



HAL
open science

Etude du défaut d'adaptation vasculaire au réentraînement à l'effort chez le patient BPCO

Léo Blervaque

► **To cite this version:**

Léo Blervaque. Etude du défaut d'adaptation vasculaire au réentraînement à l'effort chez le patient BPCO. Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier, 2020. Français. NNT: 2020MONT4005 . tel-03820819

HAL Id: tel-03820819

<https://theses.hal.science/tel-03820819>

Submitted on 19 Oct 2022

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

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

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Physiologie

École doctorale Sciences du Mouvement Humain

Physiologie et Médecine Expérimentale du Cœur et des Muscles (PhyMedExp)
Unité de recherche INSERM U1046 - CNRS UMR 9214 – Université de Montpellier

Etude du défaut d'adaptation vasculaire au réentraînement à l'effort chez le patient BPCO

Présentée par Léo BLERVAQUE
Le 29 Septembre 2020

Sous la direction du Pr. Maurice HAYOT et du Dr. Fares GOUZI

Devant le jury composé de

Agnès VINET-JULLIAN, PU, Université d'Avignon LAPEC EA4278, Avignon

Rapporteuse

Laurent MESSONNIER, PU, Université Savoie Mont-Blanc LIMB EA7424, Chambéry

Rapporteur

Antonia PEREZ-MARTIN, PU-PH, Université de Montpellier UPRES EA2992, Nîmes

Présidente du jury

Elisa ROSSI, MCU-HDR, Université Paris-Descartes UMR 1140, Paris

Examinatrice

Maurice HAYOT, PU-PH, PhyMedExp INSERM CNRS UM, Montpellier

Directeur de thèse

Fares GOUZI, MCU-PH, PhyMedExp INSERM CNRS UM, Montpellier

Co-directeur de thèse



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

“La vraie science est une ignorance qui se sait”

Michel de Montaigne

Remerciements

La thèse n'est pas une aventure solitaire. J'ai eu la chance de pouvoir compter sur un grand nombre de personnes tout au long de ce chemin, qui ont fait de ces travaux ce qu'ils sont aujourd'hui, et j'aimerais leur exprimer ma très grande gratitude.

En premier lieu, j'aimerais remercier les membres de mon jury de thèse :

Au Pr Agnès Vinet-Jullian et au Pr Laurent Messonnier, merci d'avoir consacré du temps à la lecture de ce manuscrit et de me faire l'honneur d'expertiser ce travail en tant que rapporteur.

Au Dr Elisa Rossi, merci d'avoir accepté de prendre part à ma soutenance de thèse. Un immense merci également pour votre aide précieuse qui a permis de bonifier grandement ces travaux de thèse. Merci enfin pour votre gentillesse et votre disponibilité pour des échanges scientifiques mais également à propos de mon avenir professionnel.

Au Pr Antonia Perez-Martin, je suis très heureux de vous compter parmi les membres de mon jury de thèse et je vous en remercie. Merci également pour l'accueil on ne peut plus chaleureux que vous avez pu me faire lors de mes visites dans votre service au sein du CHU de Nîmes. J'ai éprouvé un grand plaisir à travailler à vos côtés et à découvrir le monde scientifique et clinique de la médecine vasculaire.

Ce travail n'aurait pu être ce qu'il est sans la qualité de l'encadrement que j'ai eu la chance d'avoir durant ces 3 années de thèse, mais également durant mon master sous la même direction.

A mes directeurs de thèse, le Pr Maurice Hayot et le Dr Fares Gouzi, merci de m'avoir appris à voler de mes propres ailes, à réfléchir par moi-même mais également d'avoir été là chaque fois que je perdais la foi en mon travail. Vous avez développé mon estime dans mon travail en m'accordant votre confiance dès que je m'en remettais à votre jugement. Si des accrochages entre doctorants et encadrants peuvent se produire parfois, je suis heureux de pouvoir dire que cela n'a jamais été le cas pour moi, seul du

positif restera des interactions que nous avons entretenues durant ces 5 dernières années.

A Maurice, j'ai très tôt pu admirer vos immenses qualités humaines et votre bienveillance à mon égard. Je me suis senti à ma place dans ce groupe BPCO dès les premiers instants et le fait de savoir que vous étiez là, au besoin, m'a permis de cultiver mon autonomie sur un terrain dénué d'angoisse. Bien que le quotidien n'ait pas permis que nous ayons des échanges très réguliers, vous avez toujours su vous rendre disponible à tous les moments clefs de ma thèse : devant des résultats difficiles, mes questionnements sur l'avenir, mais également dès qu'il a fallu fêter une bonne nouvelle ! Je tiens à vous exprimer mon immense gratitude pour cette thèse à vos côtés, qui restera comme une expérience de vie inoubliable pour moi.

A Fares, difficile de faire le bilan tant nous avons pu passer d'heures à se creuser la tête sur des sujets divers, à batailler pour rendre faisables des études aux organisations démoniaques, ou à réécrire une énième fois un papier jusqu'à trouver LA façon d'amener l'argumentaire ; la substantifique moelle comme tu aimes le dire. Toujours à l'écoute de mes idées tu n'as pas été complaisant pour autant et tu m'as obligé à donner le meilleur de moi-même. Tu as été, depuis le début de mon expérience dans la recherche, mon exemple à suivre, de la manière d'écrire un projet à l'énergie que tu m'as appris à mettre dans tous les aspects de la recherche. Nous avons été sur la même longueur d'onde depuis le départ et je suis extrêmement honoré d'avoir pu prendre part à ce nouvel axe de recherche que tu développes. Je te suis extrêmement reconnaissant de m'avoir toujours mis en avant mais également pour tous les bons souvenirs que j'ai pu construire grâce à toi : en congrès à Madrid, à Paris, aux beaux-arts avec une bière, etc. Je vais maintenant pouvoir aller mettre en pratique ailleurs tout ce que j'ai appris à tes côtés, mais j'espère que l'on pourra toujours trouver des moyens de travailler ensemble dans le futur.

Au-delà de mes directeurs de thèse, je voulais aussi remercier les autres membres du groupe BPCO, qui ont su m'accueillir depuis mes débuts dans la recherche et prendre part aux travaux de cette thèse.

Au Dr Pascal Pomiès, merci de m'avoir fait découvrir le monde fascinant de la biologie, avec patience et rigueur, je parlais de loin. Merci d'avoir toujours été à l'écoute de mes suggestions d'idées, de m'avoir aidé à les améliorer et de m'avoir donné des clefs pour pouvoir les concrétiser. Merci également pour ton accueil chaleureux au sein de ce

groupe que tu co-diriges, pour ces supers soirées chez toi et pour ces découvertes œnologiques et zythologiques. J'espère que je pourrais revenir goûter ta bière à l'occasion !

Au Dr Emilie Passerieux, merci de m'avoir apporté ton aide et ton expertise sur la microscopie électronique. Merci également pour ta bonne humeur et les discussions que nous avons pu avoir. J'espère que nous aurons l'occasion de nous croiser à Pra-Loup dans le futur !

A Marine Blaquière, merci de m'avoir apporté ton aide précieuse à mes débuts, dans les manips, l'interprétation des résultats ... J'ai toujours été impressionné par ton sérieux et la qualité de ton travail, j'ai essayé d'être à la hauteur par la suite. Ça a été une grande déception de ne pas pouvoir continuer à travailler à tes côtés durant ma thèse, mais je suis heureux que nous ayons pu partager des projets scientifiques communs, pour lesquels tu as pu m'apporter ton aide. Je ne sais pas si je reviendrais pour les sandwiches horribles de la Cafet' mais je serais très heureux que l'on puisse tous se retrouver autour d'un verre un jour.

Au Dr Matthias Catteau, je suis heureux d'avoir pu travailler à tes côtés. J'ai toujours été impressionné par ton abnégation, ta capacité de travail et de réflexion autour de tes résultats. Je n'oublierai pas les bons moments et les galères à chaque virée à Marseille pour les rassemblements de l'école doctorale. Je te souhaite de t'épanouir au mieux dans la voie que tu as trouvée.

A Bronia Ayoub, merci pour ton énergie et tes tenues colorées qui égayent le quotidien. Merci surtout d'avoir été là pour moi quand j'avais besoin d'un conseil à propos des rouages impénétrables de la recherche clinique, tu as toujours été d'une grande bienveillance à mon égard et de très bon conseil !

Au Dr François Bughin, ce fût un plaisir de partager tous ces moments de congrès avec toi, je ne garde que des bons souvenirs des soirées à Paris et à Madrid. J'espère que l'on pourra continuer à aller boire un verre de temps à autres !

Je tiens également à remercier tous mes collègues du laboratoire PhyMedExp. J'ai toujours pu trouver de l'aide quand j'en avais besoin, merci pour votre temps, votre bienveillance et votre gentillesse. Il y a notamment un certain nombre de personnes sans qui l'accomplissement de ce travail aurait été difficile, voire impossible.

Au Pr Jacques Mercier, merci de m'avoir accueilli dans votre laboratoire et dans votre équipe. Malgré vos nombreuses responsabilités et engagements, vous avez toujours su prêter une oreille aux doctorants de ce laboratoire, nous conseiller au mieux et désamorcer les conflits avec élégance.

Aux Docteurs Sylvain Richard et Alain Lacampagne, merci également d'avoir été à l'écoute et de nous avoir apporté votre aide à chaque fois que cela était nécessaire.

Au Dr Anne Virsolvy, merci de m'avoir formé aux manips de FURA mais aussi de m'avoir aidé en culture et avec mes prélèvements quand je n'étais pas capable de tout gérer en même temps. J'ai également apprécié de pouvoir partager les réflexions autour des manips d'angiogenèse passées et à venir, j'ai hâte de voir ce que va donner la suite.

Au Dr Gilles Carnac et à Gérard Hugon, merci d'avoir toujours été là quand j'avais besoin d'un conseil et de m'avoir aidé/dépanné à chaque fois que mon travail était menacé par un problème technique ou une pénurie de produit. Votre sens de l'entraide m'a sorti d'un grand nombre de situations délicates et je voudrais vous remercier chaleureusement pour ça. Merci également de m'avoir amené tant de fois manger au CNRS, et de m'avoir supporté tous ces midis.

Au Dr Cécile Notarnicola, merci pour ces précieux conseils sur le design de primers, la qPCR et son interprétation qui m'ont grandement aidé lors de mon travail.

Au Dr Bernard Jover, merci de nous avoir aidé sur les manips d'angiogenèses sur anneaux aortiques.

Au Dr Olivier Cazorla, merci de m'avoir incité à toujours questionner mes idées et mes résultats et de m'avoir apporté ton aide quand j'en avais besoin.

A Azzouz Charrabi, merci pour ta bonne humeur indéfectible, les discussions et les découvertes de musiques en salle de culture. Merci aussi pour ta gentillesse et ton aide précieuse avec les cellules, que tu m'as apportée sans hésitation.

A Annick Bourret, Céline Neusius et Fabienne Dagnac-lagrange, merci pour votre implication et votre aide au quotidien.

Je voudrais également remercier les Doctorants et Post-docs avec qui j'ai eu la chance de partager mon quotidien au sein de l'unité. La thèse est une aventure qui ne laisse pas toujours le temps de connaître aussi bien que nous le souhaiterions les personnes

qui partagent cette aventure avec nous, tous très pris dans notre quotidien. Malgré ça, je suis très heureux d'avoir partagé des moments avec vous tous, entassés à 9 dans un bureau ou durant les longues heures passées en culture.

A Pierre-Edouard, des soirées chez toi aux casse-têtes méthodologiques, c'est toujours un très grand plaisir de discuter avec toi. Je regrette que le quotidien chargé de la thèse nous ait empêché d'aller skier ou autre, j'espère que ce n'est que partie remise.

A Momo, ta fausse mauvaise humeur communicative est un réel réconfort quand on vient de se faire jeter un papier ou que des manips ne marchent pas, merci, ne change rien !

A Monia, merci pour la compagnie et les discussions à rallonge le soir, quand tout le monde était parti du labo. Tu es sûrement la prochaine pour la thèse, bonne chance à toi !

A Lucile, merci d'avoir partagé tant de café/sandwich avec moi et de m'avoir apporté ton soutien psychologique à chaque fois que j'avais besoin de râler sur quelque chose.

A Albin, merci de toujours prendre le temps de me donner ton avis sur mes schémas, images... De m'aider avec mes cellules ou au confocal.

A Sarah, la petite nouvelle, merci d'apporter cette touche d'insouciance et de joie. Ne change rien et ne te laisse pas exploiter par Albin !

A JB, le patcheur fou, bien qu'on n'ait pas encore eu le temps de le faire, promis on les patchera ces PIEZO !

A Jana, ça a été un grand plaisir de partager un bout de labo et un bout d'appart' avec toi lors de tes séjours à Montpellier. Très court à chaque fois, on a pu partager malgré tout de très bons souvenirs. J'espère avoir le temps de venir te voir en Belgique une fois ma thèse soutenue.

Je voudrais également remercier toutes les personnes du CHU de Montpellier et Nîmes sans qui ce travail n'aurait pu aboutir.

Aux équipes du service de physiologie clinique du CHU de Montpellier, merci pour votre disponibilité et votre aide précieuse avec les patients de l'étude clinique. Merci également pour votre bienveillance à mon égard.

Aux équipes du service des troubles du sommeil et de l'éveil et notamment le Pr Yves Dauvilliers, Sabine Scholz et Jérôme Tanty. Merci de nous avoir ouvert vos locaux et prêté un EndoPAT, rendant tout simplement possible l'inclusion de patients à Montpellier.

Au Dr Gudrun Boge, merci d'avoir accepté de prendre part à notre travail. Merci d'avoir été si bienveillante et arrangeante avec nous, ce fût un réel plaisir.

Au Dr Amir Benmira, merci d'avoir accepté de travailler avec nous sur cette étude clinique, ton aide a été un élément indispensable à sa réussite et je t'en remercie.

Aux équipes du service de pneumologie du CHU de Nîmes, et notamment le Dr Patrice Ray, le Dr Gabriella Condurache et le Dr Nathalie Plouvier. Merci d'avoir rendu possible la mise en place de l'étude sur Nîmes, merci pour votre aide, de l'inclusion des patients jusqu'à leur évaluation, ce fût un réel plaisir de travailler avec vous.

Je voudrais également remercier les techniciens et ingénieurs du CRB de Nîmes qui nous ont aidé avec les prélèvements et qui ont toujours su être à l'écoute et très arrangeants.

Au-delà des CHU, je voudrais également remercier :

Le personnel du centre de réhabilitation l'Egrégore, notamment le Dr Florina Tarita, Kelly Rouckault, Nicolas Martin et Florian Borie. Merci pour la qualité du travail que vous faites, pour votre aide précieuse sur l'étude et merci d'avoir accepté les contraintes liées au protocole.

Le personnel du centre de réhabilitation respiratoire la Vallonie. Je tiens notamment à remercier le département Recherche, les Docteurs Nelly Héraud, François Alexandre et Virginie Molinier. Votre aide dans l'accomplissement de ce travail a été plus que déterminante, du recrutement des patients à la bonification de nos travaux sur la post-réhabilitation. Vous m'avez toujours accueilli à bras ouverts à Lodève et m'avez poussé à produire un travail toujours plus qualitatif. J'ai vraiment apprécié de travailler à vos côtés et j'espère que nous pourrons continuer à interagir par la suite.

L'équipe Innovation Thérapeutique en hémostasie, à Paris. Je voudrais remercier le Pr David Smadja de m'avoir accueilli à bras ouverts dans son équipe. Ces deux semaines restent parmi les expériences de recherche les plus stimulantes pour moi durant cette thèse. Merci pour votre grande bienveillance à mon égard, pour l'aide et les idées que vous avez apportées pour essayer de bonifier nos travaux. Merci également au Dr

Adeline Blandinières et au Dr Grégoire Détriché d'avoir pris le temps de me former à la culture d'ECFC et de m'avoir aidé tout au long de mon séjour mais également par la suite.

L'équipe du réseau Air+R. Au Pr Christian Préfaut, un immense merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir permis de prendre part à cette grande aventure. Je suis heureux d'avoir pu interagir avec vous et profiter de votre grande expérience de la recherche. A Hélène Forthin, Manon bourrelier, Manon Bourreau et Elisa Galmes, merci pour votre aide précieuse dans la compréhension, le recueil et l'analyse de données du réseau, rien n'aurait été possible sans votre aide. Merci également pour votre dynamisme et votre bonne humeur qui participent grandement à la belle réussite de ce réseau.

Les enseignants du STAPS Montpellier. Notamment le Dr Julie Boiché de m'avoir toujours soutenu, aidé et d'avoir accepté d'être ma marraine de thèse et le Pr Alain Varray de m'avoir transmis l'intérêt de l'étude de la dysfonction musculaire du patient BPCO en 3ème année et pour son soutien et ses encouragements depuis mes débuts dans la recherche.

Je voudrais remercier le Dr Nicola Marchi à l'IGF pour son aide précieuse dans nos projets autour du péricyte, tant sur la réflexion scientifique que sur l'aide logistique.

Je voudrais également remercier le Dr Chantal Cazevielle de la plateforme COMET à l'INM pour sa gentillesse et son aide inestimable dans le traitement et l'analyse de nos échantillons.

Au final, je suis extrêmement reconnaissant de l'aide que j'ai pu recevoir des personnes avec qui j'ai interagit dans le cadre de ces travaux de thèse. Cependant, je n'aurais pu parvenir au bout de cette aventure sans le soutien, l'amitié et l'amour des gens qui m'accompagnent au quotidien, dans ma vie privée.

A Maxence et Rémi, je pense que tout a réellement commencé lors de cette baignade aux calanques de Cassis juste après le concours SMH, et dans la soirée qui a suivi. Depuis ce moment, chaque soirée, Doctoriales ou rendez-vous de l'école doctorale avec vous restent comme des moments forts, entre beauferie et finesse d'esprit. Merci pour votre amitié !

A Laura Pav(e)lin, une semaine clairement inoubliable aura suffi pour forger une grande amitié, productive, dont les premiers fruits commençaient par « Si tu viens aux

Doctoriales ... », la suite de la chanson étant peu recommandable pour un manuscrit de thèse. Il est des amis sur lesquels on peut toujours compter et je sais que tu en fais partie, merci pour ton amitié et pour tous les bons souvenirs durant ces 3 ans ! Merci aussi pour ton aide sur ce travail, ce manuscrit ne serait pas ce qu'il est sans ton aide ! Je serai là aussi quand viendra ton tour !

A vous trois, merci de m'avoir convaincu que l'on peut être fou et sérieux à la fois et que la grandeur de la réussite se mesure à la façon dont on la fête ! Ainsi, je pense que mon pot de thèse sera un endroit bien plus approprié pour vous exprimer ma très grande gratitude !

A Oscar, Laura, Damien, Axel et Estelle, mes amis de Montpellier. Rassemblés par la grimpe, c'est bien plus qu'une passion commune qui nous lie aujourd'hui. Vous êtes ma famille ici, mes acolytes au quotidien, pour un week-end grimpe, rando, une soirée ou simplement pour se poser tous ensemble. Si bien des pages se tournent ici, ce n'est clairement pas le cas de notre amitié.

A ma mère, mon père, ma sœur, Hoel, Dorian, ma famille. Ce que je suis, je vous le dois, ce que je réussis également. Je n'aurais pu rêver meilleure famille, en étant si bien entouré on n'a pas peur, on se sent grand, si j'ai pu aller aussi loin c'est grâce à vous, votre amour et votre confiance. Ce travail n'est définitivement pas le lieu pour vous exprimer toute ma gratitude, quand bien même les mots me manqueraient ; Simplement, merci de marcher à mes côtés !

A Laura, merci d'apporter l'amour dans mon quotidien depuis des années, de me redonner le sourire quand je suis au plus bas et de partager ma joie quand la vie me réussit. Bien que beaucoup s'y risquent, je ne suis pas sûr que l'amour puisse s'écrire, je me contenterai donc de te dire que ton amour me porte, plus haut chaque jour, et me permet d'accomplir ce que je croyais impossible jusqu'ici. Merci de faire partie de ma vie !

Aux oubliés, j'ai eu le privilège durant ce travail de recevoir l'aide d'un très grand nombre de personnes. Cette foule, même passée au peigne fin, a pu cacher certains d'entre vous. Ne faites pas l'erreur de croire que cet oubli témoigne d'une gratitude moindre à votre égard. N'hésitez pas cependant à me faire remarquer cet oubli que je puisse avoir la chance de vous remercier d'une façon ou d'une autre.

Table des matières

LISTE DES ABREVIATIONS.....	2
LISTE DES FIGURES.....	6
ETAT DE L'ART.....	8
CHAPITRE 1. LA BRONCHO-PNEUMOPATHIE CHRONIQUE OBSTRUCTIVE.....	9
1.1 DEFINITION & PREVALENCE	9
1.2 PATHOGENESE & PHYSIOPATHOLOGIE	10
1.3 ETIOLOGIE & FACTEURS DE RISQUE	13
1.4 DIAGNOSTIC	15
1.4.1 Critères diagnostiques.....	15
1.4.2 Sous- et sur-diagnostic de la BPCO.....	17
1.5 COUT ECONOMIQUE DE LA BPCO.....	19
1.6 REPERCUSSIONS SYSTEMIQUES	19
1.6.1 Comorbidités et phénotypes cliniques dans la BPCO	19
1.6.2 Le cas des comorbidités cardiovasculaires.....	20
1.6.3 BPCO et intolérance à l'effort	22
1.6.4 Atteintes vasculaires systémiques dans la BPCO : Nouveaux facteurs de risque	23
1.7 INTERET D'UNE PRISE EN CHARGE SYSTEMIQUE DE LA BPCO	25
1.7.1 Une prise en charge pluridisciplinaire.....	25
1.7.2 La réhabilitation respiratoire.....	26
1.7.3 Les limites de la réhabilitation respiratoire sur la fonction vasculaire	27
RESUME DU CHAPITRE 1	30
CHAPITRE 2. LA CAPILLARISATION MUSCULAIRE : ROLE PHYSIOLOGIQUE ET ANOMALIES CHEZ LE PATIENT BPCO.	31
2.1 ROLE DES CAPILLAIRES SANGUINS MUSCULAIRES.....	31
2.1.1 Diffusion de l'oxygène	31
2.1.2 Apport de l'oxygène	35
2.1.3 Conséquences d'une dysfonction de la microcirculation musculaire.....	37

2.1.4	La raréfaction capillaire musculaire dans la BPCO	39
2.2	L'ANGIOGENESE INDUITE PAR LE REENTRAINEMENT A L'EFFORT	41
2.2.1	Définition de l'angiogenèse.....	41
2.2.2	Le déroulement de l'angiogenèse en réponse au réentraînement à l'effort	42
2.2.3	Les principaux facteurs pro & anti-angiogéniques.....	43
2.2.4	Orchestration de la réponse des facteurs angiogéniques durant le process d'angiogenèse musculaire	47
2.2.5	Les défauts de l'angiogenèse musculaire induite par le réentraînement dans la BPCO et leurs conséquences.....	49
	RESUME DU CHAPITRE 2.....	52
	CHAPITRE 3. VERS UNE MEILLEURE COMPREHENSION DES ALTERATIONS CAPILLAIRES DU PATIENT BPCO	53
3.1.1	Intérêt de l'étude ultrastructurale	53
3.1.2	Remodelage de l'ultrastructure capillaire musculaire en condition pathologique.....	55
3.1.3	Remodelage de l'ultrastructure capillaire musculaire en réponse à l'entraînement	57
3.2	LES PERICYTES DANS L'ANGIOGENESE EMOUSSEE DU PATIENT BPCO.....	58
3.2.1	Définition.....	58
3.2.2	Les péricytes comme élément essentiel du processus d'angiogenèse.....	59
3.2.3	Le rôle vasoactif des péricytes	60
3.2.4	Effet du réentraînement à l'effort sur la couverture péricytaire.....	62
3.2.5	Les maladies chroniques comme facteurs de détérioration péricytaire	63
3.3	DEFAUTS DE LA CELLULE MUSCULAIRE ET ALTERATION DE LA REPOSE ANGIOGENIQUE CHEZ LE PATIENT BPCO.....	66
3.3.1	L'intégration des signaux pro-angiogéniques au niveau musculaire	66
3.3.2	Défaut de la cellule musculaire chez le patient BPCO.....	69
	RESUME DU CHAPITRE 3.....	71
	CHAPITRE 4. VASOREACTIVITE ARTERIELLE ET FONCTION CELLULAIRE ENDOTHELIALE DANS LA BPCO	73
4.1.1	VRA : Définition et importance dans la prévention cardiovasculaire	73
4.1.2	Les voies de régulation de la VRA dépendantes de l'endothélium.....	75
4.1.3	La voie du NO et sa régulation	77
4.2	L'EFFET DE L'ENTRAINEMENT SUR LA VRA	79
4.2.1	Mécanismes et cinétiques d'adaptation de la VRA à l'entraînement.....	79
4.2.2	La contribution des progéniteurs endothéliaux circulants	80
4.3	LA VASOREACTIVITE ARTERIELLE DANS LA BPCO.....	81
4.3.1	Les altérations à l'état de base.....	81

