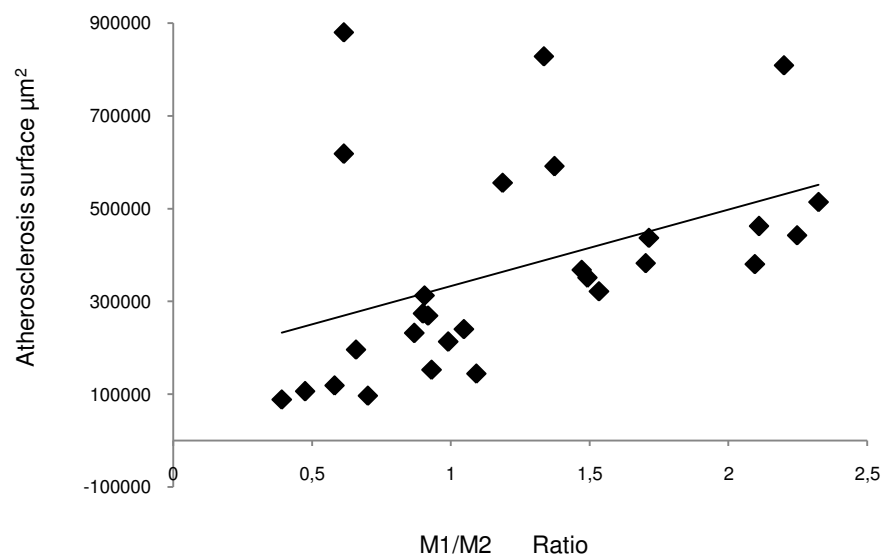


Figure 5: Effects of exercise training and telmisartan treatment on A) pro-inflammatory activated macrophages (M1:CD11c) B) anti-inflammatory activated macrophages (M2: CD206) markers and C) M1/M2 Ratio in arterial wall. The values are the means $\pm$ SEM * $p < .05$ versus sedentary. N=6 to 8 mice in each group.

Fig.6



Variables	Atherosclerosis lesion
CD11c	0,346
Rapport CD11c/CD206	0,429
Movat	1

Figure 6: Correlation between atherosclerosis extension and M1/M2 Ratio. The values are the means $\pm$ SEM * $p < .05$ versus sedentary.

PARTIE 3 : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'industrialisation et le progrès technique ont complètement modifié le mode de vie des populations en termes d'activité physique. La voiture, le bus et les jeux vidéo ont remplacé les activités physiques. Cette sédentarisation de la population est responsable en partie du développement des maladies métaboliques et cardiovasculaires. L'OMS estime que 60% de la population mondiale a une activité physique insuffisante. Bien que les firmes pharmaceutiques rivalisent en mettant sur le marché des traitements médicamenteux novateurs pour prévenir la mortalité cardiovasculaire, il semblerait que ces traitements ne soient pas suffisants pour réduire l'incidence du mode de vie sur la mortalité. En effet, malgré les traitements médicamenteux variés la mortalité cardiovasculaire reste la première cause de mortalité en France.

Les récepteurs PPAR sont une cible thérapeutique privilégiée dans le traitement des maladies métaboliques et cardiovasculaires. Afin de mettre en avant, l'exercice physique comme outil thérapeutique des maladies cardiovasculaires, nous avons essayé de comprendre l'implication des récepteurs nucléaires PPAR dans la cardioprotection induite par l'exercice physique. Nous avons, de ce fait, mis en évidence deux mécanismes majeurs qui pourraient expliquer les effets bénéfiques de l'exercice physique dans la progression et la stabilité des lésions athéromateuses.

Le premier mécanisme qui pourrait expliquer l'effet bénéfique de l'exercice physique est relatif à l'activation des récepteurs nucléaires PPAR vasculaires et l'inhibition de l'activité pro-inflammatoire en réponse à « l'exercice soumis ». Nos résultats montrent, pour la première fois, que l'exercice physique augmente l'expression et l'activité des PPAR- γ vasculaires. En effet, nous avons montré que l'expression du PPAR- γ , ainsi que du gène cible CD36 vasculaire, sont augmentés en réponse à l'exercice de nage et de course sur tapis. Ces résultats ont été mis en évidence aussi bien chez la souris ApoE^{-/-} que chez la souris 2K1C soumise à des exercices imposés de types différents. Par ailleurs, pour la première fois, il a été démontré que, chez la souris ApoE^{-/-}, l'activation des récepteurs nucléaires en réponse à une activité physique de nage est directement responsable d'une diminution de l'extension des lésions athéromateuses. En effet, cette diminution de l'athérosclérose semblerait PPAR- γ -dépendante, puisque l'inhibition du PPAR- γ , après administration de BADGE, abolit les effets antiathérogènes induits par l'exercice. Ces

résultats, montrent le rôle majeur de l'activation des PPAR- γ dans la prévention de la progression de l'athérosclérose.

L'inflammation est la responsable majeure de la progression et la rupture de plaque d'athérosclérose à l'origine des accidents cardiovasculaires. L'exercice physique permet de diminuer l'inflammation locale et favorise ainsi la stabilité des lésions d'athérosclérose. En effet, lors de ce travail, nous avons pu montrer que différentes modalités d'exercice physique permettent de réduire de manière significative l'inflammation vasculaire chez la souris ApoE^{-/-}. Il a ainsi été montré que 13 semaines d'exercice physique de natation chez la souris ApoE^{-/-} ou 5 semaines d'exercice de course sur tapis chez la souris 2K1C, réduisent de manière significative l'expression des cytokines pro-inflammatoires. Cet effet anti-inflammatoire de l'exercice physique a été montré dans différents modèles d'animaux (Okabe et al, 2007 ; Napoli et al, 2006). Nos résultats montrent par ailleurs que l'exercice de course sur tapis est tout aussi efficace que le traitement pharmacologique pour réduire l'inflammation locale. On observe, effectivement, que la réduction des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , TNF- α , IL-2 en réponse à l'exercice de course sur tapis est comparable à celle rencontrée lors d'un traitement pharmacologique avec le telmisartan. De manière intéressante, l'activation du PPAR- γ semble être le mécanisme majeur à l'origine des effets anti-inflammatoires. En effet, chez la souris traitée avec le « telmisartan » ou « l'exercice soumis » (nage ou tapis), on observe une activation des PPAR- γ et une diminution comparable des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , IL-2, TNF- α . De manière surprenante, « l'exercice volontaire » n'engendre ni l'activation du PPAR- γ , ni la diminution des cytokines pro-inflammatoires. Ceci suggère un mécanisme d'action antiathérogène différent entre les deux types d'exercice physique. Pascual et al (2005) montrent que, sur les macrophages activés M1 l'activation du PPAR- γ engendre des effets anti-inflammatoires qui sont liés à la transrépression et plus particulièrement au maintien du co-répresseur sur l'élément de réponse de NF- κ B. Dans notre étude, l'activation du PPAR- γ pourrait être responsable d'une désactivation des cellules inflammatoires et notamment des macrophages présents au niveau des lésions athéromateuses lors du traitement « telmisartan » ou « exercice soumis ». Bien que de nombreuses études montrent que les effets antiathérogènes sont essentiellement liés à une

baisse de l'inflammation (Fukao et al, 2010), notre étude montre qu'une diminution significative des cytokines pro-inflammatoires ne s'accompagne pas d'une réduction des lésions athéromateuses chez la souris 2K1C soumise à un exercice de course sur tapis. L'absence d'effet bénéfique sur la progression de l'athérosclérose chez la souris 2K1C soumise à l'exercice sur tapis pourrait être expliquée par la présence d'une pression artérielle élevée. En effet, l'exercice sur tapis a augmenté de manière significative la pression artérielle de 12 mm Hg par rapport à l'exercice sur roue. Cet effet hémodynamique de l'exercice forcé a notamment été mis en évidence chez le rat SHR. En effet, Higuchi et al (1985) montrent que l'exercice sur tapis augmente de 12.8 mm Hg la pression artérielle chez le rat soumis à un exercice sur tapis par rapport à un exercice volontaire. Cet effet hypertenseur peut être responsable du maintien de la progression des lésions athéromateuses. En effet, des études montrent que l'augmentation de la pression artérielle par un effet hémodynamique favorise l'extension des lésions athéromateuses (Mazzolai et al, 2004, Daugherty et al, 2000 ; Weiss et al, 2001). Cet effet hémodynamique pourrait être notamment lié à un stress en réponse à l'exercice soumis. En effet, Yancey et al (1993) montrent que l'exercice sur tapis de course augmente de manière significative la pression artérielle et la fréquence cardiaque en réponse au stress. Par ailleurs, ce stress peut être responsable d'une défaillance du système immunitaire qui pourrait concurrencer les effets bénéfiques de l'exercice physique. En effet, des études réalisées chez la souris ou le rat, sur tapis de course, montrent une diminution de l'activité du système immunitaire et du poids de la rate (Hoffman et al, 1986 ; Brown et al, 2007 ; Moraska et al, 2000). Les facteurs du stress (catécholamines et corticoïdes, connus pour leurs effets immunosuppresseurs) n'ont pas été mesurés pour répondre à cette hypothèse.

Au-delà de cet effet hémodynamique « l'exercice soumis » possède de manière intéressante, un mécanisme comparable au traitement pharmacologique « telmisartan », essentiellement lié à l'activation du PPAR- γ et à l'inhibition de l'expression des cytokines pro-inflammatoires.

Le deuxième mécanisme athéroprotecteur pourrait impliquer la polarisation des macrophages M2 et la stimulation du système anti-inflammatoire. En effet, « l'exercice volontaire » permet d'induire de manière significative l'expression de la cytokine anti-inflammatoire IL-1Ra et du marqueur CD206 des macro-

phages M2. Contrairement à « l'exercice forcé » « l'exercice volontaire » n'a aucun effet sur l'expression des PPAR- γ vasculaire et des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , TNF- α , IL-2). IL-1Ra est une cytokine anti-inflammatoire sécrétée majoritairement par les monocytes/macrophages anti-inflammatoires M2 (Chinetti-Gbaguibi et al, 2007). Elle inhibe l'action pro-inflammatoire de IL-1 β . L'effet antiathérogène de IL-1Ra a été démontré dans diverses études. L'infusion de sIL-1Ra ou la surexpression de IL-1Ra diminue la progression de l'athérosclérose (Elhage et al, 1998; Devlin et al, 2002). L'analyse de la polarisation des macrophages (M1 : cd11c) et (M2 :CD206) confirme cet effet anti-inflammatoire et montre, de manière surprenante, que « l'exercice volontaire », bien qu'il n'ait aucun effet sur l'expression du PPAR- γ , augmente de manière significative les marqueurs des macrophages alternatifs M2, tels que le CD206 et l'IL-1Ra. Par ailleurs, l'analyse de la balance inflammatoire M1/M2 (CD11c/CD206) montre une balance inflammatoire en faveur des M2 chez la souris traitée avec l'exercice volontaire et le telmisartan. De plus, cette balance inflammatoire est significativement corrélée avec l'extension des lésions. En effet, plus les M2 sont exprimés, moins les lésions athéromateuses sont importantes. Ceci montre que la prévention de la progression de l'athérosclérose est tributaire de la polarisation des macrophages au profit des M2 anti-inflammatoires.

De manière intéressante, notre étude montre pour la première fois que l'exercice « physique soumis » et « volontaire » possède des mécanismes cardioprotecteurs distincts. D'une part, l'exercice « soumis » agit sur les récepteurs nucléaires PPAR- γ et diminue l'activité du système pro-inflammatoire de manière comparable au telmisartan. D'autre part, l'exercice « volontaire » favorise le système anti-inflammatoire et la polarisation des M2 avec un mécanisme PPAR- γ -indépendant.

Théories explicatives :

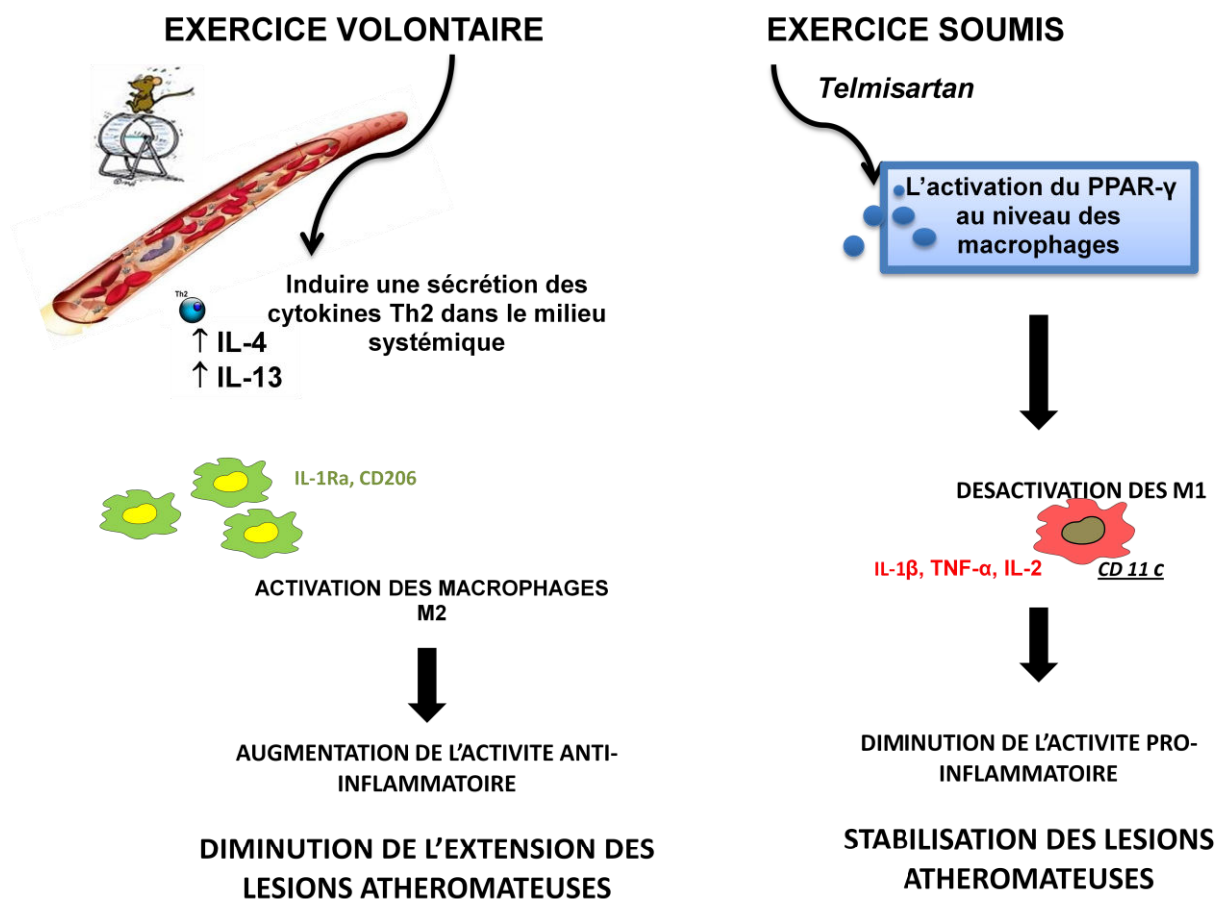
L'exercice « volontaire » favorise la formation des macrophages anti-inflammatoire M2. L'exercice physique « volontaire » modéré et de longue durée favorise un milieu systémique anti-inflammatoire. En effet, de nombreuses études montrent que l'exercice physique modéré favorise la

diminution de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires IL-6, TNF- α et stimule la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires IL-4 (Giraldo et al, 2009 ; Yakeu et al, 2010). Les macrophages sont des cellules plastiques capables de se différencier en fonction du milieu dans lequel ils évoluent (Wolfs et al, 2011 ; Gordon et al, 2003). Cette sécrétion de cytokines anti-inflammatoires en réponse à un exercice modérée pourrait, de manière favorable, influencer le milieu systémique et induire une polarisation des monocytes en faveur d'un phénotype anti-inflammatoire et induire l'effet antiathérogène observé lors de notre étude. En effet, des études in vitro (Coste et al, 2003) montrent qu'IL-4 et IL-13 sont des inducteurs des macrophages M2. Les études expérimentales montrent que l'induction des macrophages anti-inflammatoires M2, en réponse à un exercice physique, dans le tissu adipeux (Lumeng et al, 2007) ou dans un modèle de patte ischémique chez la souris en réponse à un exercice physique (Brechot et al, 2008), diminue l'inflammation et freine la progression de la maladie. Bien que, de nombreuses études montrent que l'induction des M2 stimule l'expression des PPAR- γ , lors de notre étude, nous n'avons pas observé ce phénomène. L'absence de modification de l'expression de PPAR- γ en réponse à l'expression du Mannose récepteur CD206 n'est pas surprenante. En effet, en présence d'IL-4 et IL-13, l'activation du PPAR- γ n'est pas nécessaire pour induire des M2. Nous supposons, de ce fait, que l'induction des M2 en réponse à « l'exercice volontaire » est PPAR- γ indépendant et pourrait être liée à une stimulation plasmatique des cytokines anti-inflammatoires. Cependant, nous ne pouvons vérifier cette hypothèse et cette corrélation puisque l'expression vasculaire des IL-4 et IL-13 (principales cytokines inductrices de la polarisation des macrophages) ou leurs concentrations systémiques n'ont pas été mesurées dans notre étude.