4.3.2 Le défaut de réponse à l'entraînement.....	83
RESUME DU CHAPITRE 4.....	85
OBJECTIFS DE THESE	87

MATERIEL & METHODES 91

PRESENTATION.....	92
EVALUATION FONCTIONNELLE.....	93
FICHE N° 1 – EVALUATION DE LA FORCE ET DE L'ENDURANCE MUSCULAIRE.	93
FICHE N° 2 – EPREUVE D'EFFORT MAXIMALE INCREMENTALE.....	95
FICHE N° 3 – EVALUATION DE LA FONCTION ENDOTHELIALE (ENDOPAT)	100
FICHE N° 4 – REENTRAINEMENT A L'EFFORT	103
ANALYSES DE BIOPSIES MUSCULAIRES.	106
FICHE N° 5 – PRELEVEMENT ET CONDITIONNEMENT DE BIOPSIES MUSCULAIRE HUMAINES	106
FICHE N° 6 – ANALYSE DE LA COUVERTURE PERICYTAIRE PAR IMMUNOFLOUORESCENCE.....	109
FICHE N° 7 – ANALYSE DE L'ULTRASTRUCTURE CAPILLAIRE MUSCULAIRE	113
FICHE N° 8 – EXTRACTION DES PROTEINES ET ARN TOTAUX MUSCULAIRES	115
FICHE N° 9 – RT-QPCR.....	119
CULTURE CELLULAIRE.....	122
FICHE N° 10 – ISOLEMENT DES MYOBLASTES A PARTIR DE PRELEVEMENTS MUSCULAIRES HUMAINS.	122
FICHE N° 11 – DIFFERENCIATION ET ELECTROSTIMULATION DE MYOTUBES HUMAINS.	127
FICHE N° 12 – TEST DE L'EFFET DU SERUM SUR LA DIFFERENCIATION DE CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES EN PERICYTES.	130
FICHE N° 13 – EFFET DU SERUM SUR LA MORPHOLOGIE DES PERICYTES	133
FICHE N° 14 – ISOLEMENT ET CULTURE DE CELLULES ENDOTHELIALES FORMANT DES COLONIES (ECFC) A PARTIR D'UN PRELEVEMENT DE SANG PERIPHERIQUE HUMAIN.....	135

CONTRIBUTION SCIENTIFIQUE 139

ETUDE 1	141
IMPAIRED TRAINING-INDUCED ANGIOGENESIS PROCESS WITH LOSS OF PERICYTE-ENDOTHELIUM INTERACTIONS IS ASSOCIATED WITH AN ABNORMAL CAPILLARY REMODELLING IN THE SKELETAL MUSCLE OF COPD PATIENTS	141

PRESENTATION DE L'ETUDE N°1	142
FICHER ADDITIONNEL.....	155
ETUDE 2	157
COPD IS DELETERIOUS FOR PERICYTES: IMPLICATIONS DURING TRAINING-INDUCED ANGIOGENESIS IN SKELETAL MUSCLE	157
PRESENTATION DE L'ETUDE N°2.....	158
FICHER ADDITIONNEL.....	178
ETUDE 3	186
IS THE SKELETAL MUSCLE CELLS ANGIOGENIC POTENTIAL IMPAIRED IN COPD PATIENTS?.....	186
PRESENTATION DE L'ETUDE N°3	187
ETUDE 4	205
UNDERSTANDING THE DETERMINANTS OF THE IMPAIRED RESPONSE OF ENDOTHELIAL FUNCTION TO EXERCISE TRAINING IN COPD PATIENTS.	205
PRESENTATION DE L'ETUDE N°4.....	206
DISCUSSION GENERALE.....	225
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	235
ANNEXE 1	240
EFFICIENCY OF A LONG-TERM PULMONARY REHABILITATION MAINTENANCE PROGRAM FOR COPD PATIENTS IN REAL-LIFE SETTING— A 5-YEAR COHORT STUDY.....	240
PRESENTATION DE L'ETUDE N°5	241
FICHER ADDITIONNEL.....	261
<u>LISTE DES COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES</u>	<u>270</u>
<u>BIBLIOGRAPHIE.....</u>	<u>274</u>

Liste des abréviations

AC : Adenylylcyclase

ACh : Acétylcholine

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

ADP : Adénosine diphosphate

ALK5: Activin receptor-like kinase 5

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique

AMPK : Protéines kinases activées par l'adénosine monophosphate

Akt : Protéine kinase B

Ang1 : Angiopoïétine 1

Ang2 : Angiopoïétine 2

AOMI : Artériopathie oblitérante des membres inférieurs

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : ARN messagers

ATP : Adénosine triphosphate

ATS American Thoracic Society

AVC : Accident vasculaire cérébral

BH4 : Tétrahydrobioptérine

BPCO : Broncho-pneumopathie chronique obstructive

Ca²⁺ : Calcium

CaCCs : Canaux calciques activés par le chlore

CADASIL : Artériopathie cérébrale autosomique dominante avec infarctus sous-corticaux et leucoencéphalopathie

CAMKII : Protéine kinase de type II dépendante du complexe Ca²⁺-Calmoduline

CAT : COPD Assessment Test

CD31 : Facteur d'adhésion plaquettaire endothéliale

CFPE : Périmètre d'échange capillaire/fibre

CM : Cellules mononuclées
CNP : Peptide naturel C-type
CO₂ : Dioxyde de carbone
CRP : Protéine C-réactive
CSS : Contrôles sédentaires sains
CVF : Capacité vitale forcée
Cx43 : Connexine 43
DmO₂ : Diffusion de l'oxygène musculaire
DMSO : Dimethyl sulfoxide
EC : Cellule endothéliale
ECE : Enzyme de conversion de l'endothéline
ECFC : Cellules endothéliales formant des colonies
EDHF : Facteurs d'hyperpolarisation dérivés de l'endothélium
EETs : Acides epoxyeicosatriénoïques
EFX : Epreuve d'effort maximale incrémentale
eNOS : NO synthase endothéliale
ERP : Espèce réactive de l'oxygène
ERR- α : Récepteur relatif aux œstrogènes alpha
ERS : European Respiratory Society
ET-1 : Endothéline 1
F₂ isoprostanes : Isoprostanes libres et estérifiées
FC : Fréquence cardiaque
FGF : Facteur de croissance fibroblastique
FMD : Dilatation médiée par le flux
FR : Fréquence respiratoire
GCs : Guanylate cyclase soluble
GMPc : 3',5' guanosine monophosphate cyclique
GOLD : Global initiative for chronic lung disease
GR : Globule rouge
GTP : Guanosine 5'-triphosphate

H⁺ : Ions hydrogènes

HIF1 : Facteur inductible par l'hypoxie 1

IL : Interleukine

K⁺ : Ions potassium

KATP : Canaux potassiques ATP-dépendants

L-NAME : N omega-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride

LNN : Lowerlimit of normal

MCP1 : Protéine chimioattractante des monocytes 1

miARNs : Micro-ARNs

MMP : Métalloprotéases de la matrice

MRC : Medical research council

MSCs : Cellules souches mésenchymateuses

NG2 : Antigène protéoglycan neural/glial 2

NO : Monoxyde d'azote

O₂ : Oxygène

OMS : Organisation mondiale de la santé

PAT : Tonographie de l'onde de pouls

PAT[®] : Peripheral Arterial Tone

PBS : Tampon phosphate salin

PDGF-BB : Facteur de croissance dérivé des plaquettes BB

PDGFR-β : Récepteur au PDGF-BB

PGC1-α : Coactivateur alpha du récepteur gamma activé par les proliférateurs de peroxysomes

PGI₂ : Prostacycline

Pi : Phosphate inorganique

PI3K : Kinase phosphatidylinositol 3

PKA : Protéine kinase A

PKB : Protéine kinase B

PKC : Protéines kinase C

PKG : Protéine kinase G

PLC-γ : Phospholipase Cγ

PO₂ : Pression partielle en oxygène
Q'O₂ : Débit d'apport d'oxygène
qPCR : quantitative Polymerase Chain Reaction
QR : Quotient respiratoire
REE : Réentraînement à l'effort
RHI : Indice d'hyperémie réactive
RT : Reverse Transcriptase
SEI : Stimulation électrique par impulsion
Ser : Sérines
SPP1 : Phosphoprotéine sécrétée 1
SV1 : Premier seuil ventilatoire
SVF : Sérum de Veau Fœtal
TGF-β : Facteur de croissance transformant-beta
Thr : Thréonine
TIMP : Inhibiteurs des métalloprotéases de la matrice
TNF- α : Facteurs de nécrose tumorale alpha
TSP1 : Thrombospondine 1
V'CO₂ : Production de CO₂
V'E : Débit ventilatoire
V'O₂ : Consommation d'oxygène
VE : Volume expiratoire
VE-cadhérines : Jonctions cadhérines endothéliales vasculaires
VEGF-A : Facteur de croissance vasculaire endothélial A
VEGFR2 : Récepteur à tyrosine kinase au VEGF 2
VEMS : Volume expiratoire maximal à la première seconde
VI : Volume inspiratoire
VOP : Vitesse d'onde de pouls
VRA : Vasoréactivité artérielle
α-SMA : Actine des muscles lisses alpha
β_{2/3}-AR : Récepteur adrénergique β_{2/3}

Liste des figures

Figure 1. Prévalence de la BPCO autour du Monde (D'après Blanco et al. 2019)	9
Figure 2. Mécanismes à l'origine de la pathogenèse de la BPCO	11
Figure 3. Etapes de classification d'un patient BPCO (adaptées du rapport GOLD 2019).....	16
Figure 4. Prévalence et sous-diagnostic de la BPCO à travers le monde (d'après Lamprecht et al. 2015).....	17
Figure 5. Carte de représentation de l'expression relative des principales comorbidités de la BPCO dans les principaux groupes de patients BPCO (d'après Vanfleteren et al. 2013).....	20
Figure 6. Risques de maladies cardiovasculaires et prévalence des facteurs de risques cardiovasculaires dans la BPCO (D'après Chen et al. 2015).....	21
Figure 7. Prise en charge systémique de la BPCO et de ses comorbidités d'après Vanfleteren et al. 2016).....	26
Figure 8. Modèle de diffusion de l'oxygène musculaire.....	32
Figure 9. Actions des principaux facteurs angiogéniques au niveau des structures capillaires.	43
Figure 10. Déroulé temporel de l'angiogenèse par bourgeonnement (adaptée de Carmeliet & Jain, 2011).....	47
Figure 11. Ultrastructure capillaire musculaire.....	54
Figure 12. Causes et conséquences d'une réduction de la couverture péricytaire dans les pathologies chroniques.	63
Figure 13. Régulation de l'angiogenèse musculaire par les cellules musculaires durant un exercice musculaire.....	68
Figure 14. Régulation du tonus des cellules musculaires lisses vasculaires par l'endothélium.....	75
Figure 15. Modulation de l'activité de la eNOS.....	77

ETAT DE L'ART

Chapitre 1. La Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive

1.1 Définition & prévalence

La Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive (BPCO) touche près de 328 millions de personnes à travers le monde (Quaderi & Hurst, 2018). Cette maladie chronique, d'apparition progressive, est un tueur silencieux dont la prévalence ne cesse de croître. Responsable de plus de 3 millions de décès dans le monde en 2016 (Mathers C. et al., 2018), cette maladie se classe dès aujourd'hui au troisième rang des causes de mortalité, devant de plus de 10 ans les dernières prédictions de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS)(Mathers & Loncar, 2006). Dans les 28 états membres de l'Union Européenne, sur les 260 millions d'adultes âgés de plus de 40 ans, 23 millions de patients BPCO ont été recensés, menant à un total de 1.1 million d'hospitalisations par an et 150 000 décès (Gibson et al., 2013). Cependant, la prévalence de la BPCO est hétérogène en fonction des régions du monde, allant de 1 à 30% en fonction de la région considérée (Figure 1) (Blanco et al., 2019). Cette prévalence doit également être mise au regard des discordances de diagnostic et de la proportion considérable de patients sous- et sur-diagnostiqués, un point qui sera développé dans une partie ultérieure (1.4.2, page 17).

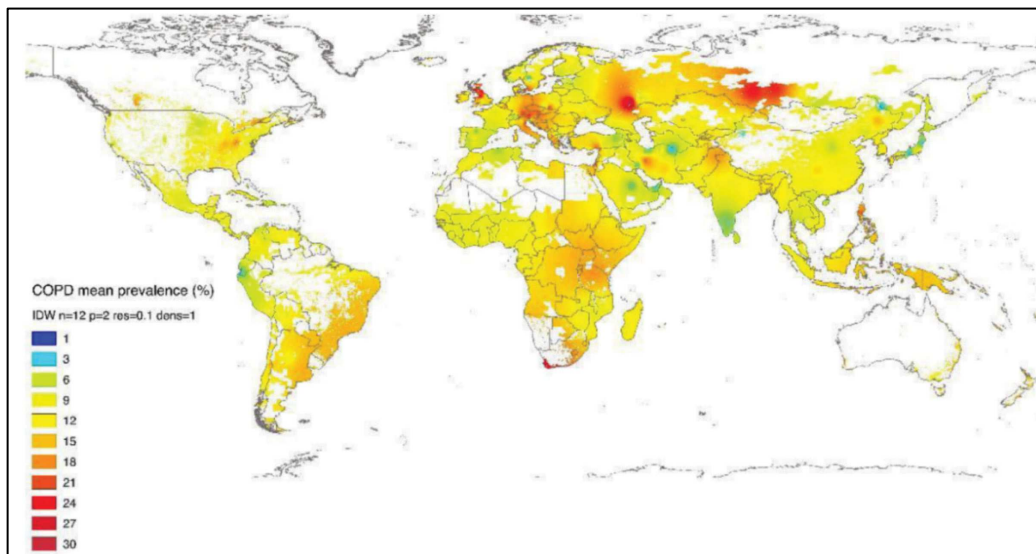


Figure 1. Prévalence de la BPCO autour du Monde (D'après Blanco et al. 2019)

L'étiologie complexe ainsi que la variabilité des phénotypes au sein de la population BPCO rend difficile sa définition qui a dû évoluer. Pour permettre cette évolution, une initiative d'experts GOLD (Global Initiative for Chronic Lung Disease) a proposé une mise à jour de la définition de la BPCO, en adéquation avec les dernières avancées scientifiques dans ce domaine. Lors de leur dernier rapport, en 2019, la définition proposée était la suivante (Singh et al., 2019) :

« La broncho-pneumopathie obstructive est une maladie fréquente, évitable et traitable caractérisée par des symptômes respiratoires et une limitation des flux d'air dus à des anomalies des voies respiratoires et/ou des alvéoles, majoritairement causées par une exposition significative à des particules ou gaz toxiques »

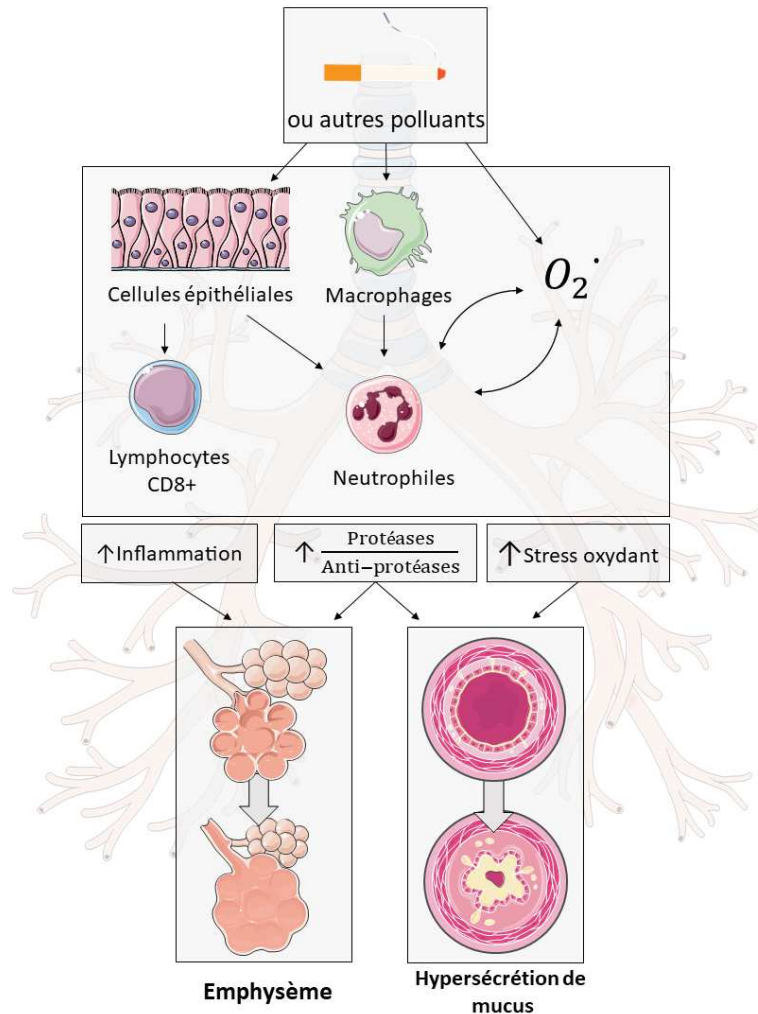
La complexité de la définition de la BPCO réside dans le fait que, malgré une trame commune, la BPCO se manifeste sous de nombreuses formes en fonction des histoires naturelles et du profil des patients.

1.2 Pathogenèse & physiopathologie

Le développement de la BPCO repose sur une triade de mécanismes que sont une inflammation pulmonaire persistante, un déséquilibre de la balance protéase/anti-protéase ainsi qu'une élévation du stress oxydant (Fischer et al., 2011). Une vision schématique de la pathogenèse de la BPCO est présentée dans la Figure 2.

L'exposition à la fumée de cigarette ou autres agents nocifs engendre des dommages au niveau des cellules épithéliales bronchiques ainsi qu'une activation des macrophages. En retour, une surproduction des facteurs de chimio-attraction neutrophilaires, tels que l'interleukine 8 ainsi qu'un recrutement des neutrophiles s'effectuent (Barnes, 2000). Ce recrutement de cellules inflammatoires au niveau des voies aériennes va engendrer une surproduction de protéases par les macrophages et les neutrophiles. Parmi ces protéases, les plus citées sont l'élastase neutrophilaire, les métalloprotéases de la matrice 1, 2, 9 et 12 ainsi que la protéinase 3 et la cathepsine. D'autre part, l'exposition à des particules toxiques engendre une élévation des radicaux libres de l'oxygène menant à un phénomène de stress oxydant pulmonaire.

Figure 2. Mécanismes à l'origine de la pathogenèse de la BPCO



Ce stress oxydant mène à l'oxydation d'anti-protéases telles que l' α 1-antitrypsine ou l'inhibiteur sécrétoire de la protéase leucocytaire, engendrant leur inactivation (Rahman, 2005). Cette inactivation des anti-protéases couplée à l'augmentation de la sécrétion de protéases va induire un déséquilibre de la balance protéase/antiprotéase. **Ce déséquilibre est impliqué dans la destruction des tissus conjonctifs du parenchyme pulmonaire, à l'origine de l'emphysème.** Le recrutement des lymphocytes CD8+ cytotoxiques est également un important médiateur de l'effet délétère de particules toxiques inhalées sur le parenchyme pulmonaire (Maeno et al., 2007). **Le déséquilibre dans la balance protéase/antiprotéase, notamment l'augmentation d'élastases neutrophilaires, induit une métaplasie des cellules**

caliciformes pulmonaires menant à une hypersécrétion de mucus par ces dernières (MacNee & Rahman, 2001). Ce remodelage commence au niveau des petites voies aériennes mais s'étend par la suite. En induisant une activation des récepteurs au facteur de croissance épidermique, le stress oxydant induit une surexpression de la mucine à l'origine d'une production exacerbée de mucus (Takeyama et al., 2000).

En résumé, deux principaux phénomènes physiopathologiques sont impliqués dans la pathogénèse de la BPCO : une hypersécrétion de mucus et une destruction du parenchyme pulmonaire menant à l'emphysème. L'hypersécrétion de mucus est associée à une obstruction menant à une rétention de l'air qui reste piégé à l'intérieur des poumons (Singh et al., 2019). L'emphysème quant à lui va réduire la résistance des parois des voies aériennes. Lors de l'expiration rapide, dans la situation pathologique d'une perte des attaches des parois des voies aériennes, l'augmentation de la vitesse de l'air dans les voies aériennes va induire une zone de sous-pression (principe de Bernoulli) menant à la fermeture des voies aériennes (Larsson, 2007). L'air présent dans la section distale de cette fermeture va ainsi être piégé. Ces phénomènes sont à l'origine d'une limitation des flux expiratoires chez les patients BPCO appelée hyperinflation statique. De plus, lors d'un exercice physique, la réduction du temps expiratoire va induire une augmentation progressive de la quantité d'air piégée, appelée hyperinflation dynamique qui limite la capacité d'exercice des patients BPCO (O'Donnell et al., 2001).

D'autre part, **les protéases vont engendrer une destruction des fines parois alvéolaires, menant à une fusion des alvéoles et à une réduction de la surface d'échange alvéolo-capillaire.** Ce phénomène couplé à l'augmentation de la compliance des voies aériennes va induire une hypoxémie, c'est-à-dire une baisse de la pression partielle en oxygène dans le sang. Pour limiter ce phénomène, un mécanisme de vasoconstriction hypoxique se met en place pour rediriger le sang vers les zones pulmonaires présentant des échanges gazeux préservés. En cas d'atteinte alvéolaire importante, cette vasoconstriction va concerner un grand nombre d'artérioles pulmonaires. Couplée à une destruction emphysémateuse du lit capillaire pulmonaire, la vasoconstriction engendre une augmentation de la pression artérielle pulmonaire. En cas d'hypertension artérielle pulmonaire importante et chronique, la surcharge cardiaque droite peut mener à une dilatation cardiaque droite appelée cœur pulmonaire chronique. Ce syndrome peut engendrer une insuffisance cardiaque droite.

Ici, nous avons présenté des mécanismes globaux d'altération pathologique menant au développement de la BPCO. **Cependant, la BPCO est caractérisée par l'apparition de répercussions visibles de la maladie (phénotype) ou de mécanismes fonctionnels ou biologiques (endotype) parfois très différents d'un individu à l'autre.** Historiquement, deux phénotypes de patients BPCO étaient décrits en fonction du phénotype clinique des patients : les patients *pink-puffer*, cachectiques, dyspnéiques et distendus et les patients *blue-boater*, présentant une hypoxémie, de fréquentes exacerbations et un encombrement bronchique. Cependant, au-delà de cette classification binaire, un spectre plus complexe de classification des patients a émergé avec entre autres la mise en évidence de patients présentant des syndromes combinés d'asthme et de BPCO (Manian, 2019). De plus, l'étiologie de la maladie peut être associée à des endotypes de patients parfois différents, comme dans le cas d'un emphysème causé par une déficience en α 1-antitrypsine (Stoller & Aboussouan, 2005) ou d'une inflammation apparaissant être d'origine éosinophilique (Bafadhel et al., 2017). **Ces manifestations différentielles sont associées à des trajectoires de la maladie différentes, rendant nécessaire une individualisation du parcours de soin chez les patients BPCO.** Il est également nécessaire de comprendre en détail l'histoire naturelle de la BPCO pour chaque patient, en prenant en compte l'étiologie et les facteurs de risque de chacun.

1.3 Etiologie & facteurs de risque

La BPCO est une pathologie chronique plurifactorielle et aux étiologies multiples.

Le tabagisme est inculqué dans une majorité des cas de BPCO (Singh et al., 2019) et en représente la première cause évitable (Bals et al., 2019). Dans la population de fumeurs ou ex-fumeurs, le risque de développer une BPCO approche les 50% (Marsh et al., 2006). Cependant, la plupart des études sont de nature épidémiologique et la part causale du tabagisme est difficilement appréciable (Singh et al., 2019).

Si le lien entre tabagisme et BPCO est clair et universellement admis, les récentes considérations autour de l'implication de la cigarette électronique sont encore débattues et font l'objet d'un nombre croissant de publications scientifiques (Zyoud et al., 2014). L'inhalation chronique de particules toxiques fait partie des facteurs de risque de la BPCO et

un certain nombre de particules nocives ont été mises en évidence dans les aérosols de cigarette électronique (Bals et al., 2019). Plus particulièrement, l'inhalation de nicotine induit des dommages au niveau de l'épithélium bronchique et pourrait être une cause de BPCO (Segura-Valdez et al., 2000). La position de la Société Européenne de Pneumologie sur le sujet s'aligne sur le principe de précaution et considère que malgré un manque de preuve sur les effets délétères à long-terme, la cigarette électronique représente une menace à ne pas négliger (Bals et al., 2019), au vu notamment de la consommation exponentielle observée chez les jeunes (Nasr & Sweet, 2015).