D'autre part, l'exercice physique pourrait être à l'origine de la synthèse d'un ligand endogène du PPAR- γ responsable de son activation. En effet, des études récentes montrent que, lors de l'exercice physique, l'activité du PPAR- γ est stimulée (Thomas et al, 2012, Yakeu et al, 2010). L'activation de ce dernier peut engendrer des effets protecteurs anti-inflammatoires, notamment au niveau des macrophages. Bien que diverses études mettent en avant le rôle-clé du PPAR- γ dans la polarisation des macrophages alternatifs M2 (Coste et al, 2003 ; Bouhlef et al, 2007 ; Chinetti et al, 2003 ; Fujisaka et al,

2011 ; Gordon et al, 2003), notre étude montre que l'activation du PPAR- γ dans le groupe « telmisartan » et «exercice soumis » sur tapis, ne permet pas d'induire des macrophages M2 au niveau des lésions athéromateuses. Ces résultats rejoignent ceux de l'étude de Bouhlef et al (2007) qui montrent que l'activation des PPAR- γ , suite à un traitement pharmacologique, ne permet pas non plus d'induire des marqueurs de macrophages M2 au niveau des lésions athéromateuses. Cependant, l'activation du PPAR- γ s'accompagne d'une désactivation des macrophages M1 (Bouhlef et al, 2007 ; Pascual et al, 2005) et engendre une diminution des médiateurs inflammatoires (Ricote et al, 1998 ; Matsumura et al, 2011 ; Blessing et al, 2007). Notre étude montre par ailleurs que le telmisartan permet de modifier le ratio M1/M2 (CD11C/CD206) en faveur des M2. De manière intéressante, le « telmisartan » diminue de manière significative les marqueurs de macrophages de type M1, sans modifier l'expression des M2. Nos résultats rejoignent ceux de Fujisaka et al (2009, 2011) qui montrent que le traitement avec le telmisartan ou un activateur de PPAR- γ chez la souris alimentée avec un régime gras diminue les marqueurs des macrophages M1 au niveau du tissu adipeux. Par ailleurs, dans notre étude, les souris traitées avec le telmisartan présentent une baisse significative de la pression artérielle et des cytokines pro-inflammatoires au niveau vasculaire. De manière, intéressante malgré cet effet cumulé, l'extension des lésions athéromateuses est comparable entre le groupe « exercice volontaire » et le « telmisartan ». Ceci suggère que « l'exercice volontaire » peut s'avérer aussi efficace que le « traitement pharmacologique telmisartan » pour réduire la progression de l'athérosclérose. De plus, la baisse de la progression des lésions athéromateuses est fortement corrélée à un ratio anti-inflammatoire M2. Ceci met en évidence un rôle important des macrophages anti-inflammatoires dans la progression de l'athérosclérose.

Lors de cette étude, nous avons montré que « l'exercice physique volontaire » diminue la progression des lésions athéromateuses, de manière similaire au traitement pharmacologique « telmisartan ». D'autre part, cette étude montre, pour la première fois, que l'exercice physique stimule les PPAR- γ vasculaires et engendre des effets anti-inflammatoires. Par ailleurs, au-delà d'un effet anti-inflammatoire, l'exercice physique est capable de moduler le phénotype des macrophages.



L'exercice physique pourrait constituer une stratégie thérapeutique d'intérêt pour le contrôle de la réponse inflammatoire des lésions athéromateuses. En effet, l'exercice physique agit de façon ciblée sur les PPAR-γ et cytokines pro-inflammatoires, au niveau des lésions athéromateuses sans aucun effet secondaire (prise de poids, œdème) et favorise la stabilité des lésions athéromateuses de manière comparable au traitement pharmacologique. D'autre part, dans certaines conditions, l'exercice physique agit directement au niveau du système immunitaire inné puisqu'il stimule le système anti-inflammatoire via la synthèse des macrophages M2. La modulation du système immunitaire inné apparaît comme une stratégie novatrice dans le traitement des maladies cardio-métabolique.

Lors de cette étude, nous avons essentiellement travaillé au niveau vasculaire sur les marqueurs des macrophages M1 et M2. Afin de mieux comprendre le rôle de l'exercice sur la polarisation

des macrophages lésionnels, il me semble intéressant de cibler plus précisément des macrophages présents au niveau des lésions inflammatoires athéromateuses afin de mieux comprendre leurs implications. D'autre part, afin de déterminer si la polarisation des macrophages en faveur des macrophages M1 ou M2 est réalisée au niveau local ou au niveau systémique, il nous semble intéressant d'étudier le phénotype des monocytes/macrophages présent au niveau sanguin. Puis pour conclure, il me semble captivant d'étudier l'effet d'un retour d'un style de vie inactif sur la polarisation des macrophages.

BIBLIOGRAPHIE

- Bouhlef, M. A., Staels, B. & Chinetti-Gbaguidi, G. 2008, 'Peroxisome proliferator-activated receptors--from active regulators of macrophage biology to pharmacological targets in the treatment of cardiovascular disease', *J Intern Med*, vol. 263, no. 1, pp. 28-42.
- Boyle, J. J. 2005, 'Macrophage activation in atherosclerosis: pathogenesis and pharmacology of plaque rupture', *Curr Vasc Pharmacol*, vol. 3, no. 1, pp. 63-68.
- Brechot, N., Gomez, E., Bignon, M., Khallou-Laschet, J., Dussiot, M., Cazes, A., Alanio-Brechot, C., Durand, M., Philippe, J., Silvestre, J. S., Van Rooijen, N., Corvol, P., Nicoletti, A., Chazaud, B. & Germain, S. 2008, 'Modulation of macrophage activation state protects tissue from necrosis during critical limb ischemia in thrombospondin-1-deficient mice', *PLoS One*, vol. 3, no. 12.
- Brown, D. A., Johnson, M. S., Armstrong, C. J., Lynch, J. M., Caruso, N. M., Ehlers, L. B., Fleshner, M., Spencer, R. L. & Moore, R. L. 2007, 'Short-term treadmill running in the rat: what kind of stressor is it?', *J Appl Physiol*, vol. 103, no. 6, pp. 1979-1985.
- Caligiuri, G., Rudling, M., Ollivier, V., Jacob, M. P., Michel, J. B., Hansson, G. K. & Nicoletti, A. 2003, 'Interleukin-10 deficiency increases atherosclerosis, thrombosis, and low-density lipoproteins in apolipoprotein E knockout mice', *Mol Med*, vol. 9, no. 1-2, pp. 10-17.
- Castrillo, A. & Tontonoz, P. 2004, 'Nuclear receptors in macrophage biology: at the crossroads of lipid metabolism and inflammation', *Annu Rev Cell Dev Biol*, vol. 20, pp. 455-480.
- Charo, I. F. 2007, 'Macrophage polarization and insulin resistance: PPARgamma in control', *Cell Metab*, vol. 6, no. 2, pp. 96-98.
- Chapriot, P., Rolland, P. H., Friggi, A., Piquet, P., Scalbert, E., Bodard, H., Barlatier, A., Latrille, V., Tranier, P., Mercier, C. & et, a. I. 1993, 'ACE inhibition with perindopril and atherogenesis-induced structural and functional changes in minipig arteries', *Arterioscler Thromb*, vol. 13, no. 8, pp. 1125-1138.
- Chen, Y., Green, S. R., Ho, J., Li, A., Almazan, F. & Quehenberger, O. 2005, 'The mouse CCR2 gene is regulated by two promoters that are responsive to plasma cholesterol and peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands', *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 332, no. 1, pp. 188-193.
- Chen, Z., Ishibashi, S., Perrey, S., Osuga, J. i., Gotoda, T., Kitamine, T., Tamura, Y., Okazaki, H., Yahagi, N., Iizuka, Y., Shionoiri, F., Ohashi, K., Harada, K., Shimano, H., Nagai, R. & Yamada, N. 2001, 'Troglitazone inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice: pleiotropic effects on CD36 expression and HDL', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, vol. 21, no. 3, pp. 372-377.
- Chinetti, G., Fruchart, J. C. & Staels, B. 2000, 'Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation', *Inflamm Res*, vol. 49, no. 10, pp. 497-505.
- Chinetti, G., Fruchart, J. C. & Staels, B. 2003, 'Peroxisome proliferator-activated receptors: new targets for the pharmacological modulation of macrophage gene expression and function', *Curr Opin Lipidol*, vol. 14, no. 5, pp. 459-468.
- Claria, J., Gonzalez-Periz, A., Lopez-Vicario, C., Rius, B. & Titos, E. 2011, 'New insights into the role of macrophages in adipose tissue inflammation and Fatty liver disease: modulation by endogenous omega-3 Fatty Acid-derived lipid mediators', *Front Immunol*, vol. 2, p. 49.
- Clark, R. B., Bishop-Bailey, D., Estrada-Hernandez, T., Hla, T., Puddington, L. & Padula, S. J. 2000, 'The nuclear receptor PPAR gamma and immunoregulation: PPAR gamma mediates inhibition of helper T cell responses', *J Immunol*, vol. 164, no. 3, pp. 1364-1371.
- Cole, J. E., Georgiou, E. & Monaco, C. 2010, 'The expression and functions of toll-like receptors in atherosclerosis', *Mediators Inflamm*, vol. 2010, p. 393946.
- Collins, A. R., Meehan, W. P., Kintscher, U., Jackson, S., Wakino, S., Noh, G., Palinski, W., Hsueh, W. A. & Law, R. E. 2001, 'Troglitazone inhibits formation of early atherosclerotic lesions in diabetic and nondiabetic low density lipoprotein receptor-deficient mice', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, vol. 21, no. 3, pp. 365-371.

- Coste, A., Dubourdeau, M., Linas, M. D., Cassaing, S., Lepert, J. C., Balard, P., Chalmeton, S., Bernad, J., Orfila, C., Seguela, J. P. & Pipy, B. 2003, 'PPARgamma promotes mannose receptor gene expression in murine macrophages and contributes to the induction of this receptor by IL-13', *Immunity*, vol. 19, no. 3, pp. 329-339.
- Craig, W. Y., Palomaki, G. E. & Haddow, J. E. 1989, 'Cigarette smoking and serum lipid and lipoprotein concentrations: an analysis of published data', *BMJ*, vol. 298, no. 6676, pp. 784-788.
- Dansky, H. M., Charlton, S. A., Harper, M. M. & Smith, J. D. 1997, 'T and B lymphocytes play a minor role in atherosclerotic plaque formation in the apolipoprotein E-deficient mouse', *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 94, no. 9, pp. 4642-4646.
- Daugherty, A., Manning, M. W. & Cassis, L. A. 2000, 'Angiotensin II promotes atherosclerotic lesions and aneurysms in apolipoprotein E-deficient mice', *J Clin Invest*, vol. 105, no. 11, pp. 1605-1612.
- Davies, M. J. 1996, 'Stability and instability: two faces of coronary atherosclerosis. The Paul Dudley White Lecture 1995', *Circulation*, vol. 94, no. 8, pp. 2013-2020.
- Davies, M. J., Richardson, P. D., Woolf, N., Katz, D. R. & Mann, J. 1993, 'Risk of thrombosis in human atherosclerotic plaques: role of extracellular lipid, macrophage, and smooth muscle cell content', *Br Heart J*, vol. 69, no. 5, pp. 377-381.
- Davignon, J. & Mabile, L. 2001, '[Mechanisms of action of statins and their pleiotropic effects]', *Ann Endocrinol (Paris)*, vol. 62, no. 1 Pt 2, pp. 101-112.
- Delerive, P., Fruchart, J. C. & Staels, B. 2001, 'Peroxisome proliferator-activated receptors in inflammation control', *J Endocrinol*, vol. 169, no. 3, pp. 453-459.
- Desvergne, B. & Wahli, W. 1999, 'Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism', *Endocr Rev*, vol. 20, no. 5, pp. 649-688.
- Duriez, P. 2004, '[Mechanisms of formation of atheroma plaque]', *Rev Med Interne*, vol. 25 Suppl 1, pp. S3-6.
- Duval, C., Fruchart, J. C. & Staels, B. 2004, 'PPAR alpha, fibrates, lipid metabolism and inflammation', *Arch Mal Coeur Vaiss*, vol. 97, no. 6, pp. 665-672.
- Fagard, R. H. & Cornelissen, V. A. 2007, 'Effect of exercise on blood pressure control in hypertensive patients', *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*, vol. 14, no. 1, pp. 12-17.
- Fagard, R. H. 2006, 'Exercise is good for your blood pressure: effects of endurance training and resistance training', *Clin Exp Pharmacol Physiol*, vol. 33, no. 9, pp. 853-856.
- Feig, J. E., Rong, J. X., Shamir, R., Sanson, M., Vengrenyuk, Y., Liu, J., Rayner, K., Moore, K., Garabedian, M. & Fisher, E. A. 2011, 'HDL promotes rapid atherosclerosis regression in mice and alters inflammatory properties of plaque monocyte-derived cells', *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 108, no. 17, pp. 7166-7171.
- Frick, M. H., Elo, O., Haapa, K., Heinonen, O. P., Heinsalmi, P., Helo, P., Huttunen, J. K., Kaitaniemi, P., Koskinen, P., Manninen, V. & et, a. I. 1987, 'Helsinki Heart Study: primary-prevention trial with gemfibrozil in middle-aged men with dyslipidemia. Safety of treatment, changes in risk factors, and incidence of coronary heart disease', *N Engl J Med*, vol. 317, no. 20, pp. 1237-1245.
- Fruchart, J. C., Duriez, P. & Staels, B. 1999, '[Molecular mechanism of action of the fibrates]', *J Soc Biol*, vol. 193, no. 1, pp. 67-75.
- Fujisaka, S., Usui, I., Bukhari, A., Ikutani, M., Oya, T., Kanatani, Y., Tsuneyama, K., Nagai, Y., Takatsu, K., Urakaze, M., Kobayashi, M. & Tobe, K. 2009, 'Regulatory mechanisms for adipose tissue M1 and M2 macrophages in diet-induced obese mice', *Diabetes*, vol. 58, no. 11, pp. 2574-2582.
- Fujisaka, S., Usui, I., Kanatani, Y., Ikutani, M., Takasaki, I., Tsuneyama, K., Tabuchi, Y., Bukhari, A., Yamazaki, Y., Suzuki, H., Senda, S., Aminuddin, A., Nagai, Y., Takatsu, K., Kobayashi, M. & Tobe, K. 2011, 'Telmisartan improves insulin resistance and modulates adipose tissue macrophage polarization in high-fat-fed mice', *Endocrinology*, vol. 152, no. 5, pp. 1789-1799.
- Fukao, K., Shimada, K., Naito, H., Sumiyoshi, K., Inoue, N., Iesaki, T., Kume, A., Kiyanagi, T., Hiki, M., Hirose, K., Matsumori, R., Ohsaka, H., Takahashi, Y., Toyoda, S., Itoh, S., Miyazaki, T., Tada, N. & Daida, H. 2010, 'Voluntary exercise ameliorates