Parmi les autres causes environnementales de la BPCO, **la combustion de la biomasse en intérieur, majoritairement lors de la cuisson des aliments, est incriminée dans de nombreux cas.** Certains auteurs chiffrent à 20% le nombre de cas de BPCO associés à cette pollution intérieure à travers le monde (Marsh et al., 2006), notamment dans les pays en voie de développement. **La pollution extérieure fait quant à elle l'objet de plus de controverses** quant à son rôle dans l'étiologie de la BPCO : une exposition aiguë à cette pollution induit des symptômes respiratoires ainsi que des exacerbations chez les patients BPCO (Schikowski et al., 2014). L'accumulation d'expositions aiguës et des dommages associés supportent l'idée d'une association entre pollution extérieure et développement de la BPCO, mais cette causalité nécessite d'être expérimentalement démontrée (Schikowski et al., 2014). Enfin, l'exposition domestique ou professionnelle à des produits chimiques tels que les produits de nettoyage a été incriminée dans le déclin de la fonction pulmonaire (Svanes et al., 2018).

Bien que les facteurs environnementaux jouent un rôle déterminant dans une grande partie des cas, des modifications génétiques peuvent également être associées au développement de la BPCO. Les modifications les plus connues sont les mutations génétiques menant à la déficience en α -1 antitrypsine (Stoller & Aboussouan, 2005). Cette mutation résulte en un déséquilibre de la balance protéase/anti-protéase en faveur de l'élastase neutrophilique, responsable du développement de l'emphysème pulmonaire chez 1.9% des patients BPCO (Stoller & Aboussouan, 2005). Hormis ces mutations spécifiques et connues depuis maintenant de nombreuses années, la recherche de gènes spécifiques à la BPCO rencontre de grandes difficultés. Les récentes avancées dans ce domaine semblent provenir d'études à grande échelle se focalisant sur la recherche de combinaisons de polymorphismes nucléotidiques impliqués dans la BPCO. De cette façon, une étude a démontré l'association

entre un score de risque génétique basé sur 95 variants génétiques et la susceptibilité pour la BPCO, et ce chez près de 10 000 patients BPCO et plus de 120 000 sujets sains contrôles (Wain et al., 2017). L'association entre ce même score de risque génétique et le risque de BPCO a été confirmé par une autre étude qui associait ce score à la structure pulmonaire (Oelsner et al., 2019). Ainsi, les modifications structurales pulmonaires pourraient être le médiateur de l'association entre variations génétiques et susceptibilité pour la BPCO.

Parmi les autres facteurs de risques, on retrouve l'avancée en âge, le sexe ou encore un diagnostic d'asthme. L'avancée en âge induit à la fois une augmentation du temps d'exposition à des particules nocives et un vieillissement inévitable des tissus (Mercado et al., 2015). Cependant, discriminer la part relative de chacun de ces deux éléments apparaît difficile. Le genre semble également avoir un impact sur le risque d'apparition d'une BPCO, les femmes étant plus susceptibles de développer une forme sévère précoce (Silverman et al., 2000). Le phénotype BPCO chez la femme apparaît également particulier avec, entre autres, une plus grande tendance à la toux et à la dyspnée (Gut-Gobert et al., 2019). L'augmentation du tabagisme chez la femme a d'autre part suscité une augmentation de la prévalence de BPCO chez les femmes, prévalence qui a rejoint celle des hommes en 2008 (Gut-Gobert et al., 2019). Le fait de présenter un diagnostic d'asthme représente un facteur important, avec un risque relatif 12.5 fois plus important de développer une BPCO et 17 fois plus important de développer un emphysème. Enfin, des éléments tels que des infections respiratoires durant l'enfance, la malnutrition ou un poids de naissance trop faible ont également été associés à un risque accru de développer une BPCO (R. De Marco et al., 2011).

1.4 Diagnostic

1.4.1 Critères diagnostiques

D'après les dernières recommandations, devrait être considéré pour un diagnostic de BPCO tout patient présentant des signes de dyspnée persistante aggravée par l'exercice, de toux chronique associée à un historique d'exposition aux facteurs de risques cités au point précédent et/ou qui présente des susceptibilités de la maladie. Une fois le patient considéré pour un diagnostic de BPCO, ce diagnostic doit être confirmé cliniquement à l'aide de

l'évaluation spirométrique du VEMS (volume expiratoire maximal à la première seconde) et de la CVF (capacité vitale forcée). La mise en évidence d'une limitation persistante des débits ventilatoires est caractérisée par un rapport de Tiffeneau (VEMS/CVF) post-bronchodilatation inférieur à 0.70. La présence de cette limitation chez un patient présentant des symptômes et/ou un historique d'exposition aux facteurs de risque confirme le diagnostic primaire de BPCO (Figure 3A).

Cependant, le diagnostic primaire de BPCO ne permet pas d'établir la sévérité de l'atteinte ou de prédire l'évolution de la maladie. Pour cela, le comité GOLD a pu, dans un premier temps, définir une classification de la sévérité de la maladie en fonction du pourcentage de VEMS théorique du patient, définissant un classement de la sévérité de l'atteinte pulmonaire de « légère » à « très sévère » (Figure 3B). Depuis 2011, le comité GOLD préconise également le recours à une seconde classification dite « ABCD » (Figure 3C) prenant en compte l'historique des exacerbations ainsi que les symptômes rapportés par le patient, au travers des questionnaires CAT™ (COPD Assessment Test) et du score de dyspnée modifié du Medical Research Council (mMRC)(Fletcher et al., 1959). Cette classification permet entre autres d'individualiser les décisions sur le traitement pharmacologique à adopter (Singh et al., 2019).

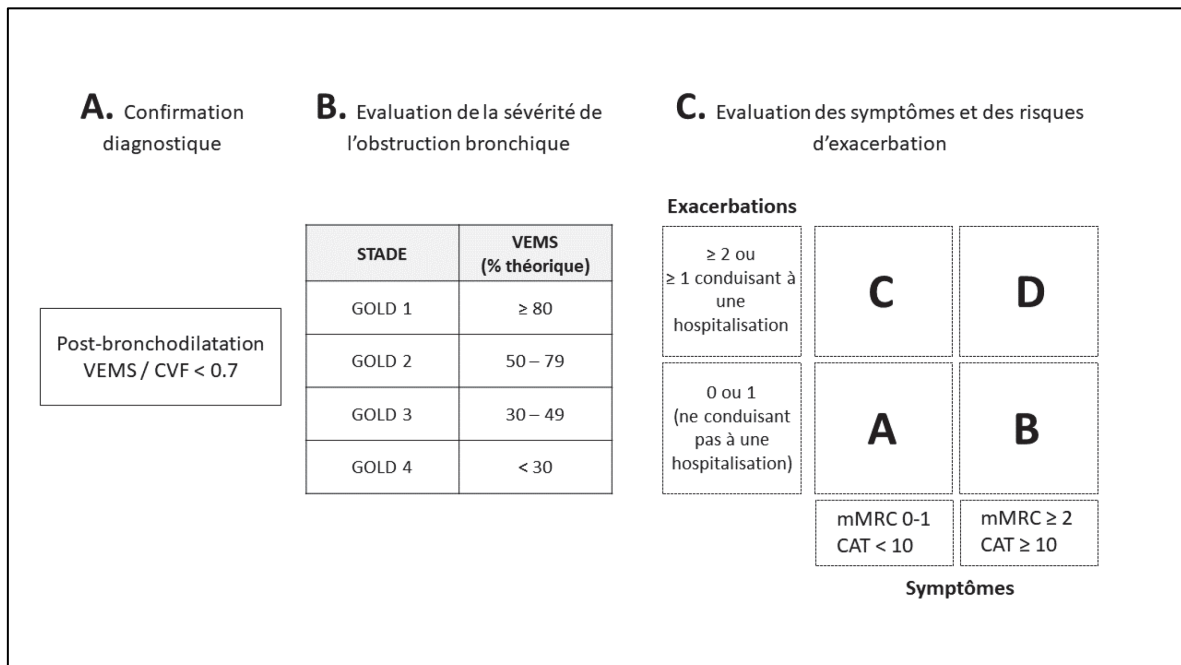


Figure 3. Etapes de classification d'un patient BPCO (adaptées du rapport GOLD 2019)

1.4.2 Sous- et sur-diagnostic de la BPCO

La BPCO, bien qu'extrêmement répandue reste, de par sa nature progressive et multifacette, une maladie méconnue du grand public et très largement sous-diagnostiquée. En effet, une vaste étude nous montre que les proportions de sous-diagnostic de BPCO s'étendent de 50.0% dans le Kentucky aux USA à 98.3% à Ile-Ife au Nigeria (Lamprecht et al., 2015). De manière globale, le sous-diagnostic de BPCO au niveau mondial est universellement élevé, avec une moyenne au-delà de 80% dans l'étude de Lamprecht *et al.* (Lamprecht et al., 2015) (Figure 4). Dans une récente revue de la littérature, il a été établi que cette moyenne oscille entre 52.6 et 86.2 en fonction des pays d'investigation (Diab et al., 2018). Ce sous-diagnostic engendre des conséquences néfastes tant au niveau individuel, de par un défaut de prise en charge, que global, du fait d'une évaluation difficile de la prévalence de la BPCO dans les populations.

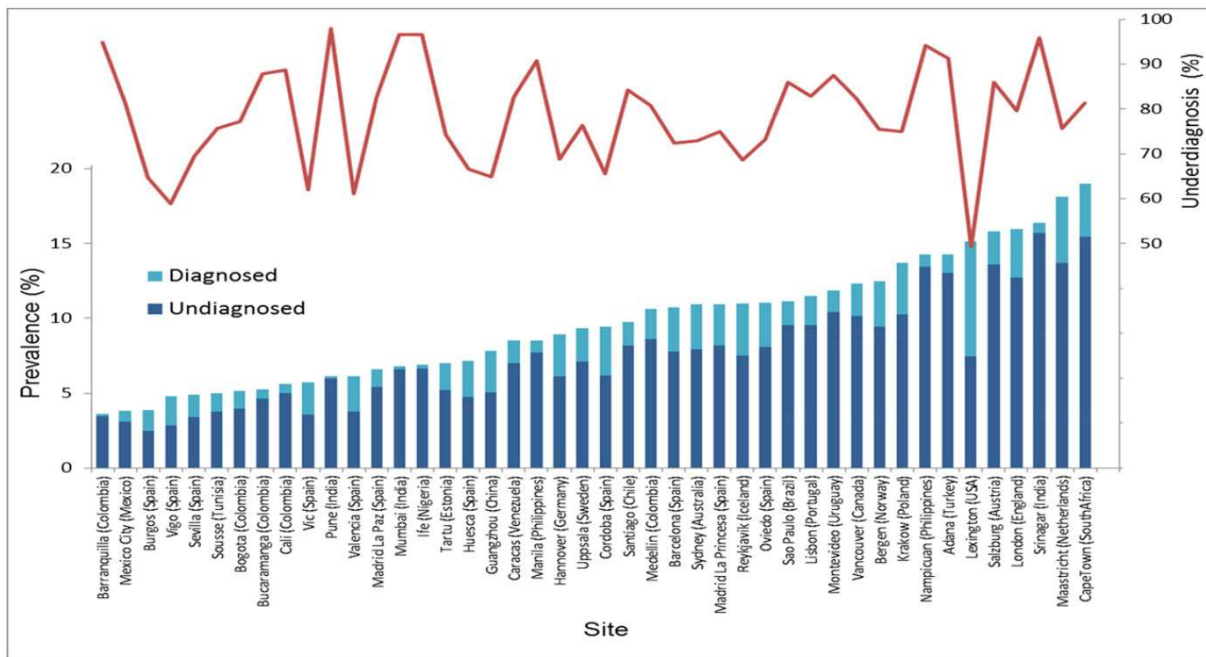


Figure 4. Prévalence et sous-diagnostic de la BPCO à travers le monde (d'après Lamprecht et al. 2015)

Le sous-diagnostic apparaît indépendamment de la prévalence de la BPCO mais semble être plus élevé pour les sujets de sexe masculin présentant un faible degré d'instruction et une obstruction bronchique légère (Lamprecht et al., 2015). Le fait de n'avoir jamais fumé ou, au

contraire, de présenter un tabagisme toujours actif, sont également de nature à réduire la probabilité de diagnostic. Enfin, le jeune âge du patient peut également être un facteur de sous-diagnostic. Ce dernier élément s'explique entre autres par le fait que le diagnostic basé sur le seuil fixe d'un rapport de Tiffeneau inférieur à 0.7 induit un sous-diagnostic chez environ 50% des sujets de moins de 45 ans (Hansen et al., 2007).

De la même façon, l'utilisation de ce critère peut mener à un sur-diagnostic chez 20% des personnes âgées (Hansen et al., 2007). Ce sur-diagnostic n'est par ailleurs pas anodin : il induit une élévation jusqu'à 89% du recours aux soins hospitaliers chez les patients concernés, notamment à cause de l'absence de prise en charge de la cause réelle de l'affection respiratoire (Gershon et al., 2018) et un gaspillage des traitements, pouvant atteindre 55% (Spyratos et al., 2016). Ce sur-diagnostic est également favorisé par une absence d'utilisation, ou une mauvaise utilisation, de la spirométrie et/ou par la confusion avec d'autres atteintes telles que l'asthme ou l'insuffisance cardiaque congestive (Diab et al., 2018). Dans la cohorte de Spyratos *et al.* (Spyratos et al., 2016), la proportion de patients sur-diagnostiqués atteignait 65%.

Ces éléments nous confortent dans l'idée que le choix du seuil pour établir ou non un diagnostic de BPCO sur la base d'une spirométrie est déterminant. Pour tenter de limiter les sous- et sur-diagnostic de BPCO dûs à l'utilisation du seuil fixe $VEMS/CVF < 0.7$, une approche définissant un nouveau seuil, nommé « lower limit of normal » (LNN) a été proposée et exploitée de la manière suivante : $LLN = VEMS/CVF$ en dessous du cinquième percentile de la valeur prédite (Miller & Pincock, 1989). Cette approche permet une réduction des mauvaises classifications et a été adoptée comme critère diagnostique par la coalition des sociétés de pneumologies américaines et européennes (ATS/ERS) depuis plus de 15 ans (Celli et al., 2004; Pellegrino et al., 2005). A l'inverse, le comité GOLD préconise toujours dans son dernier rapport, à l'image des rapports précédents, une utilisation du seuil fixe : $VEMS/CVF$ post-bronchodilatation inférieur à 0.7. Cependant, il accepte le critère LNN en cas d'association avec un emphysème visible à l'examen radiologique (Vogelmeier et al., 2017). Une récente et importante étude montre par ailleurs que la prédiction des hospitalisations et de la mortalité relative à la BPCO est *a minima* aussi bien prédite par le seuil $VEMS/CVF < 0.7$ que par le seuil LLN (Bhatt et al., 2019). La question du choix du seuil pour établir un diagnostic de BPCO est ainsi un point de discordance au sein de la communauté scientifique non résolu à ce jour.

1.5 Coût économique de la BPCO

Nous avons développé précédemment la forte prévalence ainsi que la mortalité relative à la BPCO. **Cependant, l'impact sociétal de cette maladie est également extrêmement important en ce qui concerne les coûts de santé.** En Europe, l'analyse d'une cohorte allemande de plus de 2000 patients BPCO a permis d'estimer, en fonction de la sévérité, des coûts annuels de santé directs de 2595 à 8924€ par patient et des coûts indirects de 8621 à 27658€ par patient (Wacker et al., 2016). Les coûts directs correspondent aux coûts de santé engendrés par la maladie (traitements ...) alors que ceux indirects comprennent les répercussions de la maladie sur d'autres aspects (arrêt de travail ...). Le livre blanc de la société européenne de pneumologie (European Lung White book) avait quant à lui chiffré à 23.1 millions les coûts annuels directs et 25.1 millions les coûts annuels indirects de la BPCO en Europe (Gibson et al., 2013).

Au-delà de l'Europe, les coûts directs ont été chiffrés par patient par an à \$3077 en Corée du Sud, \$1544 en Iran et \$2335 à Singapour (ur Rehman et al., 2019). Aux États-Unis, ce coût a été estimé à \$10 367 (ur Rehman et al., 2019) et présente une inflation de 9% par an ces dernières années (Jinjuvadia et al., 2017). La prévention et une meilleure prise en charge de la BPCO sont ainsi des défis mondiaux de taille dans la réduction des coûts de santé, qui permettra une réorientation des ressources vers les maladies non évitables. Le coût économique de la BPCO est également fortement exacerbé par l'association entre la BPCO et ces nombreuses comorbidités systémiques.

1.6 Répercussions systémiques

1.6.1 Comorbidités et phénotypes cliniques dans la BPCO

Bien qu'à point de départ pulmonaire, la BPCO est une maladie systémique quasi-systématiquement associée à des comorbidités extra-pulmonaires. Ainsi, Vanfleteren *et al.* ont montré que 97.7% des patients BPCO présentaient au moins une comorbidité (Vanfleteren et al., 2013b). Dans le même rapport, il apparaît que plus de la moitié des patients BPCO présentent 4 comorbidités ou plus. Si la présence de comorbidités relie tous les patients BPCO,

l'unicité de ces patients réside dans le grand nombre possible de combinaisons de comorbidités. La mise en évidence de groupes de patients distincts présentant en leur sein une homogénéité d'expression des comorbidités permet de mieux définir les phénotypes cliniques de patients BPCO. Dans cet exercice, Vanfleteren *et al.* ont réussi à mettre en évidence cinq groupes distincts (Vanfleteren et al., 2013b). Parmi ces groupes, il est possible d'identifier un groupe de patient BPCO moins comorbide présentant en moyenne 2.5 comorbidités. Les autres groupes présentent quant à eux un nombre plus homogène de comorbidités, de 3.8 à 4.4, mais différent dans la nature de ces comorbidités. La nature des comorbidités majoritairement exprimées a permis de définir un nom pour chacun de ces quatre groupes restants : un groupe de patients psychologiques, un métabolique, un cachectique et enfin un cardiovasculaire. Ces comorbidités cardiovasculaires occupent une place importante dans la morbi-mortalité des patients BPCO.

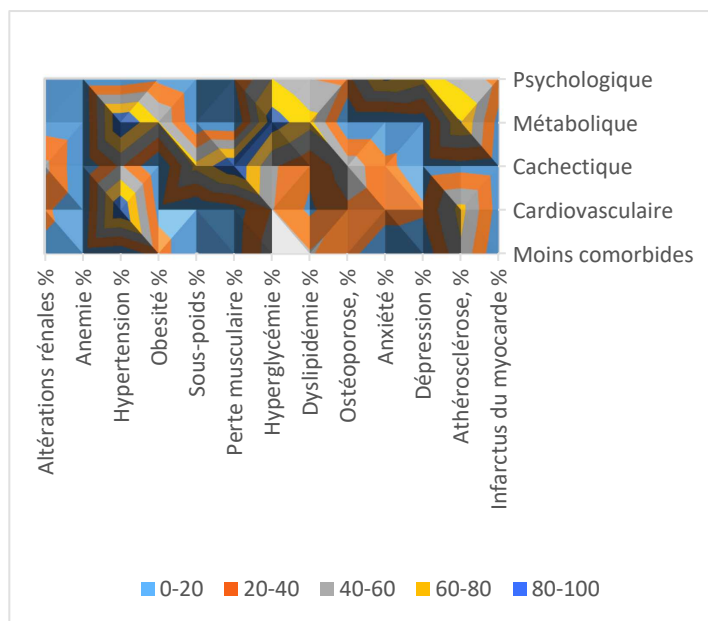


Figure 5. Carte de représentation de l'expression relative des principales comorbidités de la BPCO dans les principaux groupes de patients BPCO (d'après Vanfleteren et al. 2013).

1.6.2 Le cas des comorbidités cardiovasculaires

L'appareil cardiovasculaire est constitué du cœur et du système vasculaire. Ce dernier peut être subdivisé en un système vasculaire pulmonaire et un système systémique. Dans la circulation pulmonaire, les artères transportent le sang désoxygéné vers les poumons et les veines le sang oxygéné vers le cœur. Dans la circulation systémique, l'inverse se produit, les artères transportant le sang oxygéné vers les organes et les veines ramenant le sang

désoxygéné vers le cœur. Durant ce travail, nous nous focaliserons sur le système vasculaire systémique qui est au cœur de la genèse des atteintes cardiovasculaires.

Les comorbidités cardiovasculaires dans la BPCO présentent un double méfait, celui d’être parmi les plus fréquentes ainsi que celui d’être les plus graves. Ces comorbidités ont un impact important sur la trajectoire de la maladie, en étant à l’origine d’une part majeure des ressources utilisées pour la prise en charge thérapeutique mais également source de morbidité et de mortalité. En effet, près d’un tiers des décès au sein d’un groupe de patients BPCO peut être attribué à une cause cardiovasculaire (McGarvey et al., 2007). Comme présenté dans la Figure 6, les patients BPCO présentent à la fois un risque plus élevé de survenue d’évènements cardiovasculaires et une augmentation de la prévalence des facteurs de risques cardiovasculaires (Chen et al., 2015).

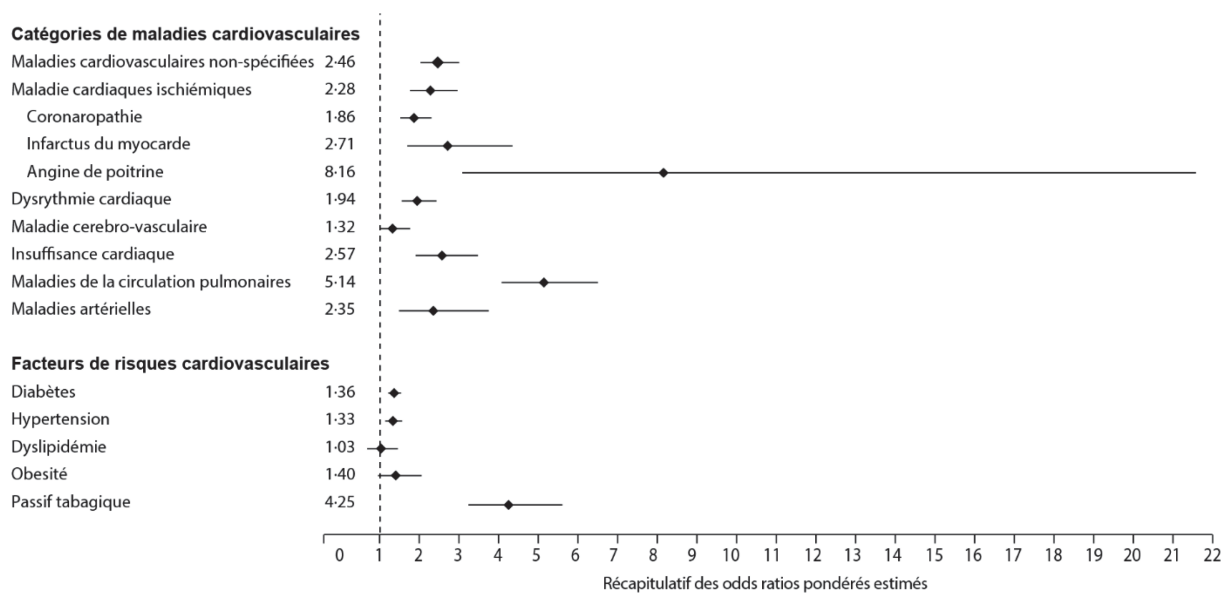


Figure 6. Risques de maladies cardiovasculaires et prévalence des facteurs de risques cardiovasculaires dans la BPCO (D’après Chen et al. 2015)

Les patients BPCO présentent de 1.32 à 8.16 fois plus de risques de développer une comorbidité cardiovasculaire en fonction de la maladie considérée. Alors que le tabagisme apparaît comme un facteur de risque commun de la BPCO et des atteintes cardiovasculaires primaires (Chen et al., 2015), **la BPCO apparaît également comme un fort prédicteur du risque cardiovasculaire, indépendamment des facteurs de risques communs**, du mode de vie des patients ou de leurs caractéristiques socio-démographiques (Finkelstein et al., 2009). Bien

que les mécanismes physiopathologiques sous-tendant le lien entre BPCO et comorbidités cardiovasculaires doivent être clarifiés, les comorbidités cardiovasculaires dans la BPCO soient bien spécifiques de la maladie et particulières. Ainsi, ces dernières ne peuvent pas être traitées de la même façon que des affections cardiovasculaires primitives ou découlant d'autres pathologies chroniques (diabète ...), leur étiologie et leur évolution au cours du temps étant différentes. L'enjeu le plus crucial ici est donc de pouvoir répondre à la question suivante : **quels facteurs de la maladie pourraient être à l'origine de ces complications cardiovasculaires ?**

Une altération de la fonction endothéliale joue un rôle clef dans l'étiologie de l'athérosclérose, l'hypertension et *in fine* du développement de maladies cardiovasculaires (Yeboah et al., 2007). D'autre part, la faculté que possède la cellule endothéliale à former des néo-vaisseaux sanguins, appelée angiogenèse, est également déterminante dans la protection contre les affections cardiovasculaires, en limitant entre autres l'élévation de la tension artérielle (Neeltje Steeghs et al., 2008). Ainsi les différents facteurs systémiques de la BPCO (inflammation, stress oxydant...) pourraient induire une **élévation du risque cardiovasculaire en perturbant les fonctions vasculaires à plusieurs niveaux : capillaire et artériel.**

De plus, ces atteintes vasculaires pourraient être impliquées dans une autre importante répercussion systémique de la BPCO, l'intolérance à l'effort.