- Higuchi, M., Hashimoto, I. & Yamakawa, K. 1985, 'Effect of exercise training on aortic collagen content in spontaneously hypertensive rats (SHR)', *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, vol. 53, no. 4, pp. 330-333.
- Higuchi, M., Hashimoto, I. & Yamakawa, K. 1985, 'Effect of exercise training on aortic collagen content in spontaneously hypertensive rats (SHR)', *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, vol. 53, no. 4, pp. 330-333.
- Hirata, Y., Tabata, M., Kurobe, H., Motoki, T., Akaike, M., Nishio, C., Higashida, M., Mikasa, H., Nakaya, Y., Takanashi, S., Igarashi, T., Kitagawa, T. & Sata, M. 2011, 'Coronary atherosclerosis is associated with macrophage polarization in epicardial adipose tissue', *J Am Coll Cardiol*, vol. 58, no. 3, pp. 248-255.
- Hoffman-Goetz, L., Keir, R., Thorne, R., Houston, M. E. & Young, C. 1986, 'Chronic exercise stress in mice depresses splenic T lymphocyte mitogenesis in vitro', *Clin Exp Immunol*, vol. 66, no. 3, pp. 551-557.
- Hu, F. B., Manson, J. E., Stampfer, M. J., Colditz, G., Liu, S., Solomon, C. G. & Willett, W. C. 2001, 'Diet, lifestyle, and the risk of type 2 diabetes mellitus in women', *N Engl J Med*, vol. 345, no. 11, pp. 790-797.
- Iglarz, M., Touyz, R. M., Amiri, F., Lavoie, M. F., Diep, Q. N. & Schiffrin, E. L. 2003, 'Effect of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and -gamma activators on vascular remodeling in endothelin-dependent hypertension', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, vol. 23, no. 1, pp. 45-51.
- Ikeda, H., Minamikawa, J., Nakamura, Y., Honjo, S., Hamamoto, Y., Wada, Y., Nabe, K. & Koshiyama, H. 2009, 'Comparison of effects of amlodipine and angiotensin receptor blockers on the intima-media thickness of carotid arterial wall (AAA study: amlodipine vs. ARB in atherosclerosis study)', *Diabetes Res Clin Pract*, vol. 83, no. 1, pp. 50-53.
- Jiang, C., Ting, A. T. & Seed, B. 1998, 'PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines', *Nature*, vol. 391, no. 6662, pp. 82-86.
- Johnson, H. M., Piper, M. E., Baker, T. B., Fiore, M. C. & Stein, J. H. 2012, 'Effects of smoking and cessation on subclinical arterial disease: a substudy of a randomized controlled trial', *PLoS One*, vol. 7, no. 4.
- Johnson, J. L. & Newby, A. C. 2009, 'Macrophage heterogeneity in atherosclerotic plaques', *Curr Opin Lipidol*, vol. 20, no. 5, pp. 370-378.
- Jolliffe, J. A., Rees, K., Taylor, R. S., Thompson, D., Oldridge, N. & Ebrahim, S. 2000, 'Exercise-based rehabilitation for coronary heart disease', *Cochrane Database Syst Rev*, no. 4.
- Jonasson, L., Holm, J., Skalli, O., Bondjers, G. & Hansson, G. K. 1986, 'Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque', *Arteriosclerosis*, vol. 6, no. 2, pp. 131-138.
- Jukema, J. W., Bruschke, A. V., van Boven, A. J., Reiber, J. H., Bal, E. T., Zwinderman, A. H., Jansen, H., Boerma, G. J., van Rappard, F. M., Lie, K. I. & et, a. I. 1995, 'Effects of lipid lowering by pravastatin on progression and regression of coronary artery disease in symptomatic men with normal to moderately elevated serum cholesterol levels. The Regression Growth Evaluation Statin Study (REGRESS)', *Circulation*, vol. 91, no. 10, pp. 2528-2540.
- Kadoglou, N. P., Iliadis, F. & Liapis, C. D. 2008, 'Exercise and carotid atherosclerosis', *Eur J Vasc Endovasc Surg*, vol. 35, no. 3, pp. 264-272.
- Kalra, V. K., Ying, Y., Deemer, K., Natarajan, R., Nadler, J. L. & Coates, T. D. 1994, 'Mechanism of cigarette smoke condensate induced adhesion of human monocytes to cultured endothelial cells', *J Cell Physiol*, vol. 160, no. 1, pp. 154-162.
- Kanter, J. E., Kramer, F., Barnhart, S., Averill, M. M., Vivekanandan-Giri, A., Vickery, T., Li, L. O., Becker, L., Yuan, W., Chait, A., Braun, K. R., Potter-Perigo, S., Sanda, S., Wight, T. N., Pennathur, S., Serhan, C. N., Heinecke, J. W. & Coleman. 2012, 'Diabetes promotes an inflammatory macrophage phenotype and atherosclerosis through acyl-CoA synthetase 1', *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Kawanishi, N., Yano, H., Yokogawa, Y. & Suzuki, K. 2010, 'Exercise training inhibits inflammation in adipose tissue via both suppression of macrophage infiltration and acceleration of phenotypic switching from M1 to M2 macrophages in high-fat-diet-induced obese mice', *Exerc Immunol Rev*, vol. 16, pp. 105-118.

- Kawanishi, N., Yano, H., Yokogawa, Y. & Suzuki, K. 2010, 'Exercise training inhibits inflammation in adipose tissue via both suppression of macrophage infiltration and acceleration of phenotypic switching from M1 to M2 macrophages in high-fat-diet-induced obese mice', *Exerc Immunol Rev*, vol. 16, pp. 105-118.
- Kawanishi, N., Yano, H., Yokogawa, Y. & Suzuki, K. 2010, 'Exercise training inhibits inflammation in adipose tissue via both suppression of macrophage infiltration and acceleration of phenotypic switching from M1 to M2 macrophages in high-fat-diet-induced obese mice', *Exerc Immunol Rev*, vol. 16, pp. 105-118.
- Khallou-Laschet, J., Varthaman, A., Fornasa, G., Compain, C., Gaston, A. T., Clement, M., Dussiot, M., Levillain, O., Graff-Dubois, S., Nicoletti, A. & Caligiuri, G. 2010, 'Macrophage plasticity in experimental atherosclerosis', *PLoS One*, vol. 5, no. 1.
- Kim, S. H., Lee, S. J., Kang, E. S., Kang, S., Hur, K. Y., Lee, H. J., Ahn, C. W., Cha, B. S., Yoo, J. S. & Lee, H. C. 2006, 'Effects of lifestyle modification on metabolic parameters and carotid intima-media thickness in patients with type 2 diabetes mellitus', *Metabolism*, vol. 55, no. 8, pp. 1053-1059.
- Koga, M., Kai, H., Yasukawa, H., Kato, S., Yamamoto, T., Kawai, Y., Kusaba, K., Seki, Y., Kai, M., Egashira, K., Kataoka, Y. & Imaizumi, T. 2007, 'Postnatal blocking of interferon-gamma function prevented atherosclerotic plaque formation in apolipoprotein E-knockout mice', *Hypertens Res*, vol. 30, no. 3, pp. 259-267.
- Kolodgie, F. D., Burke, A. P., Farb, A., Gold, H. K., Yuan, J., Narula, J., Finn, A. V. & Virmani, R. 2001, 'The thin-cap fibroatheroma: a type of vulnerable plaque: the major precursor lesion to acute coronary syndromes', *Curr Opin Cardiol*, vol. 16, no. 5, pp. 285-292.
- Kump, D. S. & Booth, F. W. 2005, 'Alterations in insulin receptor signalling in the rat epitrochlearis muscle upon cessation of voluntary exercise', *J Physiol*, vol. 562, no. Pt 3, pp. 829-838.
- Laakso, M. 1998, 'Hypertension and macrovascular disease--the killing fields of NIDDM', *Diabetes Res Clin Pract*, vol. 39 Suppl, pp. S27-33.
- Lakka, T. A., Lakka, H. M., Rankinen, T., Leon, A. S., Rao, D. C., Skinner, J. S., Wilmore, J. H. & Bouchard, C. 2005, 'Effect of exercise training on plasma levels of C-reactive protein in healthy adults: the HERITAGE Family Study', *Eur Heart J*, vol. 26, no. 19, pp. 2018-2025.
- Langenfeld, M. R., Forst, T., Hohberg, C., Kann, P., Lubben, G., Konrad, T., Fullert, S. D., Sachara, C. & Pfutzner, A. 2005, 'Pioglitazone decreases carotid intima-media thickness independently of glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus: results from a controlled randomized study', *Circulation*, vol. 111, no. 19, pp. 2525-2531.
- Laufs, U., Wassmann, S., Czech, T., Munzel, T., Eisenhauer, M., Bohm, M. & Nickenig, G. 2005, 'Physical inactivity increases oxidative stress, endothelial dysfunction, and atherosclerosis', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, vol. 25, no. 4, pp. 809-814.
- Leasure, J. L. & Jones, M. 2008, 'Forced and voluntary exercise differentially affect brain and behavior', *Neuroscience*, vol. 156, no. 3, pp. 456-465.
- Lee, S., Huen, S., Nishio, H., Nishio, S., Lee, H. K., Choi, B. S., Ruhrberg, C. & Cantley, L. G. 2011, 'Distinct macrophage phenotypes contribute to kidney injury and repair', *J Am Soc Nephrol*, vol. 22, no. 2, pp. 317-326.
- Leon, A. S. & Sanchez, O. A. 2001, 'Response of blood lipids to exercise training alone or combined with dietary intervention', *Med Sci Sports Exerc*, vol. 33, no. 6 Suppl, pp. S502-15; discussion S528-.
- Li, A. C., Binder, C. J., Gutierrez, A., Brown, K. K., Plotkin, C. R., Pattison, J. W., Valledor, A. F., Davis, R. A., Willson, T. M., Witztum, J. L., Palinski, W. & Glass, C. K. 2004, 'Differential inhibition of macrophage foam-cell formation and atherosclerosis in mice by PPARalpha, beta/delta, and gamma', *J Clin Invest*, vol. 114, no. 11, pp. 1564-1576.
- Li, A. C., Brown, K. K., Silvestre, M. J., Willson, T. M., Palinski, W. & Glass, C. K. 2000, 'Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice', *J Clin Invest*, vol. 106, no. 4, pp. 523-531.
- Li, P., Lu, M., Nguyen, M. T., Bae, E. J., Chapman, J., Feng, D., Hawkins, M., Pessin, J. E., Sears, D. D., Nguyen, A. K., Amidi, A., Watkins, S. M., Nguyen, U. & Olefsky, J. M. 2010, 'Functional heterogeneity of CD11c-positive adipose tissue macrophages in diet-induced obese mice', *J Biol Chem*, vol. 285, no. 20, pp. 15333-15345.