1.6.3 BPCO et intolérance à l'effort

BPCO et intolérance à l'effort sont des éléments intimement liés (Spruit et al., 2013). Cette intolérance à l'effort ne s'explique pas par un simple déconditionnement physique des patients BPCO mais apparaît comme une conséquence des répercussions systémiques de la maladie (Broxterman et al., 2020). Cette intolérance à l'effort va être, à l'image des comorbidités cardiovasculaires, à l'origine d'une réduction de la qualité de vie des patients mais apparaît également comme un facteur pronostic de la maladie (Casanova et al., 2008). La capacité de consommation de l'oxygène au niveau musculaire ($V'O_2$) est un déterminant majeur de la tolérance à l'effort et apparaît réduite chez les patients BPCO. En effet, la valeur maximale de $V'O_2$ chez les patients a été trouvée réduite par plusieurs études, avec des

réduction d'environ 30% (Broxterman et al., 2020; Gouzi et al., 2013). De la même façon, l'apparition du seuil lactique est apparu plus précoce chez des sujets BPCO (38% de VO_{2pic} contre 54% chez les sujets sains contrôles) (Saey et al., 2005b)(Maltais et al., 1996), témoignant d'altération des capacités oxidatives musculaires.

Une récente étude a souligné le rôle clef du système vasculaire, à la fois capillaire et artériel dans la régulation de la $V'O_2$ musculaire chez le patient BPCO (Broxterman et al., 2020). En effet, la $V'O_2$ est dépendante de l'apport et de la diffusion de l' O_2 au niveau musculaire. Or, ces deux composantes sont réduites dans le cadre d'un exercice musculaire chez le patient BPCO. Cela laisse suspecter une forte contribution d'altérations du système vasculaire à la réduction de la $V'O_2$ et de la tolérance à l'effort chez ces patients. Supportant ce lien, des altérations des dynamiques cardiovasculaires circulatoires peuvent jouer un rôle dans l'étiologie de l'intolérance à l'effort chez le patient BPCO (Castagna et al., 2008; Chiappa et al., 2008).

Ainsi, il apparait nécessaire de mieux comprendre l'origine des atteintes pathologiques capillaires et artérielles systémiques de la BPCO pour pouvoir proposer une prise en charge optimale des répercussions de cette maladie sur le risque cardiovasculaire et l'intolérance à l'effort. L'identification des facteurs de risque ainsi que des mécanismes des atteintes capillaires et artérielles constituent des étapes indispensables.

1.6.4 *Atteintes vasculaires systémiques dans la BPCO : Nouveaux facteurs de risque*

Chez le patient BPCO, un certain nombre de répercussions au niveau du système vasculaire systémique ont été documentées. Ces altérations touchent aussi bien les sections artérielles que capillaires. Les patients BPCO montrent des atteintes vasculaires précoces, précliniques tout comme avancées. Ainsi, il a été retrouvé chez les patients BPCO des altérations pré-cliniques telles que la raréfaction capillaire musculaire mais également des anomalies artérielles comme des troubles de la vasoréactivité artérielle ou un épaissement intima-media carotidien (Alpaydin et al., 2013; Gouzi et al., 2013; Jatta et al., 2009; Vaes et al., 2017). Sur le plan clinique, on retrouve fréquemment une hypertension artérielle chez les patients BPCO (Vanfleteren et al., 2013b) mais également des atteintes plus avancées et graves comme

la présence de plaques athérosclérotiques, d'artériopathie oblitérante des membres inférieurs ou d'anévrisme de l'aorte abdominale (Ando et al., 2014; Finkelstein et al., 2009; Williams et al., 2014).

Traditionnellement, les atteintes vasculaires dans la BPCO sont expliquées par le partage de facteurs de risque communs, tels que le tabagisme ou la plus haute prévalence de diabète ou d'obésité observée dans cette pathologie (Chen et al., 2015; MacLay & MacNee, 2013a). Cependant, la BPCO est associée à un risque accru d'atteintes vasculaires indépendamment de ces facteurs de risques traditionnels. **Ainsi, des facteurs de risques liés directement à la BPCO pourraient être impliqués dans ces atteintes** (Finkelstein et al., 2009; MacLay & MacNee, 2013b). La pathogenèse de la BPCO au niveau pulmonaire s'établit *via* des phénomènes d'augmentation des niveaux de stress oxydant, d'inflammation et de déséquilibres entre protéases et anti-protéases. Or, ces phénomènes sont impliqués dans l'altération des artères et des capillaires et ont tous été retrouvés augmentés dans la circulation systémique des patients BPCO (Bolton et al., 2009; Gan et al., 2004; MacNee, 2005). D'autre part, les patients BPCO présentent un vieillissement accéléré des cellules associé à un raccourcissement des télomères menant à la sénescence cellulaire (arrêt du cycle cellulaire) (Paschalaki et al., 2013). Une sénescence des cellules impliquées dans la régulation vasculaire capillaire et artérielle pourrait donc également expliquer les défauts retrouvés chez les patients BPCO.

En résumé, **la présence de facteurs circulants délétères (inflammation, stress oxydant, protéases) et/ou d'anomalies des cellules vasculaires apparaissent comme des nouveaux facteurs de risques du défaut vasculaire dans la BPCO**. Cependant, les cibles cellulaires de ces facteurs de risques et les mécanismes les liant aux atteintes vasculaires dans la BPCO restent à ce jour largement méconnus.

1.7 Intérêt d'une prise en charge systémique de la BPCO

1.7.1 Une prise en charge pluridisciplinaire

Au vu de la pluralité des manifestations systémiques dans la BPCO, aussi bien cardiovasculaires que psychologiques ou musculaires, une prise en charge globale de la maladie est nécessaire. Ainsi, la personnalisation est un élément clef de la stratégie de prise en charge systémique à adopter chez ces patients (Figure 7).

La stratégie thérapeutique choisie pour chaque patient doit ainsi intégrer les caractéristiques primaires de l'atteinte pulmonaire. Par exemple, la prise de corticostéroïdes inhalés apparaît intéressante surtout en cas d'inflammation éosinophilique avérée (Brightling et al., 2000) alors qu'une réduction mécanique des volumes pulmonaires par pose de valves endo bronchiques est particulièrement intéressante chez les patients présentant un emphysème sévère (Klooster et al., 2015). Chez les patients présentant une chute de la pression artérielle en oxygène importante ($\text{PaO}_2 < 60\text{mmHg}$), un traitement par oxygénothérapie sera préféré (Spruit et al., 2013).

Au-delà du traitement de l'atteinte primaire, il est également crucial d'adopter pour chaque patient une stratégie de prévention comprenant l'éviction des facteurs de risque des répercussions systémiques de la maladie ainsi que leur traitement (Vanfleteren et al., 2016). Cette stratégie nécessite une coordination pluridisciplinaire autour des organes touchés. Cependant, la méconnaissance des spécificités de pathogenèse de certaines comorbidités dans la BPCO, notamment cardiovasculaires, complique la prise en charge, la transposition de stratégies thérapeutiques mise au point dans d'autres contextes (statines ...) n'étant pas toujours un succès (Chen et al., 2015). Pour tenter de pallier à l'absence de prise en charge systémique de la BPCO et dans l'idée de favoriser une prise en charge globale et individualisée des patients BPCO, une stratégie thérapeutique appelée réhabilitation respiratoire a émergé, basée sur l'intégration de plusieurs interventions non-médicamenteuses.

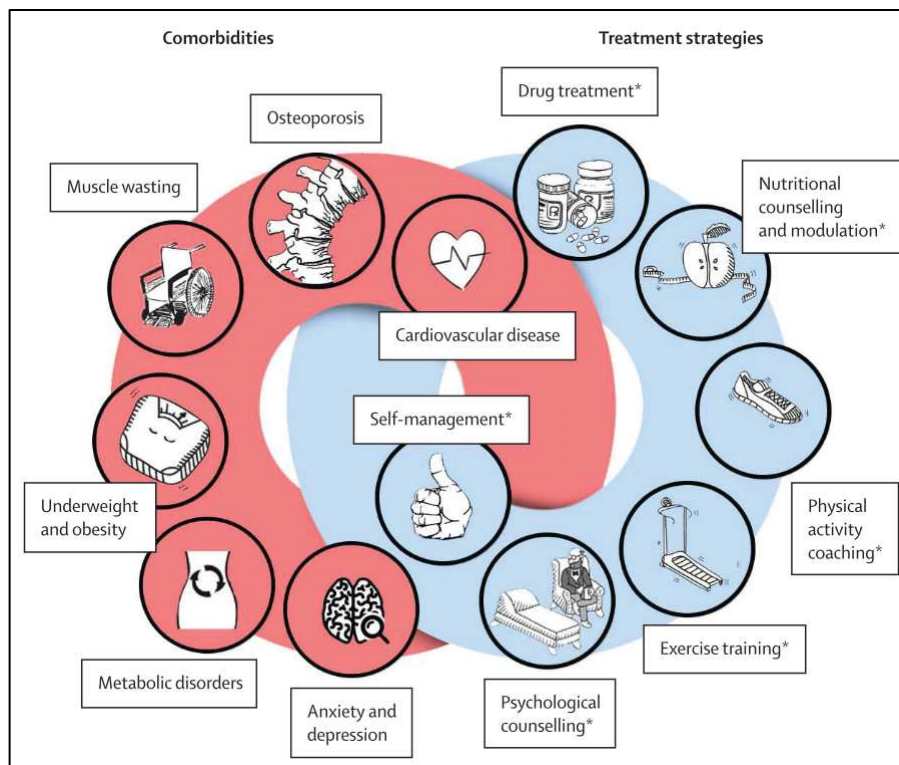


Figure 7. Prise en charge systémique de la BPCO et de ses comorbidités d'après Vanfleteren et al. 2016).

1.7.2 La réhabilitation respiratoire

Les programmes de réhabilitation respiratoire sont aujourd'hui incontournables dans la prise en charge de la BPCO (Spruit et al., 2013) et font partie intégrante du traitement de ces

patients (Y. Lacasse et al., 2007). Ces programmes se basent sur une approche pluridisciplinaire non-médicamenteuse comprenant une grande part de réentraînement à l'effort mais intégrant également des interventions de support psychologique, de conseil nutritionnel ainsi que d'amélioration de l'autogestion de la maladie. Un niveau de preuve scientifique très important soutient l'efficacité de la réhabilitation respiratoire dans l'amélioration de la dyspnée ou de la tolérance à l'effort de ces patients (Ries et al., 2007). De même, ces programmes ont montré des bénéfices sur la qualité de vie ou la réduction du recours au soin chez les patients (Spruit et al., 2013). Bien qu'impactant peu la fonction pulmonaire en soi, cette intervention pluridisciplinaire permet à la fois de prévenir et de traiter les répercussions systémiques de la BPCO.

Ces programmes de réhabilitation ont démontré leur efficacité pour réduire et prévenir les comorbidités métaboliques dans la BPCO comme le diabète de type 2 ou l'obésité (Archer & Baker, 2009). D'autre part, cette réhabilitation est bénéfique dans le traitement et la prévention du remodelage et de la perte de masse musculaire chez les patients cachectiques (Vogiatzis et al., 2010). Des études ont montré une réduction de la fréquence de syndromes anxieux et/ou dépressifs chez les patients BPCO ayant bénéficié d'un séjour en réhabilitation respiratoire (Withers et al., 1999). **Cependant, l'effet de la réhabilitation respiratoire présente aussi ses limites, notamment sur la prévention du risque cardiovasculaire.**

1.7.3 Les limites de la réhabilitation respiratoire sur la fonction vasculaire

Alors que la réhabilitation respiratoire joue un rôle dans le traitement et la prévention d'un grand nombre de comorbidités extra-pulmonaires, son effet sur les comorbidités cardiovasculaires et notamment les atteintes vasculaires peine à être démontré dans la BPCO, du fait de réponses hétérogènes et loin d'être systématiques (Aldabayan et al., 2017; Triest et al., 2016). Parmi les différentes composantes de la réhabilitation respiratoire, le réentraînement à l'effort occupe une place centrale et apparaît comme l'intervention la plus probablement liée aux effets sur le système vasculaire.

Dans la lutte contre les complications cardiovasculaires, la stratégie est de cibler les facteurs prédicteurs d'apparition précoce. Ces facteurs, cliniques ou précliniques, se manifestent en

amont de l'apparition d'évènements cardiovasculaires dommageables pour le pronostic des patients. Parmi ces éléments, une grande partie apparaissent comme étant des facteurs liés au système vasculaire avec par exemple l'hypertension artérielle, une altération clinique très fréquente dans la BPCO tout comme des atteintes pré-cliniques telles que l'altération de la vasorelaxation artérielle (VRA), l'élévation de la vélocité d'onde de pouls (VOP) ou encore la raréfaction capillaire. **Alors que le réentraînement à l'effort permet une amélioration de ces phénomènes chez des sujets asymptomatiques, ces effets semblent limités chez le patient BPCO.**

En effet, alors que la VOP est habituellement améliorée par le réentraînement à l'effort (Beck et al., 2013), cet effet peine à être démontré chez le patient BPCO (Aldabayan et al., 2017; Vanfleteren et al., 2014). De la même façon, la VRA est augmentée par le réentraînement à l'effort chez le sujet sain (Tinken et al., 2009) et les patients insuffisant cardiaque (Pearson & Smart, 2017) ou présentant des maladies coronaires (Edwards et al., 2004b). A l'inverse, **les études s'intéressant à l'effet du réentraînement à l'effort chez le patient BPCO n'ont pas mis en évidence d'amélioration de la VRA** à la suite du programme (Brønstad et al., 2013; Gelinas et al., 2017; Iepsen et al., 2016a). La VOP tout comme la VRA étant des éléments prédicteurs du risque cardiovasculaire, ces mauvaises adaptations pourraient conduire à la forte prévalence d'atteintes cardiovasculaires dans la BPCO.

Nous avons vu que l'hypertension est une manifestation clinique systémique extrêmement fréquente dans la BPCO. Contrairement aux sujets hypertendus sans comorbidités, **les patients BPCO ne bénéficient pas d'une réduction de la pression artérielle de repos à la suite d'un réentraînement à l'effort de 4 semaines** (Canavan et al., 2015). La mesure de pression artérielle au maximum de l'exercice permet de mettre en évidence une élévation précoce et sub-clinique de la tension artérielle. Ici encore, un réentraînement à l'effort de 4 semaines permet une réduction de la pression artérielle d'exercice chez les sujets sains mais pas chez les patients BPCO (Gouzi et al., 2016b).

Alors qu'une raréfaction capillaire musculaire est présente chez les patients BPCO, il a également été constaté **un émoussement du processus menant à l'acquisition de nouveaux capillaires musculaires à la suite du réentraînement à l'effort, appelé angiogenèse** (Gouzi et al., 2013). De manière intéressante, cette angiogenèse émoussée apparaissait liée aux défauts

d'adaptation de la pression artérielle d'exercice chez le patient BPCO (Gouzi et al., 2016b). Le lien étroit entre lit capillaire et tension artérielle est par ailleurs bien documenté (Humar et al., 2009b). Ainsi, une mauvaise adaptation du système artériel pourrait limiter l'effet de prévention du risque cardiovasculaire du réentraînement à l'effort chez le patient BPCO, l'hypertension artérielle étant un élément clef de cette prévention.

De plus, l'altération de la réponse angiogénique au réentraînement chez le patient BPCO pourrait induire une limitation des gains de tolérance à l'effort chez ces patients (Gouzi et al., 2013), en réduisant la capacité de diffusion de l'oxygène au niveau musculaire et la $V'O_2$. D'autre part, l'augmentation de l'apport d' O_2 au niveau musculaire en réponse aux stimuli de l'exercice est également sous le contrôle de la capacité de VRA en amont (Broxterman et al., 2020). Ainsi, l'altération de l'amélioration de VRA sous l'effet du réentraînement à l'effort est de nature à limiter les gains de tolérance à l'effort des patients BPCO.

Pour conclure, une mauvaise adaptation des systèmes capillaires et artériels chez le patient BPCO est de nature à compromettre les gains en termes de prévention du risque cardiovasculaire et de tolérance à l'effort chez ces patients. Cependant, les déterminants et les conséquences de ces défauts d'adaptation vasculaire au réentraînement à l'effort doivent être plus amplement explorés.

Résumé du chapitre 1

La BPCO est une maladie fréquente, évitable, traitable mais trop souvent mal diagnostiquée. Cette maladie est la troisième cause de décès dans le monde et est responsable d'une grande part des dépenses de santé.

L'inhalation répétée de particules nocives joue un rôle clef dans l'étiologie de la BPCO et va induire une élévation de l'inflammation, du stress oxydant et des protéases au niveau pulmonaire qui engendre un remodelage pathologique menant à une hypersécrétion de mucus et à l'emphysème.

Les facteurs délétères pulmonaires se retrouvent également au niveau systémique et font de la BPCO une maladie complexe associée à des comorbidités extra-pulmonaires quasi-systématiques. L'intolérance à l'effort et les atteintes cardiovasculaires apparaissent parmi les plus fréquentes et les plus graves.

Les systèmes artériels et capillaires sont directement responsables de l'élévation du risque cardiovasculaire et de l'intolérance à l'effort chez le patient BPCO. De plus, bien que le réentraînement à l'effort ait physiologiquement un rôle bénéfique sur la fonction des capillaires et des artères, il ne produit qu'un effet limité sur ces altérations vasculaires (capillaires et artérielles) chez le patient BPCO.

Ainsi, restaurer la sensibilité de la fonction vasculaire au réentraînement à l'effort dans la BPCO passe par : 1/la compréhension des adaptations des systèmes capillaires (chapitres 2 et 3) et artériels à l'entraînement (chapitre 4) chez les sujets sains et 2/ la formulation d'hypothèses pour expliquer les défauts d'adaptation de ces systèmes observés chez les patients BPCO.

Chapitre 2. La capillarisation musculaire : Rôle physiologique et anomalies chez le patient BPCO.

Nous avons vu au chapitre précédent que le système capillaire musculaire pouvait être impliqué dans la régulation du risque cardiovasculaire et de la tolérance à l'effort. Ces rôles ainsi que l'implication d'un défaut de capillarisation musculaire dans la BPCO seront discutés dans la partie suivante.

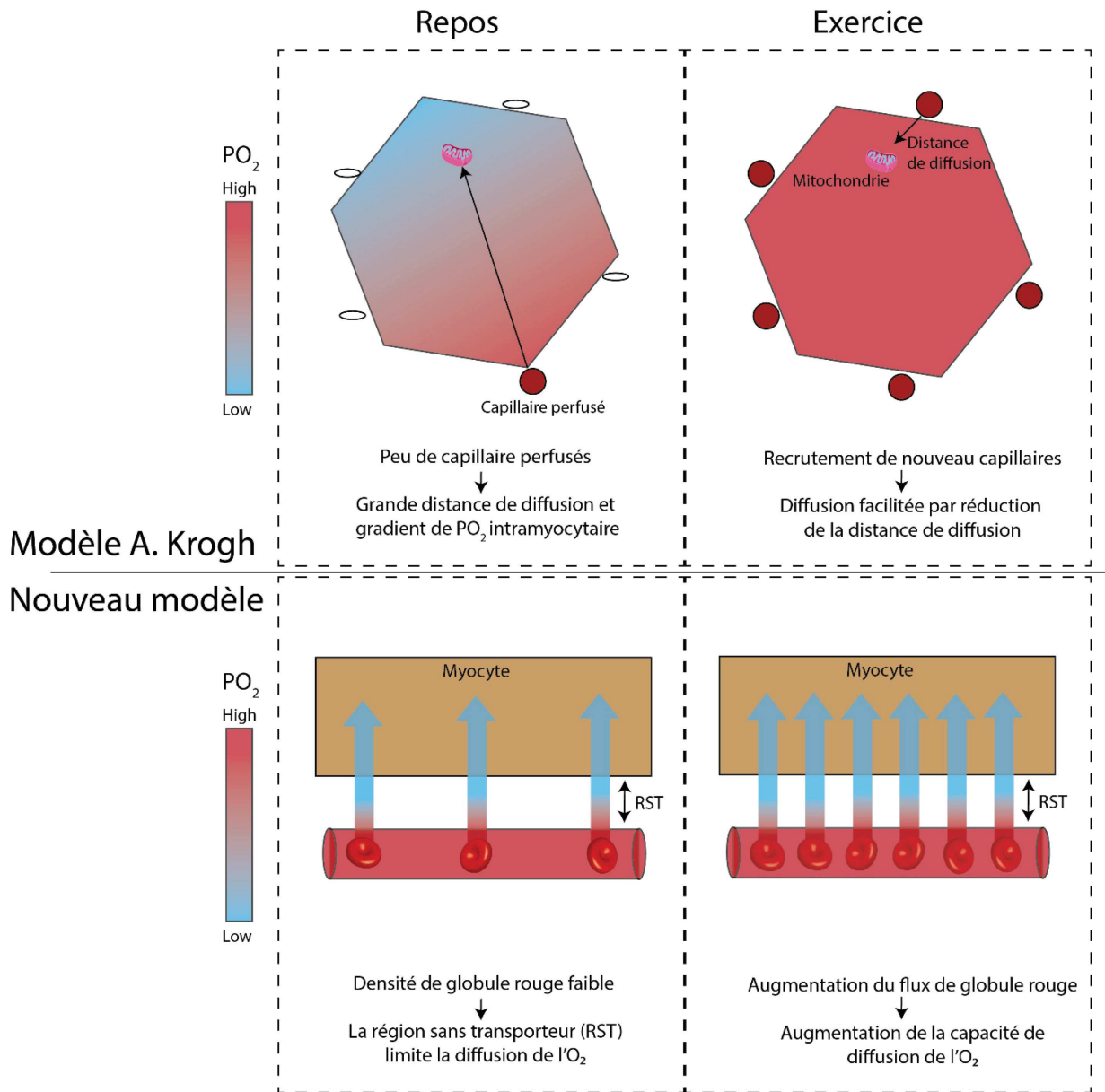
2.1 Rôle des capillaires sanguins musculaires

Les capillaires sanguins sont les plus petits vaisseaux du système vasculaire. Un capillaire sanguin est défini comme un vaisseau présentant un diamètre inférieur à 10 μ m et ne présentant pas de feuillet continu de muscle vasculaire lisse (Hall et al., 2014). Dans le muscle squelettique, il existe une communication entre les capillaires sanguins et les cellules musculaires, les myocytes. L'absence de feuillet continu de muscle vasculaire lisse laisse libres des zones d'échanges où le mur vasculaire n'est composé que d'une cellule endothéliale et de la membrane basale. Cette relation intime entre le compartiment intravasculaire et le myocyte en fait une zone privilégiée d'échanges d'O₂ (oxygène), de nutriments, et d'évacuation des produits du métabolisme. Ainsi, les capillaires sanguins vont jouer un rôle clef dans la V'O₂ musculaire et la tolérance à l'effort, en favorisant notamment la diffusion et l'apport d'O₂ au niveau musculaire, rôles détaillés ci-après.

2.1.1 Diffusion de l'oxygène

Au début de 20^{ème} siècle, un éminent physiologiste du nom **d'August Krogh identifie les capillaires sanguins comme le site principal de diffusion de l'oxygène** du compartiment

Figure 8. Modèle de diffusion de l'oxygène musculaire. Partie haute, modèle de diffusion en cylindre proposé par A. Krogh. Partie basse, modèle de diffusion présenté dans la littérature actuelle.



sanguin vers les tissus (Krogh, 1919). Au niveau musculaire, le modèle de Krogh se définit par un modèle de diffusion en cylindre, c'est-à-dire que la pression partielle en O₂ (PO₂) intramyocytaire diminue à mesure que l'on s'éloigne du capillaire le plus proche, et que la distance globule rouge (GR)-mitochondrie est déterminante dans cette diffusion (Figure 8). Ce modèle se repose également sur la présence d'une augmentation de la diffusion de l'O₂ par l'intermédiaire d'un recrutement capillaire *de novo* à l'initiation des contractions musculaires (Krogh, 1919). En effet, d'après A. Krogh, seul un nombre réduit de capillaires sanguins

musculaires supporte un flux de GR au repos (~10%). Lors de l'initiation des contractions musculaires, la présence de sphincters pré-capillaires rendrait possible un recrutement capillaire, c'est-à-dire une augmentation du nombre de capillaires perfusés, sous l'effet d'une chute de la PO_2 intramyocytaire. Ce phénomène serait à l'origine d'une réduction des distances de diffusion et donc d'une augmentation de la diffusion d' O_2 musculaire (Figure 8).

Cependant, ces dernières années, le modèle proposé par A. Krogh s'est heurté à l'émergence d'un certain nombre de preuves scientifiques incompatibles. En premier lieu, certaines études ont pu démontrer que la majorité des capillaires sanguins musculaires supportent un flux de GR au repos et qu'une augmentation de la consommation d' O_2 musculaire est possible en l'absence de recrutement capillaire (Brad J. Behnke et al., 2002). De plus, le flux de GR au sein des capillaires sanguins musculaires augmente dès les premières contractions, ce qui rend peu probable son initiation par la chute de PO_2 intramyocytaire, qui apparaît plus tardivement (Bradley J. Behnke & Delp, 2010). La présence d'un gradient de PO_2 au sein du myocyte fût également remise en question par des études montrant une PO_2 intramyocytaire très faible et spatialement homogène (Gayeski et al., 1987; Richardson et al., 1995). Ces résultats indiquent que la diffusion de l' O_2 ne serait pas déterminée par la distance entre le GR et la mitochondrie myocytaire, mais plutôt par la courte distance interstitielle entre le GR et le sarcolemme (Figure 8, Figure 11). En effet, cette « région sans transporteurs », bien que courte (1.5 μ m), constitue la principale source de résistance à la diffusion de l'oxygène des GR à la mitochondrie, du fait notamment de l'absence d'hèmes facilitant le transport de l' O_2 (hémoglobine ou myoglobine)(Richardson et al., 1995).

Ainsi, la distance de diffusion intramyocytaire n'apparaît plus comme déterminante. Des expériences utilisant des sondes phosphorescentes sensibles à l'oxygène ont montré que la réduction de PO_2 le long de l'axe GR-mitochondrie n'est pas linéaire, comme pressenti par A. Krogh, mais que l'on assiste à une chute spectaculaire entre les compartiments microvasculaires (PO_{2mv}) et interstitiels (PO_{2is}) ($\Delta PO_{2mv-is} = 15-20$ mmHg) beaucoup moins marquée par la suite ($\Delta PO_{2is-myocyte} = 2-6$ mmHg)(Hirai, Colburn, et al., 2019). L'écart important entre PO_{2mv} et PO_{2is} est cohérent avec l'idée que cette zone est une zone de diffusion difficile, aidée par ce gradient de PO_2 important. La consommation d' O_2 musculaire ($V'O_{2m}$) va donc être déterminée par la persistance d'un ΔPO_{2mv-is} élevé et d'une élévation des

capacités de diffusion de l'oxygène musculaire (DmO_2), en accord avec la loi de diffusion de Fick (Equation 1).

Équation 1. Loi de diffusion de Fick. $\dot{V}O_{2m}$: Consommation d'oxygène musculaire; DmO_2 : Capacité de diffusion de l' O_2 musculaire ; ΔPO_{2mv-is} gradient de PO_2 entre les compartiments microvasculaires et interstitiels.

$$\dot{V}O_{2m} = DmO_2(\Delta PO_{2mv-is})$$

Bien que multifactorielle, la DmO_2 est majoritairement liée à la surface disponible pour la diffusion (Russell S. Richardson et al., 1995). Considérant l'absence de recrutement capillaire *de novo* évoquée précédemment, l'augmentation de cette surface s'effectue de manière aigüe au travers de l'augmentation du nombre de GR au contact de la paroi capillaire à un instant donné (Hirai et al., 2018). Ainsi, toute augmentation de la densité spatiale, de la vitesse de transit ou du flux de GR est de nature à augmenter la DmO_2 et donc la $\dot{V}O_2$. L'hématocrite au sein des capillaires musculaires apparaît très en deçà des niveaux systémiques au repos (environ 15%)(Copp et al., 2009). Lors de la contraction musculaire, l'hématocrite subit une augmentation pour rejoindre les niveaux systémiques (45%)(Copp et al., 2009). Cette élévation de la densité de GR induit un accroissement spectaculaire de la DmO_2 permettant un maintien du ΔPO_{2mv-is} quasi-constant. En effet, **aucune altération significative du ΔPO_{2mv-is} n'a été retrouvée, que ce soit lors d'exercices musculaires légers ou au contraire très intenses** (Hirai et al., 2018) ou encore lors de la récupération (Hirai, Craig, et al., 2019). De plus, l'augmentation de la densité spatiale des GR potentialise la longueur capillaire disponible pour la diffusion de l' O_2 . Le recrutement des capillaires lors de l'augmentation de la demande en O_2 s'effectue ainsi de manière longitudinale (plus de longueur impliquée dans les échanges gazeux) et non en termes de nombre de capillaires perfusés (Poole et al., 2013), comme initialement proposé par A. Krogh.

Si l'augmentation aigüe de la DmO_2 est intimement liée à la dynamique des GR, son augmentation sur le long terme est également dépendante de l'augmentation du nombre de capillaires sanguins (Andersen & Henriksson, 1977). Cette augmentation, engendrée par exemple par un entraînement à l'effort, est à l'origine d'une augmentation de la surface d'échange capillaro-musculaire et donc de la DmO_2 . *In fine*, cela résulte en un flux d' O_2 plus

important au travers de la « région sans transporteurs », goulot d'étranglement du voyage de l'O₂ du GR à la mitochondrie.

Nous avons vu dans cette partie que les capillaires sont le siège de l'adaptabilité du muscle en termes de diffusion de l'O₂, en augmentant notamment la DmO₂, déterminant de la V'O₂ du fait d'un ΔPO_{2mv-is} quasi-constant en toute condition. La DmO₂ est déterminée par la densité et le flux de GR lors de la réponse aigüe et peut être améliorée en augmentant le nombre de capillaires lors de l'entraînement musculaire. **En parallèle de l'élévation de la diffusion de l'O₂, une élévation du débit d'apport d'O₂ est nécessaire et les capillaires jouent également un rôle déterminant dans ce processus.**

2.1.2 Apport de l'oxygène

Le transfert de l'oxygène de l'air ambiant jusqu'à la cellule musculaire implique une cascade d'évènements au travers des systèmes pulmonaires, vasculaires et musculaires. Au sein de cette cascade, **les capillaires sanguins musculaires permettent le maintien de l'adéquation entre apports et besoins en oxygène musculaires.** Au vu des réserves extrêmement faibles d'O₂ au niveau musculaire (Hirai, Colburn, et al., 2019), une augmentation de la consommation d'oxygène musculaire (V'O_{2m}) doit s'accompagner d'une élévation rapide et de proportion équivalente du débit d'apport d'oxygène musculaire (Q'O_{2m}). Si dans une situation pathologique particulière un découplage entre la V'O_{2m} et le Q'O_{2m} apparaît, on assiste alors à une chute importante de la pression partielle en O₂ au niveau microvasculaire musculaire (Richardson et al., 1995), réduisant le gradient ΔPO_{2mv-is} , déterminant de la V'O_{2m} (Équation 1). Lors d'exercices physiques, qu'ils soient légers ou maximaux, il a été montré que la cinétique d'augmentation du débit d'apport d'O₂ était, *a minima*, aussi rapide que la cinétique du débit de consommation d'O₂ musculaire, en condition physiologique (Murrant & Sarelius, 2015). Cette prouesse d'adaptation est rendue possible par une réactivité quasi-instantanée (<1seconde) des mécanismes de vasodilatation des vaisseaux sanguins musculaires.

Bien que les artérioles soient le plus souvent incriminées dans cette réponse, de nombreuses études montrent l'incapacité des artérioles à percevoir si rapidement une modification des besoins en O₂ du tissu musculaire (Murrant et al., 2017). En effet, des études

sur l'architecture des vaisseaux sanguins musculaires proposent des distances allant de 100 μm à 270 μm entre les artérioles les plus distales (4A) et les fibres musculaires. L'effet vasodilatateur de l'élévation de l'activité musculaire a été attribué à la diffusion de produits de l'hydrolyse de l'adénosine triphosphate (ATP) : ions hydrogènes (H^+), adénosine diphosphate (ADP) ou phosphate inorganique (Pi) ; ou de sa resynthèse : adénosine, ainsi que de ceux témoignant d'une activation musculaire : ions potassium (K^+) ou monoxyde d'azote (NO) ; tous ayant un effet vasoactif. Néanmoins, la diffusion de ces produits sur une distance de 100 μm ou plus nécessite un temps d'au moins 5 secondes (Équation 2, Murrant et al., 2017), incompatible avec la réponse vasodilatatrice de l'ordre de 1 seconde précédemment observée.

Équation 2. Calcul du temps de diffusion d'une molécule de petite taille. t = temps en secondes ; L = distance de diffusion (en cm) ; D = coefficient de diffusion (10^{-5} pour les molécules de petite taille).

$$t = \frac{L^2}{2D}$$

Ainsi, il est peu crédible que les artérioles terminales jouent le rôle de senseur de l'activité musculaire et donc des besoins en O_2 . **D'autres voies ont donc été proposées avec parmi elles la contribution des capillaires sanguins musculaires.**

Il a été démontré que les produits de la contraction musculaire tels que les ions K^+ , H^+ ou l'adénosine induisent une réponse de la part des cellules endothéliales des capillaires sanguins (Song & Tyml, 1993). Cette réponse est associée à une élévation du flux sanguin capillaire, due à une vasodilatation des artérioles terminales 4A en amont. Ainsi, les capillaires sanguins musculaires agissent en tant que senseurs de l'activité contractile musculaire et transmettent cette information aux artérioles en amont pour garantir l'adéquation entre apports et besoins en O_2 . Cette transmission est assurée essentiellement par l'activation de canaux potassiques ATP-dépendants (K_{ATP}) et par le relargage de NO au niveau capillaire (Cohen & Sarelius, 2002). La présence de jonctions communicantes entre les cellules endothéliales capillaires permet une transmission du signal de cellule en cellule du niveau capillaire au niveau artériolaire (Cohen et al., 2000). L'adénosine quant à elle induit une réponse vasodilatatrice au niveau capillaire mais ne semble pas être impliquée dans la transmission du signal en amont (Cohen & Sarelius, 2002). Le rôle de cellules périvasculaires capillaires, appelés péricytes, dans une

vasodilatation qui prendrait directement place au niveau capillaire, et non par transmission aux artérioles en amont, suscite un intérêt grandissant au niveau cérébral, cardiaque et musculaire (Attrill et al., 2019; Hall et al., 2014; Kisler et al., 2017; O'Farrel et al., 2018). Il a notamment été montré que l'ajout d'adénosine induit une vasodilatation active du capillaire par les péricytes augmentant ainsi le flux sanguin capillaire directement. Le rôle vasoactif des péricytes et leur contribution dans la régulation du flux sanguin capillaire, notamment musculaire, sera développé dans le point 3.2.3.

Les différents éléments évoqués précédemment prèchent en faveur d'une régulation « bottom-up » du débit d'apport d'O₂ musculaire, avec une contribution majeure des capillaires sanguins comme senseurs locaux de l'activité musculaire, point de départ du signal de vasodilatation musculaire.

2.1.3 *Conséquences d'une dysfonction de la microcirculation musculaire*

En condition physiologique, la V'O₂ est déterminée par la capacité d'approvisionnement du myocyte en O₂ plutôt que par la capacité des mitochondries myocytaires à utiliser cet O₂ (Richardson et al., 1995). Nous avons développé précédemment l'idée que le parcours de l'O₂ au travers de la « région sans transporteurs » représente l'étape limitante de l'apport d'O₂ au myocyte (Richardson et al., 1995). Or, en l'absence de transporteurs de l'O₂, cette étape est exclusivement dépendante des capacités de diffusion de l'O₂. De nombreuses études démontrent le rôle clef de la surface de diffusion dans la DmO₂ et font le lien entre le nombre de capillaires musculaires et la surface de diffusion (Hepple et al., 2017).

Ainsi, **une raréfaction du lit capillaire musculaire aura pour conséquence une réduction de la DmO₂ et une baisse drastique de la V'O_{2m}**. Le lien entre densité du lit capillaire musculaire et V'O₂ a été maintes fois mis en évidence (Sové et al., 2017). D'autre part, le lien entre V'O₂ et tolérance à l'effort chez le sujet sain comme chez le sujet malade n'est plus à démontrer (Burnley & Jones, 2007). La V'O₂ lors d'un exercice physique présente d'autre part une valeur pronostic dans un certain nombre de pathologies dont plusieurs cardiopathies (Stelken et al., 1996). Ces éléments nous montrent d'importantes répercussions liées à la réduction de la diffusion de l'O₂, consécutive d'une raréfaction capillaire. D'autre part, nous avons développé

au point précédent le rôle clef des capillaires sanguins dans l'hyperémie en réponse à une contraction musculaire. Cette hyperémie est à l'origine de l'augmentation du flux de GR et permet également une amélioration consécutive de l'apport et de la diffusion de l'oxygène. Avec l'avancée en âge, il a été montré que la réponse hyperémique induite par le signal « bottom-up » capillaire tendait à perdre de son efficacité (Bradley J. Behnke & Delp, 2010). Cette perte d'efficacité va mener à un découplage entre les besoins et les apports d'O₂ au niveau musculaire.

Au-delà de l'oxygénation musculaire, la capacité d'hyperémie musculaire est déterminante dans la répartition du flux sanguin systémique et ainsi dans la régulation des résistances vasculaires périphériques. Une dysfonction du signal de vasodilatation capillaire peut mener à une constriction des artéioles résistives, principal siège des résistances périphériques et donc à une élévation de la pression artérielle (Zheng & Liu, 2015). D'autre part, la ramification microvasculaire est le lieu où l'on assiste à la plus importante perte de pression sanguine, permise grâce à la dissipation des forces à travers les multiples racines de l'arbre vasculaire (Humar et al., 2009a). **Ainsi, une réduction du réseau capillaire, suite à une pathologie ou un traitement pharmacologique, induit une élévation de la pression artérielle dans des proportions souvent pathologiques** (Motzer et al., 2007). L'hypertension générée comme effet secondaire des traitements anti-angiogéniques (induisant une raréfaction capillaire) nous renseigne sur une relation causale directe entre densité capillaire et pression artérielle (Neeltje Steeghs et al., 2008). Renforçant cet argument, une discontinuité dans le traitement induit le rétablissement d'une capillarisation normale et de ce fait une normalisation de la pression artérielle (N. Steeghs et al., 2009).

Dans le cadre d'une pathologie chronique, des éléments tels que l'élévation de l'inflammation et du stress oxydant sont à même d'induire une dysfonction et une raréfaction du réseau microvasculaire musculaire (Hayden et al., 2010). Dans la BPCO, il est fréquemment retrouvé une intolérance à l'effort ainsi que des phénomènes d'hypertension. En particulier, des troubles de l'apport et de la diffusion de l'O₂ ont récemment été mis en évidence chez ces patients ce qui, au vu des éléments énoncés ci-dessus, nous oriente vers la question des troubles de la capillarisation musculaire du patients BPCO.

2.1.4 *La raréfaction capillaire musculaire dans la BPCO*

Dans le muscle des patients BPCO, une réduction du nombre de capillaires par fibre musculaire a été retrouvée lors de plusieurs études (Eliason et al., 2010; Gouzi et al., 2013). Le nombre de capillaires rapporté à la surface de fibre a également été trouvé abaissé chez ces patients (Eliason et al., 2010; Jatta et al., 2009; Jobin et al., 1998). Nous avons vu précédemment que la DmO_2 , déterminée par la surface d'interface GR-Sarcolemme disponible pour les échanges, représente le principal facteur limitant l'apport d' O_2 musculaire. Ainsi, de nouveaux indices d'évaluation de la capillarisation ont émergé comme l'indice de périmètre d'échange capillaire/fibre (CFPE). Cet indice est calculé en rapportant la capillarisation d'une fibre musculaire à son périmètre, permettant d'apprécier la surface d'échange disponible (Hepple & Mathieu-Costello, 2001). Cet indice CFPE a également été trouvé réduit chez les patients BPCO comparé à des sujets sains contrôles (Eliason et al., 2010). Un changement de typologie musculaire au détriment des fibres de type I est fréquemment retrouvé chez les patients BPCO (Jaitovich & Barreiro, 2018). Les fibres de type I étant naturellement plus vascularisées que les fibres de type IIa et IIx, la question d'une réduction de la capillarisation musculaire consécutive d'un shift typologique a rapidement émergé. Plusieurs études ont ainsi étudié la capillarisation musculaire de patients BPCO en faisant la distinction entre les différents types de fibres. Le ratio capillaire/fibre tout comme la densité capillaire ou l'indice CFPE des fibres de type I ont été trouvés réduits chez les patients BPCO (Eliason et al., 2010; Whittom et al., 1998). Les patients BPCO présentent donc une réduction de la capillarisation musculaire indépendamment des changements typologiques pouvant limiter l'apport d' O_2 musculaire. Ce dernier étant le facteur limitant de la $V'O_{2m}$ (Richardson et al., 1995), il existe une corrélation entre **les défauts de capillarisation musculaires et une $V'O_2$ altérée chez les patients BPCO** (Gouzi et al., 2013). Chez ces patients, l'intolérance à l'effort, évaluée par la distance de marche parcourue en 6 minutes (TDM6), a également été liée aux altérations de l'indice CFPE (Eliason et al., 2010).

L'homogénéité des atteintes capillaires en fonction de la sévérité de la BPCO et de la nature de ses répercussions systémiques a été discutée. En effet, deux études se sont intéressées à la distribution des défauts de capillarisation musculaires au travers des 4 classes de sévérité de BPCO GOLD (Eliason et al., 2010; Jatta et al., 2009). Elles ont observé une altération de la

capillarisation chez les patients BPCO de sévérité GOLD 2 & 3 mais pas GOLD 1, comparé à des sujets sains contrôles. Etonnamment, la capillarisation musculaire a été retrouvée plus importante chez les patients BPCO hypoxémiques comparé à des patients non-hypoxémiques (Costes et al., 2015). L'hypoxie étant un puissant stimulant de l'angiogenèse, il est possible qu'une réponse compensatrice se mette en place chez ces patients pour palier au manque d'oxygénation sanguine. Cette idée est renforcée par l'impossibilité chez ces patients d'augmenter cette capillarisation au-delà de la valeur de base sous l'effet de l'entraînement, contrairement aux patients normoxémiques (Costes et al., 2015).

La relation entre caractéristiques musculaires et capillarisation a également été explorée chez les patients BPCO. Chez les patients BPCO sujets à une fatigue musculaire anormale (chute de plus de 15% de la force maximale après 10 minutes d'exercice), la capillarisation musculaire des fibres I et IIa est abaissée comparé aux patients ne présentant pas cette fatigue musculaire (Saey et al., 2005a). Ainsi, le défaut d'apport d'O₂ musculaire par défaut de capillarisation engendre une fatigue musculaire précoce chez les patients BPCO, ce qui implique des répercussions cliniques majeures avec une origine locale de l'intolérance à l'effort. A l'inverse, la capillarisation chez des patients BPCO cachectiques ne diffère pas de celle de patients présentant une masse musculaire préservée (Vogiatis et al., 2010). Ainsi, les défauts de capillarisation musculaire chez les patients BPCO semblent être associés préférentiellement à des pertes de fonction plutôt que de masse musculaire.

Dans cette partie nous avons vu que les patients BPCO présentent une altération d'un certain nombre d'indices de capillarisation musculaire, associée à une diminution de la tolérance à l'effort, de la V'O₂ et à une plus grande fatigabilité musculaire.

L'augmentation de la capillarisation musculaire, *via* un processus d'angiogenèse chez le patients BPCO apparait ainsi comme un important challenge dans la prise en charge de cette maladie. Nous nous attacherons donc à décrire dans le point suivant comment le réentraînement à l'effort induit une angiogenèse au niveau musculaire et en quoi ce processus est altéré chez le patient BPCO.

2.2 L'angiogenèse induite par le réentraînement à l'effort

2.2.1 Définition de l'angiogenèse

Le terme angiogenèse est utilisé pour définir l'expansion du réseau vasculaire par la création de nouveaux capillaires sanguins à partir du réseau existant. On la différencie d'autres processus participant au développement de ce réseau tels que la vasculogenèse, qui correspond à la différenciation d'angioblastes en cellules endothéliales s'assemblant ensuite en vaisseaux qui se spécifient, en fonction des signaux cellulaires, en veines ou en artères. Alors que la vasculogenèse est un processus le plus souvent limité à la phase de développement embryonnaire, l'angiogenèse peut avoir lieu dans des tissus adultes en réponse à des stimuli physiologiques ou pathologiques. L'angiogenèse s'effectue principalement par deux processus distincts : l'angiogenèse par bourgeonnement et par invagination. L'angiogenèse par bourgeonnement s'effectue *via* la création d'un bourgeon vasculaire menant à la genèse d'un nouveau capillaire alors que celle par invagination se base sur la séparation d'un capillaire existant en deux par formation d'un pilier intraluminal. **Bien que ces deux types d'angiogenèse cohabitent au niveau musculaire, celle par bourgeonnement semble prédominer (Egginton et al., 2001) et sera donc majoritairement traitée durant la suite de ces travaux.** De plus, l'inhibition seule de l'angiogenèse par bourgeonnement menant à une abolition des gains de capillarisation en réponse au réentraînement (Olfert et al., 2010a), cette modalité d'angiogenèse nous est apparue comme la plus probable déterminante des phénomènes d'angiogenèse musculaire émoussés.

L'exercice physique répété engendre un certain nombre de stimuli, que nous détaillerons ultérieurement, permettant de stimuler l'angiogenèse au niveau du muscle strié squelettique (Egginton et al., 2001). **L'intégration des stimuli pro- et anti-angiogéniques au niveau du tissu et notamment la balance entre facteurs pro- et anti-angiogéniques va déterminer la présence, l'intensité et la viabilité du processus d'angiogenèse musculaire en réponse au réentraînement à l'effort.** Cette réponse apparaît comme étant une réponse savamment orchestrée, respectant un déroulement à la fois complexe et précis.

2.2.2 *Le déroulement de l'angiogenèse en réponse au réentraînement à l'effort*

A l'état de base, il existe une quiescence des cellules qui constituent la paroi capillaire, c'est-à-dire les cellules endothéliales et péricytaires. Cette quiescence permet de préserver les vaisseaux contre une déstabilisation, les fragilisant, ainsi que contre une création de vaisseaux qui serait en inadéquation avec les besoins physiologiques. Cette quiescence est assurée par le contact entre cellules endothéliales et péricytes et par l'expression de facteurs de signalisation spécifiques. En cas de raréfaction de l'apport d'O₂ (hypoxie) ou d'augmentation de la demande métabolique, l'extension du réseau capillaire en réponse au besoin physiologique est requise. C'est le cas notamment au cours du réentraînement à l'effort : l'augmentation de la demande va déstabiliser le capillaire et le processus d'angiogenèse va se produire au travers de deux étapes principales.

La première étape est une étape de bourgeonnement capillaire. Elle correspond à l'activation de la cellule endothéliale, à la dégradation de la membrane basale et au détachement des péricytes du capillaire. Cela permet la création d'un bourgeon vasculaire qui, grâce à une prolifération et une migration des cellules endothéliales, s'allonge pour mener à la création d'un nouveau capillaire. Cette première phase de création capillaire est stimulée lors d'exercices aigus ou d'entraînements de courtes durées. Elle perdure durant les 2 à 4 premières semaines d'un réentraînement à l'effort puis laisse progressivement place à d'autres phénomènes plus tardifs survenant lors de la seconde étape de l'angiogenèse.

La seconde étape est une étape de maturation capillaire (Haas & Nwadozi, 2015). Cette seconde étape est caractérisée par une stabilisation du capillaire nouvellement formé. Cette stabilisation s'établit par l'acquisition d'une couverture péricytaire et d'une membrane basale par ce capillaire. La maturation capillaire commence après 4 à 6 semaines de réentraînement (Haas & Nwadozi, 2015). L'initiation et l'organisation temporelle de ces différentes phases d'angiogenèse est sous le contrôle d'un certain nombre de facteurs angiogéniques décrits ci-après.

2.2.3 Les principaux facteurs pro & anti-angiogéniques

Les facteurs angiogéniques correspondent à l'ensemble des éléments, souvent des protéines, régulant la plasticité du lit capillaire. Le nombre de facteurs tant bien pro- qu'anti-angiogéniques identifiés est incroyablement élevé et en faire une description exhaustive serait peine perdue. Nous décrivons ici les principaux facteurs angiogéniques et tout particulièrement ceux ayant été associés à des modulations de l'angiogenèse du muscle strié squelettique sous l'effet d'un exercice aigu ou de l'entraînement à l'effort.