- Libby, P., Okamoto, Y., Rocha, V. Z. & Folco, E. 2010, 'Inflammation in atherosclerosis: transition from theory to practice', *Circ J*, vol. 74, no. 2, pp. 213-220.
- Libby, P., Ridker, P. M. & Hansson, G. K. 2011, 'Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis', *Nature*, vol. 473, no. 7347, pp. 317-325.
- Libby, P., Ridker, P. M. & Maseri, A. 2002, 'Inflammation and atherosclerosis', *Circulation*, vol. 105, no. 9, pp. 1135-1143.
- Lindstrom, J., Ilanne-Parikka, P., Peltonen, M., Aunola, S., Eriksson, J. G., Hemio, K., Hamalainen, H., Harkonen, P., Keinanen-Kiukaanniemi, S., Laakso, M., Louheranta, A., Mannelin, M., Paturi, M., Sundvall, J., Valle, T. T., Uusitupa, M. & Tuomileh. 2006, 'Sustained reduction in the incidence of type 2 diabetes by lifestyle intervention: follow-up of the Finnish Diabetes Prevention Study', *Lancet*, vol. 368, no. 9548, pp. 1673-1679.
- Lu, H., Balakrishnan, A., Howatt, D. A., Wu, C., Charnigo, R., Liao, G., Cassis, L. A. & Daugherty, A. 2011, 'Comparative effects of different modes of renin angiotensin system inhibition on hypercholesterolaemia-induced atherosclerosis. LID - 10.1111/j.1476-5381.2011.01712.x [doi]', *Br J Pharmacol*.
- Lu, H., Balakrishnan, A., Howatt, D. A., Wu, C., Charnigo, R., Liao, G., Cassis, L. A. & Daugherty, A. 2012, 'Comparative effects of different modes of renin angiotensin system inhibition on hypercholesterolaemia-induced atherosclerosis', *Br J Pharmacol*, vol. 165, no. 6, pp. 2000-8 LID - 10.1111/j.14.
- Lumeng, C. N., Bodzin, J. L. & Saltiel, A. R. 2007, 'Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization', *J Clin Invest*, vol. 117, no. 1, pp. 175-184.
- Luquet, S., Gaudel, C., Holst, D., Lopez-Soriano, J., Jehl-Pietri, C., Fredenrich, A. & Grimaldi, P. A. 2005, 'Roles of PPAR delta in lipid absorption and metabolism: a new target for the treatment of type 2 diabetes', *Biochim Biophys Acta*, vol. 1740, no. 2, pp. 313-317.
- Mallat, Z., Besnard, S., Duriez, M., Deleuze, V., Emmanuel, F., Bureau, M. F., Soubrier, F., Esposito, B., Duez, H., Fievet, C., Staels, B., Duverger, N., Scherman, D. & Tedgui, A. 1999, 'Protective role of interleukin-10 in atherosclerosis', *Circ Res*, vol. 85, no. 8, pp. e17-24.
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A. & Locati, M. 2004, 'The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization', *Trends Immunol*, vol. 25, no. 12, pp. 677-686.
- Marx, N., Imhof, A., Froehlich, J., Siam, L., Ittner, J., Wierse, G., Schmidt, A., Maerz, W., Hombach, V. & Koenig, W. 2003, 'Effect of rosiglitazone treatment on soluble CD40L in patients with type 2 diabetes and coronary artery disease', *Circulation*, vol. 107, no. 15, pp. 1954-1957.
- Marx, N., Kehrle, B., Kohlhammer, K., Grub, M., Koenig, W., Hombach, V., Libby, P. & Plutzky, J. 2002, 'PPAR activators as antiinflammatory mediators in human T lymphocytes: implications for atherosclerosis and transplantation-associated arteriosclerosis', *Circ Res*, vol. 90, no. 6, pp. 703-710.
- Marx, N., Sukhova, G., Murphy, C., Libby, P. & Plutzky, J. 1998, 'Macrophages in human atheroma contain PPARgamma: differentiation-dependent peroxisomal proliferator-activated receptor gamma(PPARgamma) expression and reduction of MMP-9 activity through PPARgamma activation in mononuclear phagocytes in vitro', *Am J Pathol*, vol. 153, no. 1, pp. 17-23.
- Maseri, A. 1997, 'Inflammation, atherosclerosis, and ischemic events -- exploring the hidden side of the moon', *N Engl J Med*, vol. 336, no. 14, pp. 1014-1016.
- Matsumura, T., Kinoshita, H., Ishii, N., Fukuda, K., Motoshima, H., Senokuchi, T., Taketa, K., Kawasaki, S., Nishimaki-Mogami, T., Kawada, T., Nishikawa, T. & Araki, E. 2011, 'Telmisartan exerts antiatherosclerotic effects by activating peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in macrophages', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, vol. 31, no. 6, pp. 1268-1275.
- Mayhan, W. G. & Sharpe, G. M. 1996, 'Effect of cigarette smoke extract on arteriolar dilatation in vivo', *J Appl Physiol*, vol. 81, no. 5, pp. 1996-2003.
- Mazzolai, L., Duchosal, M. A., Korber, M., Bouzourene, K., Aubert, J. F., Hao, H., Vallet, V., Brunner, H. R., Nussberger, J., Gabbiani, G. & Hayoz, D. 2004, 'Endogenous angiotensin II induces atherosclerotic plaque vulnerability and elicits a Th1 response in ApoE^{-/-} mice', *Hypertension*, vol. 44, no. 3, pp. 277-282.

- McVeigh, G. E., Lemay, L., Morgan, D. & Cohn, J. N. 1996, 'Effects of long-term cigarette smoking on endothelium-dependent responses in humans', *Am J Cardiol*, vol. 78, no. 6, pp. 668-672.
- Mokdad, A. H., Marks, J. S., Stroup, D. F. & Gerberding, J. L. 2005, 'Correction: actual causes of death in the United States, 2000', *JAMA*, vol. 293, no. 3, pp. 293-294.
- Moore, K. J. & Tabas, I. 2011, 'Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis', *Cell*, vol. 145, no. 3, pp. 341-355.
- Mora, S., Lee, I. M., Buring, J. E. & Ridker, P. M. 2006, 'Association of physical activity and body mass index with novel and traditional cardiovascular biomarkers in women', *JAMA*, vol. 295, no. 12, pp. 1412-1419.
- Moraska, A., Deak, T., Spencer, R. L., Roth, D. & Fleshner, M. 2000, 'Treadmill running produces both positive and negative physiological adaptations in Sprague-Dawley rats', *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, vol. 279, no. 4, pp. R1321-9.
- Mosser, D. M. & Edwards, J. P. 2008, 'Exploring the full spectrum of macrophage activation', *Nat Rev Immunol*, vol. 8, no. 12, pp. 958-969.
- Moye, L. A., Pfeffer, M. A., Wun, C. C., Davis, B. R., Geltman, E., Hayes, D., Farnham, D. J., Randall, O. S., Dinh, H., Arnold, J. M. & et, a. I. 1994, 'Uniformity of captopril benefit in the SAVE Study: subgroup analysis. Survival and Ventricular Enlargement Study', *Eur Heart J*, vol. 15 Suppl B, pp. 2-8; discussion 26-30.
- Naghavi, M., Falk, E., Hecht, H. S., Jamieson, M. J., Kaul, S., Berman, D., Fayad, Z., Budoff, M. J., Rumberger, J., Naqvi, T. Z., Shaw, L. J., Faergeman, O., Cohn, J., Bahr, R., Koenig, W., Demirovic, J., Arking, D., Herrera, V. L., Badimon, J. & Gol. 2006, 'From vulnerable plaque to vulnerable patient--Part III: Executive summary of the Screening for Heart Attack Prevention and Education (SHAPE) Task Force report', *Am J Cardiol*, vol. 98, no. 2A, pp. 2H-15H.
- Naghavi, M., Libby, P., Falk, E., Casscells, S. W., Litovsky, S., Rumberger, J., Badimon, J. J., Stefanadis, C., Moreno, P., Pasterkamp, G., Fayad, Z., Stone, P. H., Waxman, S., Raggi, P., Madjid, M., Zarrabi, A., Burke, A., Yuan, C. & Fitzgerald, P. 2003, 'From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part I', *Circulation*, vol. 108, no. 14, pp. 1664-1672.
- Napoli, C., Williams-Ignarro, S., de Nigris, F., Lerman, L. O., D'Armiento, F. P., Crimi, E., Byrns, R. E., Casamassimi, A., Lanza, A., Gombos, F., Sica, V. & Ignarro, L. J. 2006, 'Physical training and metabolic supplementation reduce spontaneous atherosclerotic plaque rupture and prolong survival in hypercholesterolemic mice', *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 103, no. 27, pp. 10479-10484.
- Napoli, C., Williams-Ignarro, S., De Nigris, F., Lerman, L. O., Rossi, L., Guarino, C., Mansueto, G., Di Tuoro, F., Pignalosa, O., De Rosa, G., Sica, V. & Ignarro, L. J. 2004, 'Long-term combined beneficial effects of physical training and metabolic treatment on atherosclerosis in hypercholesterolemic mice', *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 101, no. 23, pp. 8797-8802.
- Niebauer, J. 2008, 'Effects of exercise training on inflammatory markers in patients with heart failure', *Heart Fail Rev*, vol. 13, no. 1, pp. 39-49.
- Nordstrom, C. K., Dwyer, K. M., Merz, C. N., Shircore, A. & Dwyer, J. H. 2003, 'Leisure time physical activity and early atherosclerosis: the Los Angeles Atherosclerosis Study', *Am J Med*, vol. 115, no. 1, pp. 19-25.
- Nussberger, J., Aubert, J. F., Bouzourene, K., Pellegrin, M., Hayoz, D. & Mazzolai, L. 2008, 'Renin inhibition by aliskiren prevents atherosclerosis progression: comparison with irbesartan, atenolol, and amlodipine', *Hypertension*, vol. 51, no. 5, pp. 1306-1311.
- Odegaard, J. I., Ricardo-Gonzalez, R. R., Goforth, M. H., Morel, C. R., Subramanian, V., Mukundan, L., Red Eagle, A., Vats, D., Brombacher, F., Ferrante, A. W. & Chawla, A. 2007, 'Macrophage-specific PPARgamma controls alternative activation and improves insulin resistance', *Nature*, vol. 447, no. 7148, pp. 1116-1120.
- Okabe, T. A., Kishimoto, C., Murayama, T., Yokode, M. & Kita, T. 2006, 'Effects of exercise on the development of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice', *Exp Clin Cardiol*, vol. 11, no. 4, pp. 276-279.
- Okabe, T. A., Shimada, K., Hattori, M., Murayama, T., Yokode, M., Kita, T. & Kishimoto, C. 2007, 'Swimming reduces the severity of atherosclerosis in apolipoprotein E deficient mice by antioxidant effects', *Cardiovasc Res*, vol. 74, no. 3, pp. 537-545.