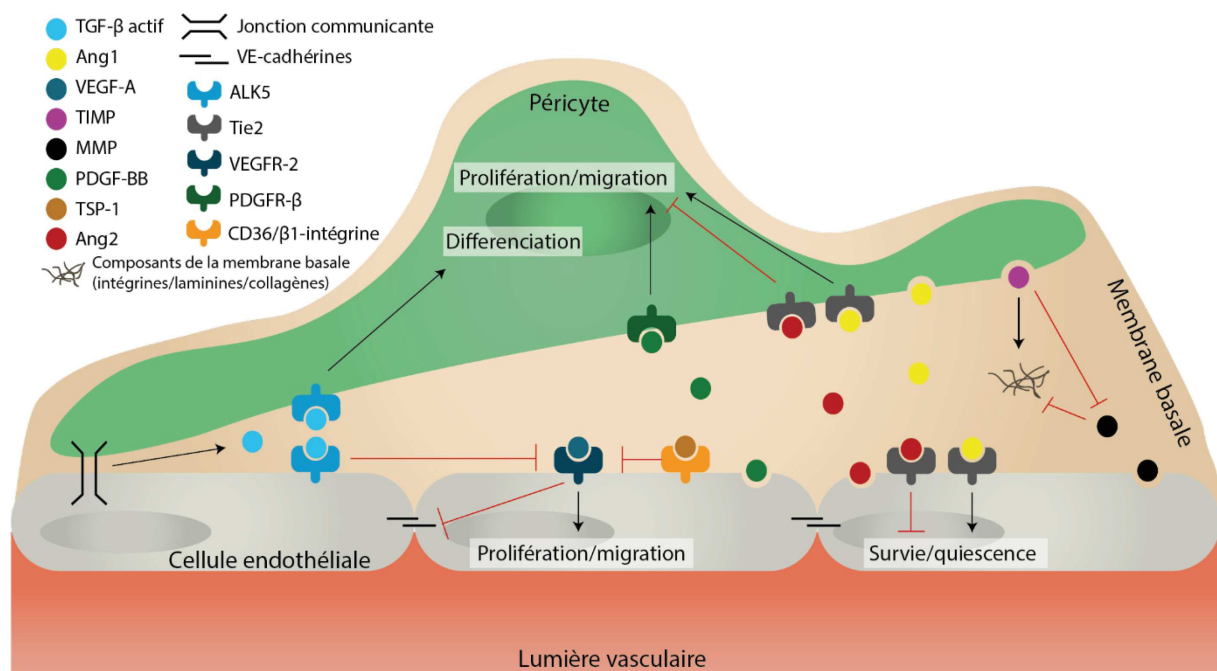


Figure 9. Actions des principaux facteurs angiogéniques au niveau des structures capillaires.

Parmi les principaux facteurs pro-angiogéniques, le facteur de croissance vasculaire endothélial A (VEGF-A) est un des premiers facteurs historiquement identifiés et sans doute le plus étudié. Toutes les isoformes de VEGF-A sont capables de se lier au récepteur à tyrosine kinase VEGF-2 (VEGFR2 ou Flk1) qui assure une grande partie de l'activité pro-angiogénique du VEGF-A (Carmeliet & Jain, 2011b). La liaison du VEGF-A au VEGFR2 engendre la phosphorylation et la dimérisation de ce dernier résultant en une cascade d'effets intracellulaires. Parmi eux, on retrouve une activation des voies impliquant la kinase phosphatidylinositol 3 (PI3K), la phospholipase C γ (PLC-γ) et la protéine kinase C (PKC) (Wu et

al., 2000). L'activation de ces voies va permettre au VEGF-A d'assurer ses fonctions biologiques sur la cellule endothéliale. Durant l'angiogenèse, le VEGF-A va engendrer une forte activité mitotique au niveau endothélial mais également promouvoir la survie des cellules endothéliales, limitant la régression des néovaisseaux (Hoier & Hellsten, 2014). Bien qu'étant un puissant stimulus de l'angiogenèse, le VEGF-A est loin d'être le seul facteur impliqué dans ce processus et la surexpression du VEGF-A uniquement ne permet pas l'obtention de néovaisseaux viables et fonctionnels (Ash & Overbeek, 2000).

Un système constitué du récepteur à tyrosine kinase Tie2 et de ses deux ligands que sont les angiopoïétines 1 et 2 (Ang1 et Ang2) joue également un rôle clef dans l'angiogenèse. Le système Ang/Tie2 joue un rôle majeur dans la régulation de la quiescence endothéliale et de la maturation capillaire (Suri et al., 1998). Les actions d'Ang1 et Ang2 au niveau de Tie2 sont antagonistes, l'Ang1 promouvant la phosphorylation de Tie2 alors que l'Ang2 va en empêcher l'activation. Par cette voie l'Ang1 va promouvoir la survie endothéliale, en activant la voie PI3K/PKB, et limiter la perméabilité vasculaire en empêchant l'internalisation des jonctions cadhérines endothéliales vasculaires (VE-cadhérines)(Augustin et al., 2009). Il va également promouvoir les interactions péricyte/endothélium, bien que les mécanismes à l'origine du lien entre Tie2 et recrutement capillaire soient encore mal compris (Augustin et al., 2009). La présence de récepteurs Tie2 sur les péricytes, promouvant la survie péricytaire, a récemment été démontrée et pourrait jouer un rôle dans ce lien (Teichert et al., 2017a). L'Ang2 est majoritairement sécrétée par la cellule endothéliale par exocytose des corps de Weibel-Palade. Par son action antagoniste d'Ang1, l'Ang2 induit un détachement des péricytes tout comme une déstabilisation et une perméabilisation vasculaire (Teichert et al., 2017a). Cette déstabilisation est nécessaire à la prolifération vasculaire et au bourgeonnement capillaire. En l'absence de VEGF-A et de prolifération endothéliale, il a cependant été montré que l'Ang2 induit une apoptose endothéliale et une régression vasculaire (Maisonpierre et al., 1997).

Pour permettre un bourgeonnement sur la face externe (adluminale) du capillaire, une ouverture dans la membrane basale doit être réalisée. Cette membrane basale est constituée de collagène, laminines et intégrines et peut être dégradée par les métalloprotéases de la matrice (MMP). La famille des MMPs est très large, cependant les MMP-2, 9 et 14 sont habituellement étudiées et sont sur-exprimées lors d'un processus d'angiogenèse (Brew & Nagase, 2010).

La relation entre cellules endothéliales et péricytes est cruciale durant l'angiogenèse. Le facteur de croissance dérivé des plaquettes BB (PDGF-BB) ainsi que le facteur de croissance transformant bêta (TGF- β) jouent respectivement un rôle clef dans le recrutement et la différenciation des précurseurs péricytaires (i.e. cellules souches mésenchymateuses). Le PDGF-BB est une protéine sécrétée entre autres par les cellules endothéliales (Hellström et al., 2001). Le PDGF-BB se fixe sur les péricytes et leurs précurseurs *via* le récepteur à tyrosine kinase PDGFR- β et induit leur prolifération et leur migration (Carmeliet & Jain, 2011c). Une répression de l'expression de PDGF-BB engendre une forte réduction de la couverture péricytaire et la formation de fuites capillaires (Lindahl et al., 1997). De son côté, le TGF- β est produit lors du contact qui s'établit entre les cellules endothéliales et les précurseurs péricytaires. En effet, si ces deux types cellulaires sont capables de produire une forme latente de TGF- β , seul le contact entre ces deux cellules *via* des jonctions communicantes (« Gap junctions »), va permettre la production d'une forme active de TGF- β (Hirschi et al., 2003). Une fois produite, cette forme active se lie entre autres aux récepteurs « activin receptor-like kinase 5 » (ALK5), présents à la fois sur les précurseurs péricytaires et sur les cellules endothéliales. Au niveau des précurseurs péricytaires, la liaison TGF- β /ALK5 induit une surexpression des protéines Smad 2 et 3 qui engendrent la différenciation de ces cellules en péricytes (Lebrin et al., 2005). Au niveau endothélial, la liaison TGF- β /ALK5 limite la prolifération endothéliale ainsi que l'internalisation des VE-cadhérines en antagonisant l'action du VEGF-A sur le VEGFR2.

Parallèlement aux facteurs pro-angiogéniques, l'angiogenèse dépend aussi des facteurs angiostatiques ou anti-angiogéniques. La balance entre facteurs pro- et anti-angiogéniques apparait comme l'élément central de la régulation de l'angiogenèse (Olfert & Birot, 2011).

Le plus cité et le plus étudié des angiostatiques est sûrement la thrombospondine 1 (TSP1). Cette glycoprotéine est produite dans un contexte d'angiogenèse majoritairement par les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses. La thrombospondine se lie préférentiellement aux récepteurs CD36 et β 1-intégrines qui ont la capacité de former un complexe avec le VEGFR2, inhibant l'action proliférative et pro-migration du VEGF-A sur la cellule endothéliale. Du fait de ce rôle inhibiteur du VEGF-A, l'expression de TSP-1 durant le bourgeonnement va engendrer un découplage des expressions de VEGF-A et Ang2, menant à l'apoptose endothéliale et à la régression vasculaire. Au contraire, son expression durant la

maturation capillaire, quand l'expression d'Ang1 est augmentée, va potentialiser l'action du PDGF BB et favoriser la couverture péricytaire (Scheef et al., 2009).

Parmi les angiostatiques habituellement décrits, on retrouve également les inhibiteurs des MMP (TIMP). En inhibant l'action protéolytique des MMP, les TIMP empêchent la formation de brèches dans la membrane basale et la migration des cellules endothéliales sur la face adluminale des capillaires. Différentes isoformes de ces protéines existent et présentent des capacités d'inhibition différentes. En effet, alors que TIMP-1 inhibe un spectre assez réduit de MMPs (MMP-14, MMP-16 ...) les TIMPS 2 et 3 ont une action plus large. De plus, TIMP-3 inhibe également l'action du VEGF-A en se liant directement au récepteur VEGFR2. Si les TIMP empêchent le bourgeonnement vasculaire, leur expression est cependant cruciale une fois le néovaisseau créé pour le stabiliser et empêcher la dégradation de sa membrane basale nouvellement formée.

Un grand nombre d'autres facteurs angiostatiques sont impliqués dans les phénomènes d'angiogenèse et sont résumés dans la revue de Olfert & Birot (2011).

La description des facteurs pro- et anti-angiogéniques telle qu'habituellement présentée soulève une question de fond. En effet, puisque la plupart des facteurs angiostatiques ont un rôle déterminant dans la phase de maturation capillaire, une étape clé de l'angiogenèse, leur action apparaît pro-angiogénique en un sens. Inversement, les facteurs présentés comme pro-angiogéniques sont en réalité des stimulants de la phase précoce d'angiogenèse (Ang2, VEGF ...), de déstabilisation et de bourgeonnement vasculaire mais ont en revanche une action délétère sur l'angiogenèse, en particulier s'ils sont exprimés trop longtemps, engendrant régression et immaturité vasculaire (Greenberg et al., 2008; Maisonpierre et al., 1997). Font exception à cette règle l'Ang1, le PDGF-BB et le TGF- β qui sont classés dans les facteurs pro-angiogéniques mais paradoxalement ont un effet angiostatique sur la phase de bourgeonnement vasculaire. **A l'issue de cette analyse bibliographique nous proposons donc ici de considérer la balance entre facteurs angiogéniques pro-bourgeonnement et pro-maturation.** Ainsi, le VEGF-A, l'Ang2 et les MMPs apparaissent comme des facteurs pro-bourgeonnement alors que les facteurs tels que l'Ang1, le PDGF-BB, le TGF- β , le TSP1 ou encore les TIMP apparaissent comme des facteurs pro-maturation. Cette balance qui va donc pencher en faveur du bourgeonnement en début d'angiogenèse s'inversera au cours du

processus pour pencher en faveur de la maturation en fin d'angiogenèse. Nous verrons dans le point suivant l'orchestration de ces facteurs au cours du processus d'angiogenèse induit par le réentraînement à l'effort.

2.2.4 Orchestration de la réponse des facteurs angiogéniques durant le processus d'angiogenèse musculaire

Le processus d'angiogenèse musculaire induit par l'exercice est le résultat de deux phases temporelles distinctes, une phase précoce de création des néovaisseaux et une phase plus tardive de maturation nécessitant une sécrétion orchestrée de facteurs angiogéniques.

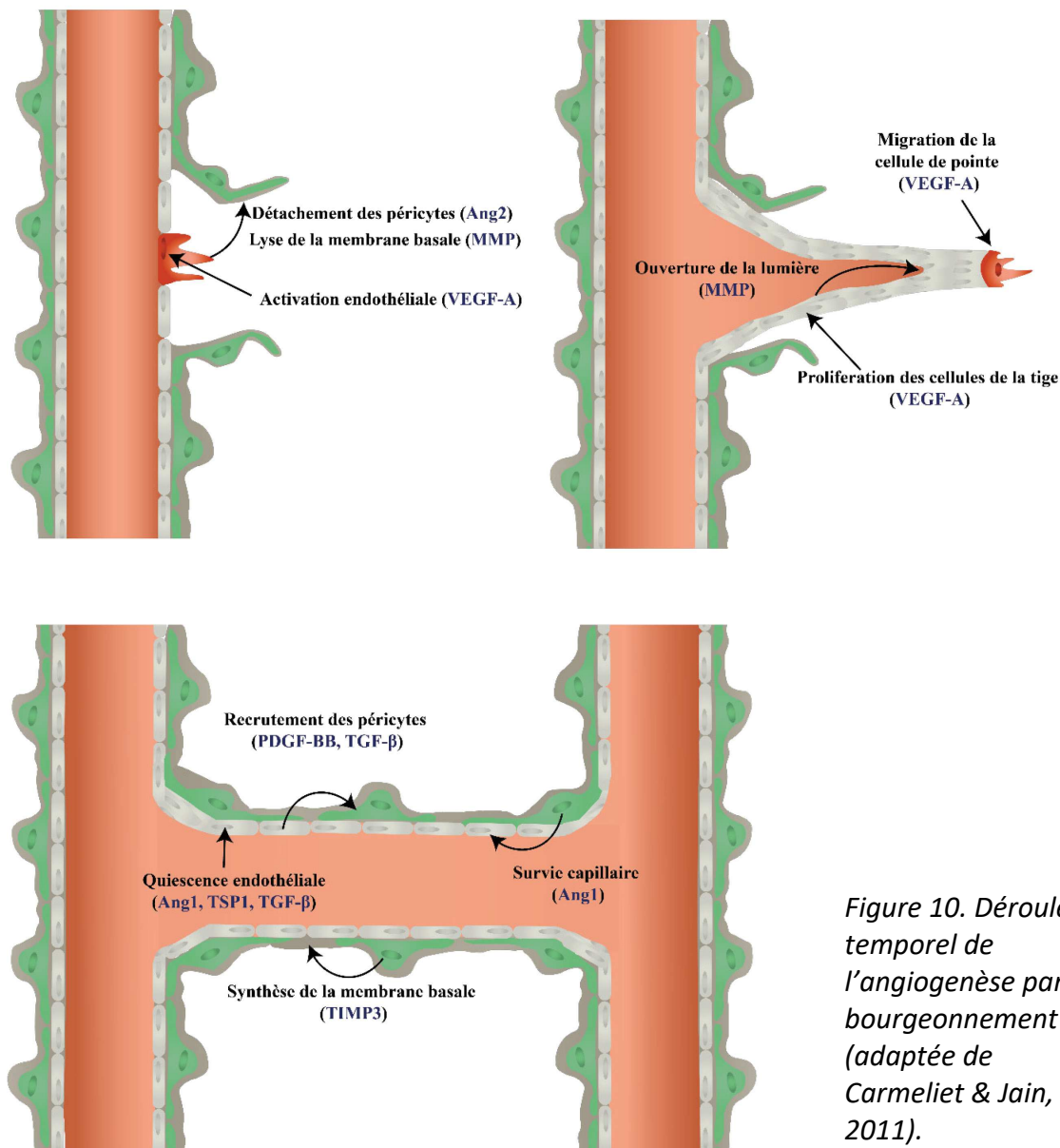


Figure 10. Déroulé temporel de l'angiogenèse par bourgeonnement (adaptée de Carmeliet & Jain, 2011).

Durant la phase de création, une élévation du niveau basal de VEGF-A musculaire a été documentée après 10 jours d'entraînement, tout comme l'expression de son récepteur VEGFR2 (Gustafsson et al., 2007). Les niveaux d'expression de l'Ang2 suivent la même tendance que le VEGF-A (Gustafsson et al., 2007). L'Ang2 induit un détachement des péricytes et va ainsi provoquer une perte du contact hétérotypique entre cellules endothéliales et péricytes (Teichert et al., 2017b). Ce contact étant requis pour l'activation de TGF- β , l'inhibition de VEGFR2 par le TGF- β est levée et permet au VEGF-A d'induire son action mitogénique et pro-migratoire sur les cellules endothéliales. Le bourgeonnement vasculaire commence par la sélection d'une cellule de pointe qui va être activée et guidée par le VEGF-A (Carmeliet & Jain, 2011c). Pour éviter l'activation de plusieurs cellules de pointes (« tip cells »), une signalisation NOTCH-dépendante va inhiber la voie VEGF-A/VEGFR2 des cellules voisines (Carmeliet & Jain, 2011c). Le bourgeonnement, pour s'étendre sur la face capillaire adluminale, doit se frayer un chemin au travers de la membrane basale capillaire. Après 7 à 10 jours d'entraînement, une surexpression des MMPs a été rapportée (Haas et al., 2000; Ispanovic & Haas, 2006; Rullman et al., 2009). Cette surexpression des MMPs induit une lyse de la membrane basale et la création d'une brèche au travers de laquelle le bourgeon de cellules endothéliales migre (cellules de la pointe) et prolifère (cellules de la tige) sous l'action du VEGF-A. De plus, les MMPs, notamment MT1-MMP, vont jouer un rôle clef dans l'ouverture de la lumière vasculaire dans ce bourgeon (Stratman et al., 2009). Une fois le bourgeon connecté avec un autre segment vasculaire et la lumière créée, la croissance du bourgeon est stoppée et la maturation du tube vasculaire commence.

La phase tardive de stabilisation vasculaire est favorisée par un retour au niveau pré-entraînement de l'expression d'un certain nombre de facteurs pro-bourgeonnement dont le VEGF-A et l'Ang2 après 4 à 6 semaines de réentraînement (Hoier et al., 2012; Lundby et al., 2006; Olenich et al., 2013; Richardson et al., 2000). De la même façon, l'activité des MMPs, accrue après 10 jours d'entraînement, ne l'est plus après 5 semaines (Timmons et al., 2005b). A l'inverse, on observe après 6 semaines d'entraînement une élévation des niveaux basaux de TSP-1 (Timmons et al., 2005a). Au niveau de l'ultrastructure capillaire, alors que des bourgeons sont visibles après quelques jours de stimulation musculaire (Egginton et al., 2001; Hansen-Smith et al., 1996) leur nombre n'apparaît plus augmenté après 8 semaines de

réentraînement (Baum et al., 2015). Au contraire, la couverture péricytaire est quant à elle augmentée après ces 8 semaines (Baum et al., 2015). Le recrutement des péricytes au niveau du néovaisseau est sûrement l'élément le plus notable de la phase de maturation et de stabilisation vasculaire (Jain, 2003). L'augmentation de la couverture péricytaire va favoriser l'activation du TGF- β , du fait de contacts hétérotypiques entre cellules endothéliales et péricytes ainsi que l'expression de l'Ang1, produite par les péricytes. De manière cohérente, après 6 semaines d'entraînement, les niveaux basaux d'Ang1 et de TGF- β ont été retrouvés augmentés (Timmons et al., 2005a). Le TGF- β va réduire l'effet mitogénique du VEGF-A et l'endocytose des jonctions VE-cadhérine alors que l'Ang1 va assurer la survie des cellules endothéliales compensant la réduction du signal VEGF-A. L'accroissement de la couverture péricytaire va de plus jouer un rôle clef dans la formation de la membrane basale, stabilisant le néovaisseau (Stratman et al., 2009). Une absence de couverture péricytaire à ce stade va au contraire engendrer une prolifération aberrante des cellules endothéliales et un accroissement de la perméabilité vasculaire, menant à une vascularisation anormale qui s'accompagne d'une apoptose endothéliale et d'une régression capillaire (Hellström et al., 2001).

2.2.5 *Les défauts de l'angiogenèse musculaire induite par le réentraînement dans la BPCO et leurs conséquences*

Les stimuli pro-angiogéniques que nous venons d'énoncer sont des processus précis et pouvant être perturbés par des atteintes extérieures. Ainsi, la présence d'une maladie chronique ou aiguë sous-jacente est de nature à perturber l'angiogenèse musculaire. En effet, le diabète ou l'AOMI affectent quantitativement l'angiogenèse induite par l'entraînement.

La BPCO ne fait pas exception à cette règle. En effet, plusieurs études non contrôlées n'ont pas observé d'amélioration du réseau capillaire chez les patients BPCO en réponse au réentraînement (Costes et al., 2015; Iepsen et al., 2016a; Whittom et al., 1998). Cette absence de réponse a été observée malgré le test de plusieurs modalités de réentraînement, en résistance ou en endurance durant 8 semaines (Iepsen et al., 2016a), ou le prolongement du réentraînement en endurance jusqu'à 10 semaines (Whittom et al., 1998). De manière intéressante, le statut hypoxémique ou non des patients BPCO semble être un déterminant

de la réponse angiogénique. En effet, après 2 mois de réentraînement à l'effort à une intensité modérée, seuls les patients BPCO non-hypoxémiques présentaient une augmentation de la capillarisation musculaire. Une partie de la réponse angiogénique à l'entraînement est médiée par l'activation hypoxie-dépendante de la voie du facteur hypoxique inductible 1 (HIF1). En cas d'hypoxie chronique, un effet contraire est observé avec une réduction de la production de facteurs pro-angiogéniques et de la prolifération des cellules endothéliales (Olszewska-Pazdrak et al., 2009). Ainsi, si l'hypoxie aiguë est pro-angiogénique, l'hypoxie chronique chez les patients BPCO hypoxémiques pourrait limiter l'angiogenèse induite par le réentraînement. Cependant, dans l'étude de Costes *et al.* (Costes et al., 2015), les patients hypoxémiques et non-hypoxémiques n'étaient pas appariés sur la sévérité, appariement très délicat à réaliser dans ce contexte, avec des patients hypoxémiques plus sévères. Ainsi, les disparités de réponse chez les patients BPCO pourraient être expliquées par la sévérité de la maladie.

Peu d'études contrôlées ont comparé la réponse angiogénique musculaire des patients BPCO à celle de sujets sains contrôles. Comparé à des sujets sains contrôles, il a été montré que l'expression basale de VEGF-A, Ang1 et Ang2 était réduite chez les patients BPCO, laissant suspecter une réduction du potentiel angiogénique chez ces patients (Gagnon et al., 2014). De même, **nous avons montré que la réponse angiogénique à 5-6 semaines de réentraînement à l'effort mixte à une intensité modérée chez les patients BPCO était émoussée, avec des gains deux fois inférieurs à ceux des sujets sains contrôles de même âge, sexe et niveau d'activité physique** (Gouzi et al., 2013). De manière intéressante, les gains de $V'O_2$ et d'endurance musculaire étaient également émoussés chez ces patients et corrélés aux gains de capillarisation (Gouzi et al., 2013). Ainsi, il est possible que ces gains puissent être limités par une angiogenèse défectueuse.

De la même façon, l'angiogenèse émoussée chez les patients BPCO a été associée à un défaut d'adaptation de la pression artérielle maximale d'effort (Gouzi et al., 2016a). L'hypertension artérielle d'effort est une dysfonction précoce menant, en l'absence de prise en charge, au développement de l'hypertension artérielle de repos et de son lot de conséquences cardiovasculaires (Miyai et al., 2002). Nous avons vu au point 1.7.3 que la réhabilitation ne présentait qu'un effet limité sur les atteintes vasculaires pré-cliniques et sur la prévention du risque cardiovasculaire chez les patients BPCO. Sachant que près de la moitié des patients BPCO présentent de l'hypertension artérielle de repos (Vanfleteren et al., 2013b),

la prévention de cette dernière par l'exercice lors de la réhabilitation respiratoire est importante.

Malgré un nombre limité de données, celles-ci semblent converger vers une limitation de la réponse angiogénique musculaire en réponse au réentraînement à l'effort chez les patients BPCO, avec des conséquences sur l'adaptation de la tolérance à l'effort et de la pression artérielle.

Cependant, certaines limites demeurent dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques de cette atteinte de l'angiogenèse musculaire dans la BPCO. Au vu de la complexité des phénomènes physiologiques mis en jeu, les hypothèses et les mécanismes potentiels sont nombreux. Actuellement, les études basées sur l'histo-morphologie musculaire ne permettent pas de privilégier une hypothèse. L'analyse de facteurs angiogéniques musculaires à un instant donné ne peut rendre compte de la globalité d'un phénomène dynamique et d'un déséquilibre de la réponse angio-adaptative. Dans d'autres pathologies ou conditions, les hypothèses et mécanismes défailants ont pu être précisés par l'étude du remodelage ultrastructural des capillaires sanguins musculaires et de leurs différentes composantes.

Etant donné les limites des études actuelles pour cibler des hypothèses et mécanismes physiopathologiques en cause dans le défaut d'angiogenèse dans la BPCO, une étape de description détaillée de l'angiogenèse par une approche morphologique spécifique apparaît indispensable à la compréhension de l'angiogenèse anormale chez le patient BPCO.

Résumé du chapitre 2

En régulant l'apport et la diffusion de l'oxygène mais également la redistribution des résistances vasculaires périphériques, la capillarisation musculaire joue un rôle clef dans la $\dot{V}O_2$, la tolérance à l'effort et la régulation de la pression artérielle.

Chez le patient BPCO, une raréfaction de la capillarisation musculaire a été mise en évidence et représente donc une cible dans la prise en charge des répercussions de la maladie sur le système cardiovasculaire et la tolérance à l'effort.

L'augmentation de la capillarisation musculaire se fait au travers d'un processus d'angiogenèse, qui est le fruit d'une orchestration cellulaire et moléculaire précise qui peut être stimulée par le réentraînement à l'effort. Cette angiogenèse s'établit notamment au travers de deux principales phases, une phase de création et une phase de maturation. Chez le patient BPCO, l'angiogenèse musculaire induite par le réentraînement à l'effort apparaît émoussée.