- Ota, Y., Kugiyama, K., Sugiyama, S., Ohgushi, M., Matsumura, T., Doi, H., Ogata, N., Oka, H. & Yasue, H. 1997, 'Impairment of endothelium-dependent relaxation of rabbit aortas by cigarette smoke extract--role of free radicals and attenuation by captopril', *Atherosclerosis*, vol. 131, no. 2, pp. 195-202.
- Padilla, J., Kaur, K., Cao, H. J., Smith, T. J. & Phipps, R. P. 2000, 'Peroxisome proliferator activator receptor-gamma agonists and 15-deoxy-Delta(12,14)(12,14)-PGJ(2) induce apoptosis in normal and malignant B-lineage cells', *J Immunol*, vol. 165, no. 12, pp. 6941-6948.
- Park, H. W., Kim, W. H., Kim, K. H., Yang, D. J., Kim, J. H., Song, I. G., Kwon, T. G. & Bae, J. H. 2011, 'Carotid plaque is associated with increased cardiac mortality in patients with coronary artery disease', *Int J Cardiol*.
- Pascual, G. & Glass, C. K. 2006, 'Nuclear receptors versus inflammation: mechanisms of transrepression', *Trends Endocrinol Metab*, vol. 17, no. 8, pp. 321-327.
- Pascual, G., Fong, A. L., Ogawa, S., Gamliel, A., Li, A. C., Perissi, V., Rose, D. W., Willson, T. M., Rosenfeld, M. G. & Glass, C. K. 2005, 'A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR-gamma', *Nature*, vol. 437, no. 7059, pp. 759-763.
- Patsouris, D., Li, P. P., Thapar, D., Chapman, J., Olefsky, J. M. & Neels, J. G. 2008, 'Ablation of CD11c-positive cells normalizes insulin sensitivity in obese insulin resistant animals', *Cell Metab*, vol. 8, no. 4, pp. 301-309.
- Pedersen, B. K. 2009, 'The diseasome of physical inactivity--and the role of myokines in muscle--fat cross talk', *J Physiol*, vol. 587, no. Pt 23, pp. 5559-5568.
- Pellegrin, M., Alonso, F., Aubert, J. F., Bouzourene, K., Braunersreuther, V., Mach, F., Haefliger, J. A., Hayoz, D., Berthelot, A., Nussberger, J., Laurant, P. & Mazzolai, L. 2009, 'Swimming prevents vulnerable atherosclerotic plaque development in hypertensive 2-kidney, 1-clip mice by modulating angiotensin II type 1 receptor expression independently from hemodynamic changes', *Hypertension*, vol. 53, no. 5, pp. 782-789.
- Pellegrin, M., Berthelot, A., Houdayer, C., Gaume, V., Deckert, V. & Laurant, P. 2007, 'New insights into the vascular mechanisms underlying the beneficial effect of swimming training on the endothelial vasodilator function in apolipoprotein E-deficient mice', *Atherosclerosis*, vol. 190, no. 1, pp. 35-42.
- Pellegrin, M., Miguët-Alfonsi, C., Bouzourene, K., Aubert, J. F., Deckert, V., Berthelot, A., Mazzolai, L. & Laurant, P. 2009, 'Long-term exercise stabilizes atherosclerotic plaque in ApoE knockout mice', *Med Sci Sports Exerc*, vol. 41, no. 12, pp. 2128-2135.
- Polak, J. F., Pencina, M. J., O'Leary, D. H. & D'Agostino, R. B. 2011, 'Common Carotid Artery Intima-Media Thickness Progression as a Predictor of Stroke in Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis', *Stroke*.
- Rabbani, R. & Topol, E. J. 1999, 'Strategies to achieve coronary arterial plaque stabilization', *Cardiovasc Res*, vol. 41, no. 2, pp. 402-417.
- Ramachandran, S., Penumetcha, M., Merchant, N. K., Santanam, N., Rong, R. & Parthasarathy, S. 2005, 'Exercise reduces preexisting atherosclerotic lesions in LDL receptor knock out mice', *Atherosclerosis*, vol. 178, no. 1, pp. 33-38.
- Ricote, M. & Glass, C. K. 2007, 'PPARs and molecular mechanisms of transrepression', *Biochim Biophys Acta*, vol. 1771, no. 8, pp. 926-935.
- Ricote, M., Li, A. C., Willson, T. M., Kelly, C. J. & Glass, C. K. 1998, 'The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation', *Nature*, vol. 391, no. 6662, pp. 79-82.
- Rimm, E. B., Stampfer, M. J., Giovannucci, E., Ascherio, A., Spiegelman, D., Colditz, G. A. & Willett, W. C. 1995, 'Body size and fat distribution as predictors of coronary heart disease among middle-aged and older US men', *Am J Epidemiol*, vol. 141, no. 12, pp. 1117-1127.
- Ross, R. 1999, 'Atherosclerosis is an inflammatory disease', *Am Heart J*, vol. 138, no. 5 Pt 2, pp. S419-20.
- Schillinger, M., Exner, M., Mlekusch, W., Sabeti, S., Amighi, J., Nikowitsch, R., Timmel, E., Kicking, B., Minar, C., Pones, M., Lalouschek, W., Rumpold, H., Maurer, G., Wagner, O. & Minar, E. 2005, 'Inflammation and Carotid Artery--Risk for Atherosclerosis Study (ICARAS)', *Circulation*, vol. 111, no. 17, pp. 2203-2209.