Les défauts de capillarisation et d'angiogenèse musculaire chez le patient BPCO n'ayant été décrits qu'au niveau histologique, il est difficile d'en identifier les causes et les mécanismes physiopathologiques. Une étape d'étude ultrastructurale de l'angiogenèse au cours du réentraînement apparaît indispensable pour cibler certains mécanismes et préciser les hypothèses que nous proposons dans cette thèse.

Chapitre 3. Vers une meilleure compréhension des altérations capillaires du patient BPCO

Nous avons vu au chapitre précédent l'importance de la capillarisation et de l'angiogenèse musculaire dans la régulation de la consommation d'oxygène et de la pression artérielle au niveau musculaire. Nous avons également fait le constat que ces éléments étaient altérés chez le patient BPCO mais malheureusement mal décrits. **L'étude ultrastructurale de la capillarisation musculaire est une stratégie d'analyse ayant fait ses preuves dans la mise en évidence d'éléments physiologiques ou pathologiques régulant la capillarisation musculaire et sa réponse angiogénique sous l'effet du réentraînement à l'effort.**

3.1.1 *Intérêt de l'étude ultrastructurale*

Si l'étude du nombre de capillaires sanguins et de la surface de contact entre capillaires et myocytes nous renseigne en partie sur la capacité de diffusion de l'oxygène, cette approche ne donne que des renseignements partiels. En effet, **des altérations des structures composant les capillaires sanguins peuvent également perturber l'apport ou la diffusion de l'oxygène.** Parallèlement, des défauts d'interactions cellulaires visibles seulement au niveau ultrastructural peuvent être révélateurs de capillaires dysfonctionnels ou plus prompts à régresser sous l'effet de perturbations extrinsèques.

Les capillaires sanguins se composent de quatre structures principales que sont la lumière du vaisseau, l'endothélium, la membrane basale et, incorporés dans cette membrane, les péricytes (Figure 11). Ces derniers sont des cellules périvasculaires aux nombreuses fonctions qui seront présentées en détail au point 3.2. Sous l'action d'éléments perturbateurs comme la sénescence due à l'avancée en âge, des perturbations du contrôle nerveux sympathique ou des changements dans les forces hémodynamiques et/ou dans les pressions locales en oxygène, l'intégrité fonctionnelle des capillaires peut être modifiée (Bigler et al., 2016). Parmi les modifications ultrastructurales les plus rapportées, on retrouve un épaissement du mur capillaire (endothélium + membrane basale), un rétrécissement ou une dilatation de la lumière ainsi qu'une perte d'interaction entre péricytes et endothélium. Nous avons discuté plus haut du rôle critique qu'occupe l'espace séparant le GR du sarcolemme dans la diffusion de l'O₂. Ainsi, la mise en évidence lors de l'étude ultrastructurale des capillaires d'un épaissement du mur capillaire nous renseigne sur une élévation de la distance de diffusion, au travers de la « région sans transporteurs », et donc d'une perturbation de l'apport myocytaire en O₂.

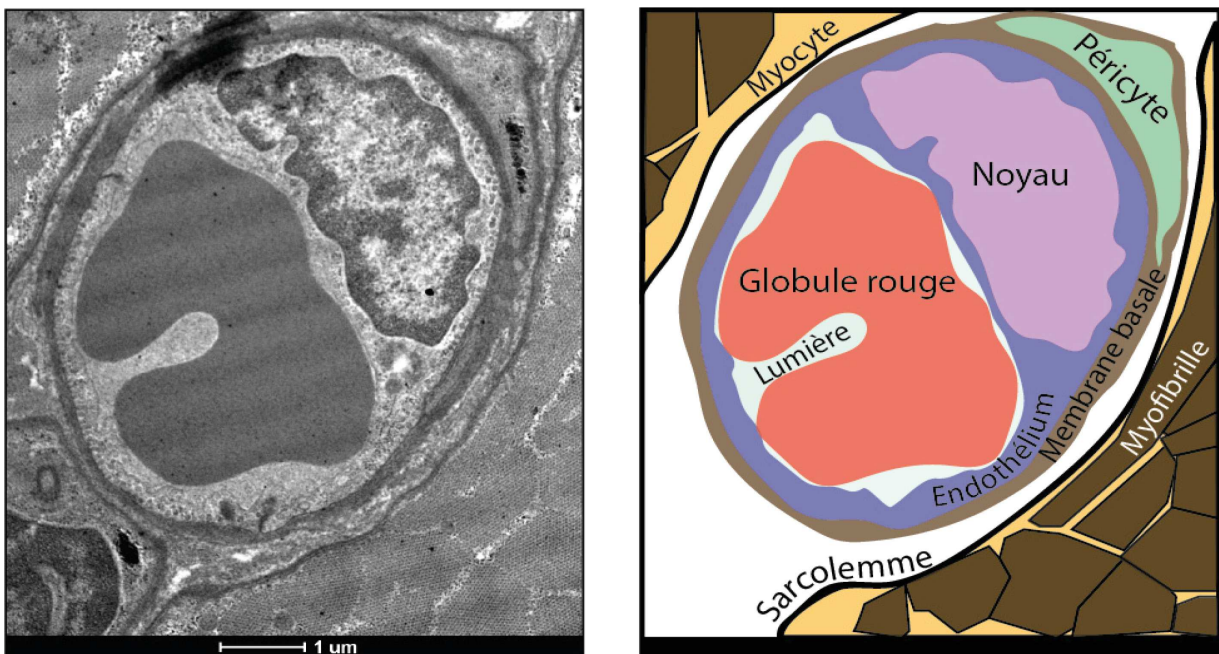


Figure 11. Ultrastructure capillaire musculaire. Gauche : Photographie d'un capillaire sanguin musculaire en microscopie électronique à transmission. Droite : Représentation schématique des différentes structures capillaires et musculaires visibles sur la photo de gauche.

En association ou non avec une raréfaction capillaire, cette information peut ouvrir une piste mécanistique quant à la compréhension d'un défaut de $V'O_2$ chez un patient. De la même façon, il est possible de lier des informations concernant le nombre de capillaire et leur ultrastructure. Par exemple, les péricytes jouent un rôle essentiel dans la stabilisation et la survie capillaire (rôle développé au point 3.2.2), limitant la régression capillaire au minimum nécessaire. Ainsi, une perte d'interaction péricyte/endothélium au niveau ultrastructural pourrait être une voie explicative d'une raréfaction capillaire, documentée lors d'une analyse plus conventionnelle de la capillarisation musculaire. La nature complémentaire et informative de l'étude ultrastructurale capillaire en fait un outil de choix pour observer plus en détail les répercussions d'un certain nombre de pathologies sur la capillarisation musculaire.

3.1.2 *Remodelage de l'ultrastructure capillaire musculaire en condition pathologique*

L'étude ultrastructurale apporte des informations précises sur le plan des atteintes capillaires en condition pathologique et peut révéler un remodelage anormal de certaines structures capillaires spécifiques à l'état de base. Ainsi, il a été démontré une augmentation du nombre de capillaires sanguins musculaires présentant une lumière collabée, en fente, dans le cadre de pathologies comme l'artériopathie oblitérante des membres inférieurs (AOMI) (Baum et al., 2016). Mais aussi, le diamètre moyen de la lumière capillaire musculaire est réduit dans l'hypertension ou dans le diabète (Gliemann et al., 2015; Kindig et al., 1998). Or, il a été montré une étroite relation entre la vitesse du flux de GR et le diamètre de la lumière capillaire (Kindig et al., 1998). Sachant que le flux de GR est un déterminant de la DmO_2 (Poole et al., 2013), cette réduction de diamètre luminal est de nature à perturber fortement l'oxygénation musculaire. De plus, ce rétrécissement engendre une augmentation des résistances microvasculaires au flux, favorisant la survenue de phénomènes d'hypertension artérielle (Kindig et al., 1998). Parmi les causes de ce rétrécissement luminal, la contribution de phénomènes tels que le gonflement de cellules endothéliales ont été avancés dans le cadre du diabète et de l'AOMI (Baum & Bigler, 2016). Ce gonflement, bien que mal compris, semblerait être lié aux phénomènes locaux d'acidose (Baum & Bigler, 2016), indiquant un cercle vicieux dans la perturbation des capacités oxydatives musculaires.

Un épaissement de la membrane basale des capillaires musculaires est également retrouvé fréquemment dans différentes maladies chroniques, telles l'AOMI, le diabète ou l'hypertension artérielle (Baum & Bigler, 2016; Gliemann et al., 2015; Kindig et al., 1998). L'épaississement de la membrane basale apparaît aussi lors de l'avancée en âge (Bigler et al., 2016). Comme indiqué précédemment, cet épaissement a pour conséquence première une réduction de la capacité de consommation de l'oxygène musculaire. D'autre part, cet accroissement de l'épaisseur de la membrane basale va engendrer une moindre compliance du mur capillaire. Ce phénomène peut être impliqué dans une perturbation de la distensibilité des vaisseaux sous l'effet de l'augmentation de la pression hémodynamique et favoriser la survenue d'hypertension artérielle (Gliemann et al., 2015). De plus, cette perte de compliance peut induire une perte de sensibilité de l'endothélium aux stimuli tels que les forces de cisaillement, connues pour stimuler l'angiogenèse (Baum & Bigler, 2016). Confortant cette idée, une réduction de l'épaisseur de la membrane basale a été retrouvée chez les personnes augmentant leur capillarisation musculaire sous l'effet de l'entraînement mais pas chez les personnes chez qui ce processus était défaillant (Baum et al., 2015). L'épaississement de la membrane basale peut se produire sous l'influence de plusieurs processus sous-jacents de pathologies chroniques. Par exemple, le stress oxydant tout comme l'hyperglycémie (dans le cadre du diabète) induisent des glycations du collagène composant la membrane basale, le rendant résistant à la protéolyse et favorisant son accumulation (Baum & Bigler, 2016). L'hypoxie quant à elle réduit la protéolyse au niveau de la membrane basale (Carmeli et al., 2004) alors que l'inflammation et le stress oxydant augmentent le débit de production de collagène (E. Di Marco et al., 2013). Enfin, durant l'exercice, le capillaire sanguin musculaire est exposé à de considérables forces hémodynamiques et **le maintien de l'intégrité capillaire est notamment assuré par la connexion mécanique entre péricytes et cellules endothéliales** *via* un système d'interdigitations. La perte de contact péricyte/endothélium pourrait engendrer une augmentation compensatoire de l'épaisseur de la membrane basale pour résister aux forces mécaniques (Bigler et al., 2016). Une perte de connexion a par ailleurs été mise en évidence dans le cadre du diabète, sous l'effet notamment du stress oxydant et de l'inflammation (Hayden et al., 2010).

Les patients BPCO présentent une élévation des niveaux musculaires d'inflammation et de stress oxydant (Montes De Oca et al., 2008), une fréquente hypoxémie ainsi qu'une altération

du réseau capillaire, présentée précédemment. Malgré cela, à notre connaissance, aucune étude n'a porté ses travaux sur l'analyse de l'ultrastructure des capillaires sanguins musculaires dans le cadre de la BPCO.

3.1.3 *Remodelage de l'ultrastructure capillaire musculaire en réponse à l'entraînement*

L'ultrastructure des capillaires sanguins musculaires peut être modifiée sous l'effet de pathologies mais également d'interventions comme le réentraînement à l'effort. L'étude ultrastructurale a entre autres permis de trouver des liens entre certaines modifications ultrastructurales et l'efficacité du processus angiogénique musculaire. En effet, si les pathologies chroniques engendrent des défauts de l'ultrastructure capillaire, le réentraînement à l'effort permet dans certains cas une correction de ces défauts. Dans le cas de l'hypertension, un réentraînement en endurance de 8 semaines à intensité modérée permet une augmentation de 15% de l'aire luminale capillaire et un affinement de 17% de la membrane basale, rétablissant ces paramètres à des valeurs similaires aux sujets sains contrôles (Gliemann et al., 2015). Ces résultats s'accompagnent d'une hausse de 15% de la capillarisation musculaire. Chez des patients diabétiques, 8 à 10 mois de réentraînement à l'effort permettent également de réduire l'épaississement de la membrane basale (Peterson et al., 1980).

Chez des sujets sains, un entraînement en endurance de 8 semaines à une intensité élevée permet une augmentation de l'épaisseur de l'endothélium, un affinement de la membrane basale et une augmentation de la couverture péricytaire (Baum et al., 2015). Or, nous avons vu que la couverture péricytaire est un élément clef de la seconde phase d'angiogenèse, permettant l'acquisition d'une capillarisation viable et fonctionnelle. Confirmant ces éléments, il a été montré par des analyses ultrastructurales que, au terme d'un entraînement au long-cours, seuls les patients ayant augmenté leur capillarisation de plus de 10% présentaient également des gains de couverture péricytaire (Baum et al., 2015). Ces résultats nous confortent dans la nature complémentaire de l'analyse ultrastructurale et nous indiquent que des facteurs cellulaires, notamment péricytaires, pourraient être impliqués dans les défauts de réponse angiogénique au réentraînement à l'effort chez le patient BPCO.

Nous avons vu au chapitre 1 que les facteurs médiant l'effet délétère de la BPCO sur le système vasculaire les plus probables sont des facteurs circulants systémiques de la BPCO.

Ainsi, nous pouvons formuler une première hypothèse pour expliquer le défaut d'angiogenèse en réponse à l'exercice chez le patient BPCO :

Hypothèse 1 :

Des défauts d'adaptation de la couverture péricytaire sont impliqués dans l'angiogenèse émoussée lors du réentraînement à l'effort chez le patient BPCO et résultent d'effets délétères de facteurs circulants de la BPCO.

3.2 Les péricytes dans l'angiogenèse émoussée du patient BPCO

3.2.1 Définition

Les péricytes sont des cellules périvasculaires qui entourent les capillaires sanguins. Ces cellules possèdent de longs processus cytoplasmiques leur permettant de couvrir le capillaire mais pouvant également connecter des capillaires voisins. Les péricytes sont inclus dans la membrane basale couvrant le capillaire, participant au passage au maintien de l'intégrité de cette dernière. Des interdigitations entre pericytes et cellules endothéliales permettent de garantir l'intégrité structurale du capillaire mais également un échange paracrine de molécules *via* des jonctions communicantes.

Les péricytes représentent une population de cellules complexe et leur identification *via* des marqueurs biochimiques a longtemps été discutée. En effet, il n'existe pas à ce jour de marqueur spécifique des péricytes. Les péricytes s'inscrivant dans la continuité des cellules musculaires lisses artérielles d'un point de vue anatomique, leur identification était réalisée au travers de l'expression de l'actine des muscles lisses alpha (α -SMA). Cependant, l'identification des péricytes *via* ce marqueur peut être source d'erreur. En effet, l' α -SMA n'est pas exprimée au sein des péricytes les moins matures ayant pourtant une contribution significative dans le processus d'angiogenèse (Stallcup, 2018). Dans l'optique d'étudier le rôle des péricytes lors de processus tels que l'angiogenèse, l'évaluation des péricytes se doit d'être

réalisée à l'aide de marqueurs péricytaire plus précoces pour ne pas écarter la participation des péricytes moins matures. Parmi ces marqueurs, le récepteur au PDGF-BB (PDGFR- β) ainsi que l'antigène protéoglycan neural/glial 2(NG2) apparaissent comme particulièrement intéressants et très majoritairement utilisés (Ozerdem et al., 2001; Stallcup, 2018), le NG2 présentant l'avantage de n'être exprimé que par les péricytes durant un processus d'angiogenèse (Ozerdem et al., 2001).

3.2.2 *Les péricytes comme élément essentiel du processus d'angiogenèse.*

Nous avons évoqué précédemment que **la phase de maturation capillaire est un élément crucial** assurant la viabilité et la fonctionnalité des néovaisseaux, et que les péricytes jouent un rôle de premier plan durant cette phase. En effet, des études montrent que la stabilisation vasculaire coïncide temporellement avec la couverture péricytaire (Bergers & Song, 2005) et que cette couverture péricytaire confère aux capillaires néoformés une plus grande résistance à la régression ultérieure (Benjamin et al., 1998).

Une étape clef vers la pérennité d'un capillaire nouvellement formé est l'acquisition d'une membrane basale continue couvrant la face extérieure de l'endothélium. La création de cette membrane apparaît au même moment que l'acquisition de la couverture péricytaire (Blood & Zetter, 1990). De plus, les interactions péricyte/endothélium ont été montrées comme essentielles dans la synthèse des composants de la membrane basale capillaire, telles que les laminines (Stratman et al., 2009). Ce contact va stimuler la production péricytaire des TIMP-3 et endothéliales des TIMP-2 (Stratman et al., 2009). Ces TIMP inhibent l'action des MMPs, empêchant ainsi la lyse de la membrane basale néoformée et l'élagage des tubes vasculaires encore immatures (Stratman et al., 2009).

En produisant l'Ang1, les péricytes sont également responsables de la survie endothéliale (Teichert et al., 2017b). Une suppression de la signalisation Ang1-dépendante entre péricytes et cellules endothéliales résulte en une couverture péricytaire réduite et d'importantes anomalies capillaires (Hellström et al., 2001; Teichert et al., 2017b). En effet, au-delà de son rôle dans la survie capillaire, la couverture péricytaire limite la prolifération et la perméabilité endothéliale en inhibant, *via* l'action d'Ang1 et de TGF- β , l'endocytose des jonctions VE-

cadhérines et l'action pro-mitotique du VEGF-A (Carmeliet & Jain, 2011a; Jain, 2003). Ainsi, une suppression de la couverture péricytaire durant l'angiogenèse aboutit à la formation de capillaires aberrants, présentant de nombreuses fuites pouvant être à l'origine d'œdèmes par la suite (Hellström et al., 2001). Du fait d'une prolifération non régulée des cellules endothéliales, les néo capillaires sans couverture péricytaire sont également associés à un endothélium anormalement épais, réduisant l'aire de la lumière vasculaire (Hellström et al., 2001).

Au niveau musculaire, l'inhibition de la prolifération des péricytes abolit l'angiogenèse induite par surcharge musculaire (Naylor et al., 2014). En effet, nous avons vu que la création d'un néovaisseau nécessite l'établissement d'une couverture péricytaire *de novo* de ce bourgeon et donc une prolifération péricytaire importante (Carmeliet & Jain, 2011a). Le fait que le blocage de la prolifération des péricytes abolisse l'angiogenèse par bourgeonnement souligne le rôle clef des péricytes et de leur recrutement dans ce processus.

Au total, des dysfonctions de la couverture péricytaire durant l'angiogenèse sont associées à une plus grande régression capillaire et à l'obtention de néovaisseaux perméables et aberrants. Parallèlement, les péricytes pourraient jouer un rôle vasoactif contribuant à l'homéostasie vasculaire pendant et en dehors de l'angiogenèse.

3.2.3 *Le rôle vasoactif des péricytes*

Les péricytes sont des cellules comportant l'essentiel de la machinerie intracellulaire nécessaire à la contraction et à la dilatation vasculaire, soit des filaments d'actines que l'on retrouve habituellement dans le muscle lisse, et apparaissent comme des acteurs potentiels de la modulation du diamètre et du flux capillaire (Herman & D'Amore, 1985). Ce rôle vasoactif fût renforcé par la preuve de réponse dilatatrice et constrictive des péricytes au niveau musculaire, en réponse à des agents pharmacologiques *ex-vivo* (Tilton et al., 1979). Nous avons vu au point 2.1.2 que la régulation du flux sanguin musculaire était sous le contrôle des capillaires, jouant le rôle de senseurs métaboliques. Ainsi, l'idée d'une régulation de l'apport sanguin musculaire directement *in situ* par les péricytes en parallèle de la régulation bottom-

up (i.e. les signaux d'origine capillaire induisant la dilatation des artères en amont) est une hypothèse plausible.

Le rôle vasoactif des péricytes a été démontré dans d'autres organes que le muscle. En effet, un certain nombre d'études récentes ont exploré le rôle de la constriction péricytaire durant les processus d'ischémie-reperfusion cérébraux, caractérisant les accidents vasculaires. Au terme de l'ischémie, les péricytes présentent une contraction persistante et limitent la reperfusion ultérieure (Hall et al., 2014; Kisler et al., 2017; Yemisci et al., 2009). De plus, ce rôle fût élargi à d'autres organes que le cerveau comme le cœur où il participerait à la physiopathologie de la nécrose post-infarctus myocardique (O'Farrell & Attwell, 2014). Au-delà de ces rôles pathologiques, il a été montré que les péricytes régulent physiologiquement l'apport sanguin local au niveau cérébral et pancréatique, contrôlant ainsi le métabolisme et l'apport d'O₂ (Almaça et al., 2018; Hall et al., 2014; Kisler et al., 2017), une perte de couverture péricytaire menant par ailleurs à un découplage entre les apports et les besoins métaboliques neuronaux (Kisler et al., 2017).

Au niveau musculaire, le rôle vasoactif des péricytes n'a que très peu été étudié. Toutefois, certaines études montrent des arguments en faveur de ce rôle au niveau musculaire. Il a été montré qu'en cas d'élévation de la pression artérielle, les cellules endothéliales capillaires agissent comme senseurs et produisent des molécules vasodilatatrices telles que le peptide naturel C-type (CNP) (Kuhn, 2016). Ces molécules ont pour but d'accroître le flux sanguin capillaire, permettant une meilleure répartition du volume sanguin et une diminution de la pression artérielle. Contrairement au modèle couramment avancé dans le cadre de la régulation du flux sanguin capillaire musculaire, le CNP endothélial n'induit pas de dilatation du muscle lisse artériolaire en amont mais agit directement sur les péricytes, de manière paracrine (Špiranec et al., 2018). Ainsi, en réponse à une hyperémie musculaire locale, les capillaires sont capables de se dilater, *via* une communication paracrine endothélium/péricyte et sous l'action dilatatrice des péricytes (Špiranec et al., 2018). De manière intéressante, à l'instar de leurs homologues artérielles que sont les cellules musculaires lisses, les péricytes semblent se dilater *via* une signalisation intracellulaire dépendante de la voie du 3',5' guanosine monophosphate cyclique (GMPc) (Špiranec et al., 2018). Cette voie du GMPc induit physiologiquement une diminution des niveaux calciques intracellulaires et limite la contractilité cellulaire. Ces résultats de l'effet du CNP sur les flux

calciques et la voie de la GMPc ont été confirmés chez les souris présentant une inhibition spécifique du GMPc péricytaire (Špiranec et al., 2018). En parallèle, une autre étude a évalué la régulation du tonus capillaire musculaire par les péricytes (Methner et al., 2019). Cette étude a montré à l'aide d'imagerie bi-photon que les péricytes induisent une contraction capillaire en réponse à des agonistes de constriction capillaire tels que l'ATP. Cette contraction agit sur l'ensemble des sections capillaires couvertes par des processus cytoplasmiques ou des corps cellulaires péricytaires et non pas uniquement au niveau de sphincters pré-capillaires comme imaginé initialement. De manière très intéressante, il a été démontré que sur un même capillaire, seules les portions couvertes par les péricytes subissaient une contraction sous l'effet de l'ATP. De la même manière, une réduction de la réponse constrictive capillaire à l'ATP chez des souris ayant subi une délétion partielle de la couverture péricytaire capillaire musculaire a été observée (Methner et al., 2019). Ces études confirment que les péricytes sont des régulateurs du flux capillaire musculaire et des résistances vasculaires périphériques.

Ces découvertes questionnent ainsi les conséquences d'une perte de couverture péricytaire en condition pathologique ainsi que l'intérêt de cibler l'augmentation de la couverture péricytaire en parallèle du nombre de capillaires dans le cadre de thérapies pro-angiogéniques.

3.2.4 *Effet du réentraînement à l'effort sur la couverture péricytaire*

Nous avons vu que l'angiogenèse musculaire était stimulée par le réentraînement à l'effort. Il a précédemment été montré dans un contexte d'ischémie du membre inférieur qu'**une augmentation de la couverture péricytaire en parallèle de l'augmentation du nombre de capillaire est requise pour obtenir les gains de perfusion musculaire escomptés à la suite du processus d'angiogenèse musculaire** (Caporali et al., 2015; Chen et al., 2013; Chen et al., 2018; Qin et al., 2013). L'effet de l'entraînement sur la couverture péricytaire des capillaires sanguins musculaires a malheureusement très peu été étudié. Cependant, la seule étude à notre connaissance ayant étudié la couverture péricytaire de sujets sains au cours du réentraînement à l'effort a observé une élévation de la couverture péricytaire au terme des 8 semaines d'entraînement en endurance à une intensité élevée (Baum et al., 2015). Au vu du rôle de la couverture péricytaire dans dans l'apport sanguin musculaire discuté précédemment,

et ainsi dans l'apport d'O₂ et de nutriments, une réduction de la couverture péricytaire baseline ou une altération de l'augmentation de cette dernière à l'entraînement *a contrario* pourrait avoir des conséquences sur le couplage vasculo-métabolique musculaire (Attrill et al., 2020). Ce découplage vasculo-métabolique, soit une différence d'apport d'O₂ et de nutriment au regard de la demande tissulaire, a par ailleurs déjà été observé au niveau cérébrale suite à une réduction de la couverture péricytaire (Kisler et al., 2017).