- Schlager, O., Exner, M., Mlekusch, W., Sabeti, S., Amighi, J., Dick, P., Wagner, O., Koppensteiner, R., Minar, E. & Schillinger, M. 2007, 'C-reactive protein predicts future cardiovascular events in patients with carotid stenosis', *Stroke*, vol. 38, no. 4, pp. 1263-1268.
- Schmidt-Ott, K. M., Kagiya, S. & Phillips, M. I. 2000, 'The multiple actions of angiotensin II in atherosclerosis', *Regul Pept*, vol. 93, no. 1-3, pp. 65-77.
- Shah, P. K. 2007, 'Molecular mechanisms of plaque instability', *Curr Opin Lipidol*, vol. 18, no. 5, pp. 492-499.
- Sica, A., Larghi, P., Mancino, A., Rubino, L., Porta, C., Totaro, M. G., Rimoldi, M., Biswas, S. K., Allavena, P. & Mantovani, A. 2008, 'Macrophage polarization in tumour progression', *Semin Cancer Biol*, vol. 18, no. 5, pp. 349-355.
- Sidhu, J. S., Cowan, D. & Kaski, J. C. 2003, 'The effects of rosiglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist, on markers of endothelial cell activation, C-reactive protein, and fibrinogen levels in non-diabetic coronary artery disease patients', *J Am Coll Cardiol*, vol. 42, no. 10, pp. 1757-1763.
- Slentz, C. A., Aiken, L. B., Houmard, J. A., Bales, C. W., Johnson, J. L., Tanner, C. J., Duscha, B. D. & Kraus, W. E. 2005, 'Inactivity, exercise, and visceral fat. STRIDE: a randomized, controlled study of exercise intensity and amount', *J Appl Physiol*, vol. 99, no. 4, pp. 1613-1618.
- Smorawinski, J., Kaciuba-Uscilko, H., Nazar, K., Kubala, P., Kaminska, E., Ziemba, A. W., Adrian, J. & Greenleaf, J. E. 2000, 'Effects of three-day bed rest on metabolic, hormonal and circulatory responses to an oral glucose load in endurance or strength trained athletes and untrained subjects', *J Physiol Pharmacol*, vol. 51, no. 2, pp. 279-289.
- Staels, B., Maes, M. & Zambon, A. 2008, 'Fibrates and future PPARalpha agonists in the treatment of cardiovascular disease', *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, vol. 5, no. 9, pp. 542-553.
- Stamler, J., Daviglus, M. L., Garside, D. B., Dyer, A. R., Greenland, P. & Neaton, J. D. 2000, 'Relationship of baseline serum cholesterol levels in 3 large cohorts of younger men to long-term coronary, cardiovascular, and all-cause mortality and to longevity', *JAMA*, vol. 284, no. 3, pp. 311-318.
- Stolle, K., Berges, A., Lietz, M., Lebrun, S. & Wallerath, T. 2010, 'Cigarette smoke enhances abdominal aortic aneurysm formation in angiotensin II-treated apolipoprotein E-deficient mice', *Toxicol Lett*, vol. 199, no. 3, pp. 403-409.
- Stout, R. D., Jiang, C., Matta, B., Tietzel, I., Watkins, S. K. & Suttles, J. 2005, 'Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences', *J Immunol*, vol. 175, no. 1, pp. 342-349.
- Straus, D. S. & Glass, C. K. 2007, 'Anti-inflammatory actions of PPAR ligands: new insights on cellular and molecular mechanisms', *Trends Immunol*, vol. 28, no. 12, pp. 551-558.
- Swirski, F. K., Libby, P., Aikawa, E., Alcaide, P., Luscinskas, F. W., Weissleder, R. & Pittet, M. J. 2007, 'Ly-6Chi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytosis and give rise to macrophages in atheromata', *J Clin Invest*, vol. 117, no. 1, pp. 195-205.
- Swirski, F. K., Weissleder, R. & Pittet, M. J. 2009, 'Heterogeneous in vivo behavior of monocyte subsets in atherosclerosis', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, vol. 29, no. 10, pp. 1424-1432.
- Szanto, A. & Nagy, L. 2008, 'The many faces of PPARgamma: anti-inflammatory by any means?', *Immunobiology*, vol. 213, no. 9-10, pp. 789-803.
- Tedgui, A. & Mallat, Z. 2006, 'Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways', *Physiol Rev*, vol. 86, no. 2, pp. 515-581.
- Thomas, A. W., Davies, N. A., Moir, H., Watkeys, L., Ruffino, J. S., Isa, S. A., Butcher, L. R., Hughes, M. G., Morris, K. & Webb, R. 2012, 'Exercise-associated generation of PPARgamma ligands activates PPARgamma signaling events and upregulates genes related to lipid metabolism', *J Appl Physiol*, vol. 112, no. 5, pp. 806-815.
- Thompson, P. D., Buchner, D., Pina, I. L., Balady, G. J., Williams, M. A., Marcus, B. H., Berra, K., Blair, S. N., Costa, F., Franklin, B., Fletcher, G. F., Gordon, N. F., Pate, R. R., Rodriguez, B. L., Yancey, A. K., Wenger, N. K. & CN, -. . A. 2003, 'Exercise and physical activity in the prevention and treatment of atherosclerotic cardiovascular disease: a statement from the Council on

- Wu, H., Gower, R. M., Wang, H., Perrard, X. Y., Ma, R., Bullard, D. C., Burns, A. R., Paul, A., Smith, C. W., Simon, S. I. & Ballantyne, C. M. 2009, 'Functional role of CD11c⁺ monocytes in atherogenesis associated with hypercholesterolemia', *Circulation*, vol. 119, no. 20, pp. 2708-2717.
- Yakeu, G., Butcher, L., Isa, S., Webb, R., Roberts, A. W., Thomas, A. W., Backx, K., James, P. E. & Morris, K. 2010, 'Low-intensity exercise enhances expression of markers of alternative activation in circulating leukocytes: roles of PPARgamma and Th2 cytokines', *Atherosclerosis*, vol. 212, no. 2, pp. 668-673.
- Yancey, S. L. & Overton, J. M. 1993, 'Cardiovascular responses to voluntary and treadmill exercise in rats', *J Appl Physiol*, vol. 75, no. 3, pp. 1334-1340.
- Yusuf, S., Sleight, P., Pogue, J., Bosch, J., Davies, R. & Dagenais, G. 2000, 'Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators', *N Engl J Med*, vol. 342, no. 3, pp. 145-153.
- Zhou, X., Nicoletti, A., Elhage, R. & Hansson, G. K. 2000, 'Transfer of CD4(+) T cells aggravates atherosclerosis in immunodeficient apolipoprotein E knockout mice', *Circulation*, vol. 102, no. 24, pp. 2919-2922.
- Zhu, S., Wang, Z., Heshka, S., Heo, M., Faith, M. S. & Heymsfield, S. B. 2002, 'Waist circumference and obesity-associated risk factors among whites in the third National Health and Nutrition Examination Survey: clinical action thresholds', *Am J Clin Nutr*, vol. 76, no. 4, pp. 743-749.
- Zieleniak, A., Wojcik, M. & Wozniak, L. A. 2008, 'Structure and physiological functions of the human peroxisome proliferator-activated receptor gamma', *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, vol. 56, no. 5, pp. 331-345.

ANNEXE

LISTE DES PUBLICATIONS :

Szostak, J., and Laurant, P. (2011). The forgotten face of regular physical exercise: a 'natural' anti-atherogenic activity. *Clin Sci (Lond)* **121**, 91-106.

COMMUNICATION ET FORMATIONS SUIVIES :

COMMUNICATION

Oral communication:

ECSS 14th annual Congress European College of Sport Science, 24-27 June 2009, Oslo, Norway.

Swimming Reduces Atherosclerosis Lesions in Apolipoprotein E-Deficient Mice (ApoE^{-/-}) and increases PPAR- γ Expression. J Szostak; C Miguet-Alfonsi; M Pellegrin ; K Bouzourene ; A Berthelot ; L Mazzolai ; P Laurant

Congrès de Physiologie, de Pharmacologie et de Thérapeutique, 15-17 April 2009, Marseille, France. **Award for best poster.** *Activité physique et prévention de l'Athérosclérose : Mise en Evidence de l'implication des PPAR sur un modèle murin transgénique la souris ApoE^{-/-}.* J Szostak; C Miguet-Alfonsi; M Pellegrin ; K Bouzourene ; A Berthelot ; L Mazzolai ; P Laurant

Poster:

8th NSFA Congress and 5th Joint meeting of French, German and Swiss Atherosclerosis Societies. 16-18 June **2011, Avignon**, France. *Exercise training decreases inflammation in atherosclerosis lesions via boths decrease of macrophages infiltration and expression of pro-inflammatory M1 cyto-*

kines in hypertensive ApoE^{-/-} mice. J Szostak ; K Bouzourene ; J-F Aubert ; A Berthelot ; J Nusseberger ; P Laurant; L Mazzolai

Congrès de Physiologie, de Pharmacologie et de Thérapeutique, 22-24 Mars 2011, Grenoble, France. Exercise training decreases inflammation in atherosclerosis lesions via boths decrease of macrophages infiltration and expression of pro-inflammatory M1 cytokines in hypertensive ApoE^{-/-} mice. J Szostak ; K Bouzourene ; J-F Aubert ; A Berthelot ; J Nusseberger ; L Mazzolai ; P Laurant

Forum des Jeunes Chercheurs, Université de Bourgogne-Franche-Comté, 12-13 June 2008, Besançon, France.

ECSS 13Th annual Congress European College of Sport Science, 9-12 July 2008, Estoril, Portugal. Swimming Reduces Atherosclerosis Lesions in Apolipoprotein E-Deficient Mice (ApoE^{-/-}) and increases PPAR- α Expression. J Szostak; C Miguët-Alfonsi; M Pellegrin ; K Bouzourene ; A Berthelot ; L Mazzolai ; P Laurant

FORMATIONS SUIVIES:

- DU « Expérimentation animale, niveau I », Nancy 17-27. 03.2008
- Les découvertes de la biologie végétale, (2010) Université de Lausanne, Suisse
- Small regulatory RNAs in bacteria, (2011) Université de Lausanne, Suisse

- Statistiques appliquées aux projets de recherche, (2009) Université de Lausanne, Suisse