3.2.5 Les maladies chroniques comme facteurs de détérioration péricytaire

De nombreuses maladies chroniques sont associées à des troubles au niveau de la couverture péricytaire. L'inflammation et le stress oxydant représentent le dénominateur commun d'un grand nombre de pathologies chroniques. De plus, ces facteurs sont la plupart du temps avancés comme facteurs explicatifs des défauts péricyitaires apparaissant dans le cadre de maladies chroniques.

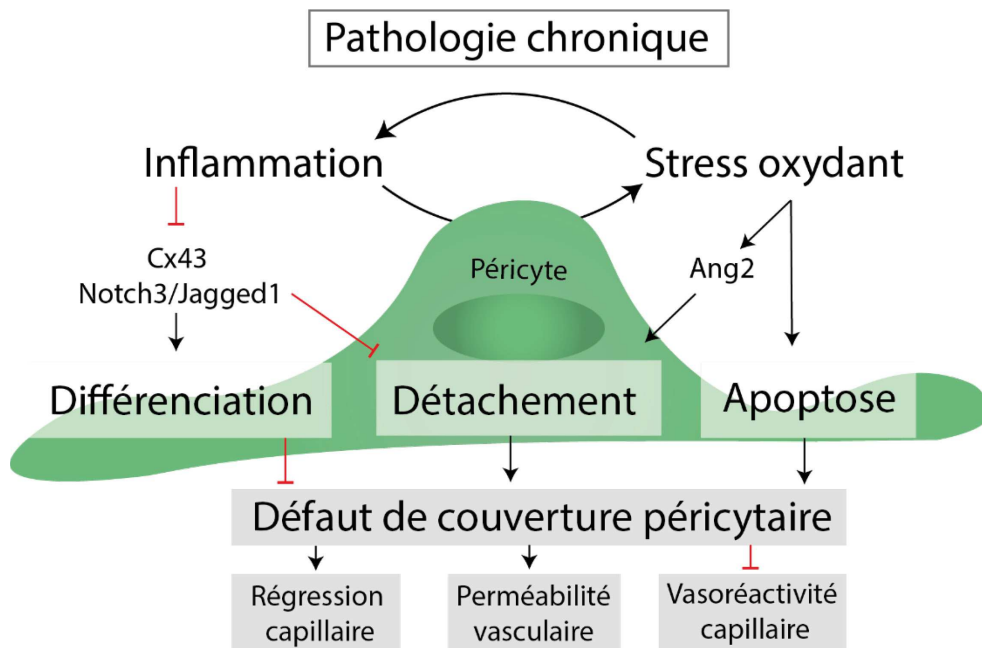


Figure 12. Causes et conséquences d'une réduction de la couverture péricytaire dans les pathologies chroniques.

En effet, **l'inflammation engendre une répression de l'expression génique d'un grand nombre de facteurs essentiels aux interactions péricytes/capillaires.** Parmi eux, on retrouve par exemple la connexine 43 (Cx43) qui a été montrée comme incontournable dans la

formation de jonctions communicantes entre cellules endothéliales et péricytes, garants du maintien de la couverture péricytaire (Hirschi et al., 2003). Une suppression de l'expression de ces connexines a pour conséquence une réduction drastique de la couverture péricytaire (Sato et al., 2002). Or, il a été montré par ailleurs qu'un traitement induisant de l'inflammation, le lipopolysaccharide (LPS), abolit l'expression de la connexine 43 (Fernandez-Cobo et al., 1999). L'inflammation est connue d'autre part pour induire une élongation des péricytes (Klement et al., 2018a), promouvant ainsi leur détachement et leur migration hors de la zone capillaire. Enfin, la voie Notch3/Jagged-1 est également importante dans la différenciation des péricytes ainsi que dans le maintien de la quiescence vasculaire et dans la prévention du détachement des péricytes (Hirschi et al., 2003). Une exposition à l'inflammation induit une répression de cette voie et une perte des péricytes (Kofler et al., 2015).

Le stress oxydant quant à lui génère un stress péricytaire pouvant mener à la mort de ces cellules et à une diminution de la couverture péricytaire (Cacicedo et al., 2005; García-Quintans et al., 2016; Hayden et al., 2010). En particulier, les isoprostanes, des produits de l'oxydation des lipides par les espèces réactives de l'oxygène, ont été impliqués dans l'apoptose péricytaire (Cacicedo et al., 2005). L'inhibition des isoprostanes permet au contraire de prévenir la perte de couverture péricytaire dans un contexte diabétique (Tsai et al., 2009). Le stress oxydant engendre également une élévation des niveaux d'Ang2 (Mofarrahi et al., 2013). Nous avons vu précédemment qu'un déséquilibre dans le ratio Ang1/Ang2 pouvait mener à une déstabilisation vasculaire et à un détachement des péricytes (Teichert et al., 2017b). Enfin, il a été montré que l'activité de la eNOS était essentielle au recrutement des péricytes au niveau capillaire (Yu et al., 2005). Une inhibition de cette activité résulte en une réduction drastique de la couverture péricytaire et du nombre de capillaires perfusés (Yu et al., 2005). L'activité de la eNOS étant réduite par le stress oxydant (Griendling & FitzGerald, 2003), elle pourrait être un médiateur important de l'effet du stress oxydant sur la couverture péricytaire.

Enfin, **les péricytes peuvent être des médiateurs de manifestations cliniques aiguës ou chroniques de pathologies au long cours**. En effet, le rôle de la perte de péricytes dans la rétinopathie diabétique est un élément central dans la prise en charge de cette manifestation pathologique et a fait l'objet de nombreuses recherches (Ejaz, 2007; Hammes et al., 2004;

Pfister et al., 2008). Au niveau cérébral, le péricyte est garant de l'efficacité de la barrière hémato-encéphalique. Une perturbation de la couverture péricytaire capillaire à ce niveau semble être incriminée dans de plus en plus de pathologies d'origine cérébrale, de la maladie d'Alzheimer (Sagare et al., 2013) aux crises d'épilepsie (Klement et al., 2018b). Enfin, une perturbation de la couverture péricytaire semble induire des manifestations pathologiques au niveau glomérulaire et cardiaque (Bjarnegård et al., 2004).

Malgré ces nombreuses preuves sur des anomalies péricytaires dans les pathologies chroniques, la présence de perturbations de la couverture péricytaire des capillaires sanguins du muscle strié squelettique n'est que très rarement explorée. Cependant, des articles ont récemment mis en évidence une altération des interactions péricyte/capillaire musculaires dans l'AOMI ou l'hypertension (Baum et al., 2020). De plus, des débris et une dégénérescence des péricytes ont été trouvés au niveau du muscle de patients diabétiques (Tilton et al., 1981). Cette « péricytopathie » musculaire du patient diabétique fût attribuée aux effets néfastes du stress oxydant (Hayden et al., 2010). Chez le patient BPCO, la couverture péricytaire des capillaires sanguins musculaires n'a jamais été explorée. Pourtant, les niveaux accrus de stress oxydant et d'inflammation, musculaires et circulants, chez ces patients (de Oca et al., 2005; Pinto-Plata et al., 2012) laissent présumer des atteintes péricytaires à ce niveau. De plus, des débris péricytaires ont été retrouvés au niveau endoneural chez ces patients (Stoebner et al., 1989) tout comme des micro-hémorragies cérébrales spontanées (Lahousse et al., 2015). Ces dernières apparaissent dans un contexte d'atteinte péricytaire comme en témoigne leur apparition fréquente chez les patients atteints d'artériopathie cérébrale autosomique dominante avec infarctus sous-corticaux et leucoencéphalopathie (CADASIL), une maladie caractérisée par une perte de péricytes cérébraux (Kofler et al., 2015). Or, les patients CADASIL présentent également une perte péricytaire au niveau du muscle squelettique (Lewandowska et al., 2010). Les patients BPCO pourraient ainsi suivre le même schéma d'atteinte. La population de patients BPCO est par ailleurs une population âgée et très fortement sédentaire (Watz et al., 2009). Or, l'immobilisation (Munroe et al., 2019) tout comme l'avancée en âge (Fukada & Kajiya, 2020a) ont toutes les deux été incriminées dans la réduction de la couverture péricytaire des capillaires musculaires.

Chez le patient BPCO, les facteurs circulants délétères de la maladie, notamment l'inflammation et le stress oxydant, pourraient ainsi agir de concert pour induire un défaut

de couverture péricytaire systémique, dont nous avons déjà des indices indirects au niveau cérébral et endoneural. Au niveau musculaire, cette perte de couverture péricytaire pourrait, comme énoncé précédemment, réduire l'apport sanguin musculaire et mettre en péril la viabilité capillaire. Les défauts de réponse à la réhabilitation des patients BPCO sur des aspects d'angiogenèse, d'endurance musculaire et de capacité aérobie pourraient ainsi résulter en partie d'une altération des capacités de mobilisation des péricytes au niveau capillaire.

Au delà du péricyte, nous avons également pu évoquer dans le chapitre 2 le rôle clef joué par la cellule musculaire squelettique dans l'orchestration de l'angiogenèse musculaire induite par le réentraînement à l'effort. Comme la cellule musculaire a été montrée dysfonctionnelle dans la BPCO sur d'autres aspects de ces fonctions musculaires, nous pensons qu'elle pourrait, à l'instar des péricytes, jouer un rôle dans l'angiogenèse émoussée du patient BPCO. **Nous avons donc formulé l'hypothèse suivante qui sera détaillée dans le point suivant :**

Hypothèse 2 :

La dysfonction musculaire et les anomalies de la réponse angiogénique de la cellule musculaire à un stress simulant l'exercice expliquent l'émoussement de l'angiogenèse musculaire en réponse au réentraînement des patients BPCO.

3.3 Défauts de la cellule musculaire et altération de la réponse angiogénique chez le patient BPCO.

3.3.1 L'intégration des signaux pro-angiogéniques au niveau musculaire

Le réentraînement à l'effort engendre un stress musculaire sur bien des aspects. Les cellules endothéliales et les péricytes, ainsi que les cellules musculaires vont ainsi servir de senseurs, intégrant ces différents signaux pro-angiogéniques et régulant une réponse angiogénique proportionnée et adaptée. Dans le muscle, les principaux stimuli pro-angiogéniques décrits sont les stress métaboliques et hypoxiques ainsi que ceux résultant d'une augmentation des forces de cisaillement et des contraintes mécaniques. Ce couplage précis entre ces stimuli et

la réponse angiogénique permet une adéquation entre les besoins en nutriments et en oxygène, la régulation des pressions sanguines périphériques et l'étendue du réseau capillaire.

L'intégration des stress métaboliques et hypoxiques dans la réponse angiogénique musculaire est apparue comme principalement médiée par les cellules musculaires (Arany et al., 2008; Chinsomboon et al., 2009). L'expression du coactivateur alpha du récepteur gamma activé par les proliférateurs de peroxyosomes (PGC1- α) au sein des myocytes joue un rôle central dans la réponse angiogénique musculaire en réponse à l'hypoxie et/ou au stress métabolique. Bien que le PGC1- α soit impliqué dans la biogenèse mitochondriale, son rôle pro-angiogénique semble faire intervenir des isoformes de PGC1- α spécifiques n'ayant qu'un rôle limité dans la biogenèse mitochondriale (Arany et al., 2008; Thom et al., 2014). Au niveau des cellules musculaires, l'hypoxie engendre une surexpression du facteur HIF1 et particulièrement une stabilisation de sa sous-unité alpha, permettant son effet biologique. Or, HIF1- α induit une surexpression de PGC1- α et va ainsi promouvoir une surexpression et une exocytose importante de VEGF-A par les cellules musculaires (Birgitte Hoier & Hellsten, 2014; Thom et al., 2014). Cependant, le rôle d'HIF1- α dans l'angiogenèse musculaire reste controversé, son inhibition induisant une augmentation de la capillarisation musculaire (Mason et al., 2007). La régulation de l'angiogenèse musculaire est apparue médiée par PGC1- α mais *via* des voies HIF1-indépendantes, comme la voie des protéines kinases activées par l'adénosine monophosphate (AMPK), majeure dans la régulation de la réponse à un stress métabolique (Arany et al., 2008).

Durant une activité physique, une augmentation de la stimulation musculaire β -adrénergique est bien documentée et participe à la régulation de la contractilité musculaire (Hostrup et al., 2014). De manière intéressante, cette stimulation a également montré un rôle majeur dans l'angiogenèse musculaire induite par l'exercice en engendrant notamment la surexpression de PGC1- α , induite par un promoteur génique alternatif (Chinsomboon et al., 2009). Ainsi, l'angiogenèse pourrait, au-delà du principe d'action/réaction des stress métaboliques et hypoxiques, être stimulée par anticipation des besoins musculaires en se couplant à la stimulation musculaire β -adrénergique. Cette découverte pose bien entendu la question des conséquences des traitements bêtabloquants sur l'angiogenèse musculaire des patients BPCO avec comorbidités cardiovasculaires chez qui ils sont régulièrement prescrits. Enfin, il a été montré que l'étirement musculaire passif, sans activité électrique musculaire ni

stress métabolique ou hypoxique important, induisait un relargage de VEGF au niveau interstitiel (Hellsten et al., 2008). Ainsi, une activation de la voie PGC1- α sous l'effet du stress mécanique induit par l'étirement passif du muscle peut être suspectée.

La surexpression de PGC1- α au niveau myocytaire joue un rôle central dans l'intégration des signaux pro-angiogéniques d'origine métabolique, hypoxique ou nerveuse au niveau musculaire.

Bien que les voies d'activation et les isoformes de PGC1- α diffèrent en fonction du stimulus, la surexpression de PGC1- α induit toujours une surexpression de VEGF-A quel que soit le stimulus.

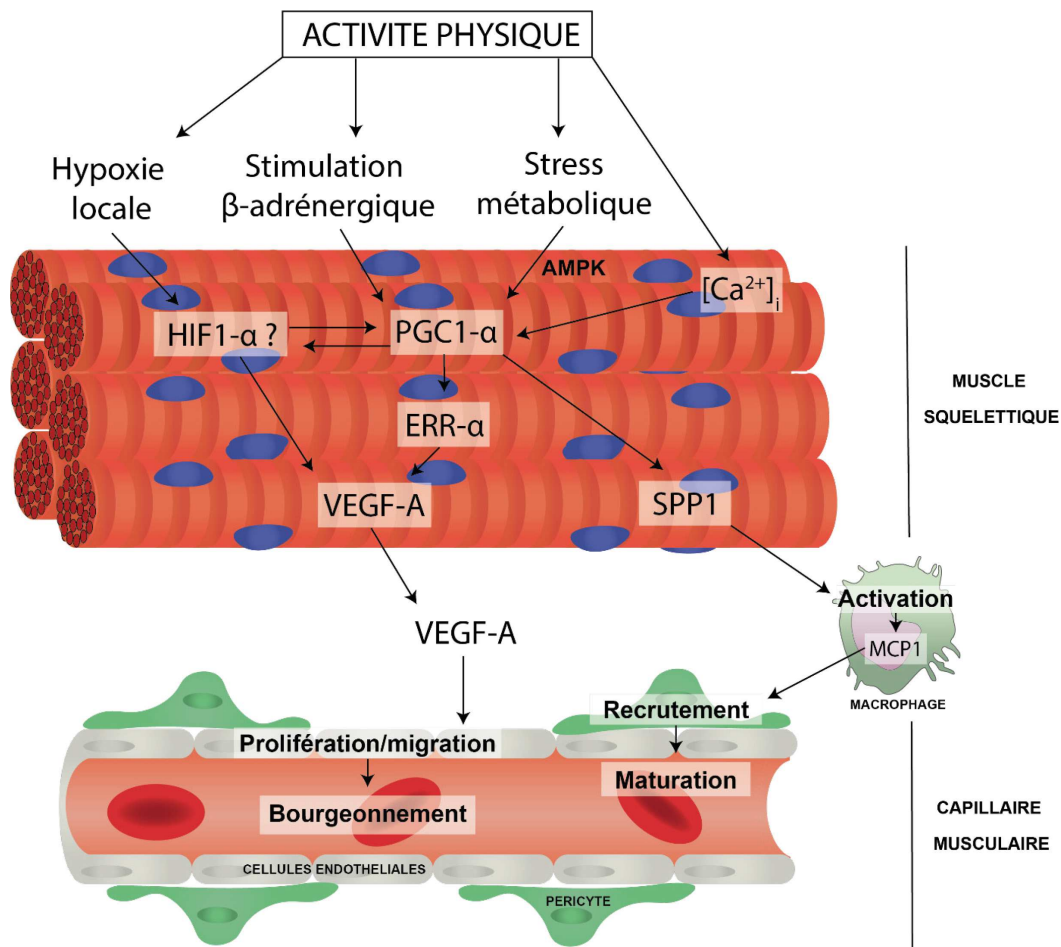


Figure 13. Régulation de l'angiogenèse musculaire par les cellules musculaires durant un exercice musculaire

Cette surexpression du VEGF-A est médiée par le récepteur relatif aux œstrogènes alpha (ERR- α) (Arany et al., 2008; Chinsomboon et al., 2009; Rowe et al., 2014). La production de VEGF-A par les cellules musculaires lors d'un exercice musculaire est visible *via* une élévation très importante du contenu en VEGF-A dans le milieu interstitiel musculaire (Hoier et al., 2012).

De plus, les souris surexprimant le PGC1- α montrent une surexpression musculaire de l'Ang2 et du PDGF-BB, favorisant ainsi d'autres aspects de la réponse angiogénique musculaire, en promouvant à la fois la déstabilisation vasculaire et le recrutement péricytaire, essentiels à une angiogenèse physiologique (Arany et al., 2008). De plus, le PGC1- α stimule le recrutement péricytaire durant la maturation capillaire en produisant la phosphoprotéine sécrétée 1 (SPP1) (Rowe et al., 2014). Ce facteur de chimio-attraction permet de recruter les macrophages qui induisent la migration et le recrutement des péricytes *via* la production de la protéine chimioattractante des monocytes 1 (MCP1)(Rowe et al., 2014).

Ainsi, des altérations des voies pro-angiogéniques au sein des cellules musculaires peuvent être à l'origine d'un phénomène d'angiogenèse émoussée et de défaut de péricytes dans le muscle.

3.3.2 *Défaut de la cellule musculaire chez le patient BPCO*

Nous avons décrit au point précédent le rôle clef de la cellule musculaire dans l'orchestration de l'angiogenèse musculaire induite par le réentraînement à l'effort.

Chez le patient BPCO, de nombreuses anomalies spécifiques de la cellule musculaire ont précédemment été décrites. A un niveau musculaire global, une atrophie musculaire est bien documentée dans la BPCO (Jaitovich & Barreiro, 2018). De manière intéressante, il a été montré que ce phénotype atrophique était préservé au sein de cultures de myotubes isolés à partir de prélèvements musculaires de patients BPCO. L'altération de voies de signalisation au sein de la cellule musculaire, notamment celles de l'autophagie et de la synthèse protéique, semblent expliquer ce défaut (Gouzi et al., 2018; Pomiès et al., 2015, 2016). De manière intéressante, les défauts moléculaires constatés au niveau musculaire global concordent avec les anomalies mises en évidence sur la cellule en culture (Doucet et al., 2007; Plant et al., 2010). Comme les cellules musculaires BPCO ont été montrées plus sensibles à l'effet nocif du stress oxydant (Gouzi et al., 2018; Pomiès et al., 2015, 2016) il est possible de suspecter l'altération d'autres voies intra-cellulaires de la cellule musculaire chez le patient BPCO, et notamment celles menant à la création de stimuli pro-angiogéniques pour les capillaires.

Nous avons vu au point précédent que l'expression de PGC1- α au sein des cellules musculaires est un carrefour et un élément clef dans la réponse de la cellule musculaire menant à son action pro-angiogénique. Au niveau musculaire global, une altération des niveaux d'expression de PGC1- α ont précédemment été documentés dans le cadre de la BPCO (Remels et al., 2007). Nous avons également évoqué le fait que le VEGF-A lors de l'angiogenèse musculaire est très majoritairement originaire de la cellule musculaire (Hoier et al., 2013). Or, ici encore, l'expression musculaire globale de VEGF-A est apparue réduite chez le patient BPCO dans certaines études (Gagnon et al., 2014). Comme le blocage de la voie PGC1- α , ou du VEGF-A en aval, abolit l'angiogenèse musculaire induite par l'entraînement (Chinsomboon et al., 2009; Leick et al., 2009; Olfert et al., 2010b; Thom et al., 2014), nous pouvons faire l'hypothèse qu'une altération de cette voie explique l'angiogenèse émoussée chez le patient BPCO.

De plus, **une altération de la signalisation dépendante de PGC1- α pourrait également être liée à des troubles de la couverture péricytaire chez les patients**, le blocage de l'axe PGC1- α /SPP1 dans la cellule musculaire aboutissant à la création de vaisseaux immatures et d'une capillarisation aberrante (Rowe et al., 2014). Ce point souligne le rôle clef de PGC1- α mais également des péricytes dans l'obtention de nouveaux capillaires viables et fonctionnels suite à la stimulation de l'angiogenèse musculaire.

Ainsi, l'atteinte capillaire et le défaut d'adaptation de l'angiogenèse musculaire de la BPCO pourraient être la conséquence d'une atteinte péricytaire et/ou de la cellule musculaire striée squelettique. Toutefois, les patients BPCO présentent également des anomalies d'adaptation de la vasoréactivité artérielle en réponse au réentraînement (cf. chapitre 1). Etant donné que cette vasoréactivité repose tout comme l'angiogenèse sur la fonction de la cellule endothéliale, nous allons détailler dans le chapitre suivant la fonction physiologique de la cellule endothéliale et les éléments pouvant expliquer son altération chez le patient BPCO.

Résumé du chapitre 3

L'étude de l'ultrastructure capillaire est une stratégie valide d'exploration des défauts capillaires apparaissant sous l'effet d'une pathologie. De plus, elle permet la mise en évidence de facteurs cellulaires associés à l'efficacité de l'angiogenèse et pourrait donc participer à une meilleure compréhension des facteurs impliqués dans la régulation de l'angiogenèse musculaire chez le patient BPCO.

Les péricytes jouent un rôle clef dans l'angiogenèse musculaire et dans la fonction des capillaires sanguins musculaires. Comme les péricytes sont des cellules sensibles aux effets circulants délétères de certaines pathologies, nous avons émis l'hypothèse suivante : « **Des défauts d'adaptation de la couverture péricytaire sont impliqués dans l'angiogenèse émoussée lors du réentraînement à l'effort chez le patient BPCO et résultent d'effets délétères de facteurs circulants de la BPCO** ».

D'autre part, les patients BPCO présentent des anomalies de la cellule musculaire. Or, cette dernière est un facteur clef de l'orchestration de l'angiogenèse musculaire, notamment via les voies dépendantes de PGC1- α . Nous avons donc formulé une seconde hypothèse : « **La dysfonction musculaire et les anomalies de la réponse angiogénique de la cellule musculaire à un stress simulant l'exercice expliquent l'émoussement de l'angiogenèse musculaire en réponse au réentraînement des patients BPCO** ».

Enfin, nous avons vu que la vasoréactivité artérielle présentait des anomalies d'adaptation au réentraînement à l'effort chez le patient BPCO. Or, cette réactivité artérielle repose tout comme l'angiogenèse sur la fonction de la cellule endothéliale. Ainsi, nous détaillerons dans le Chapitre 4 le rôle physiologique de la cellule endothéliale dans la fonction vasculaire artérielle, et en quoi une atteinte cellulaire endothéliale pourrait également altérer la vasoréactivité artérielle des patients BPCO.

Chapitre 4. Vasoréactivité artérielle et fonction cellulaire endothéliale dans la BPCO

Alors que nous suspectons une implication des cellules musculaires et des péricytes dans l'altération de la réponse musculaire angiogénique chez le patient BPCO, nous pensons que les défauts d'adaptation de la vasoréactivité artérielle chez ces patients pourraient également résulter d'anomalies cellulaires. **La cellule endothéliale et ses progéniteurs sont notamment impliqués dans la réponse de VRA au réentraînement à l'effort.** De plus, il a été montré que le stress oxydant et l'inflammation circulants exercent une action néfaste sur la cellule endothéliale artérielle. Ainsi, nous avons pu formuler une dernière hypothèse :

Hypothèse 3 :

Des anomalies de la cellule endothéliale et/ou de ces progéniteurs sont engendrées par les facteurs circulants délétères de la BPCO et expliquent le défaut d'adaptation de la vasoréactivité artérielle (VRA) au réentraînement à l'effort chez ces patients.

4.1.1 VRA : Définition et importance dans la prévention cardiovasculaire

La vasoréactivité artérielle (VRA) est une propriété indispensable au fonctionnement physiologique des artères systémiques. Une augmentation brutale du flux sanguin et donc des forces de cisaillement induit une importante vasodilatation réactive des artères et de l'irrigation sanguine en amont (Hamburg et al., 2011). La cellule endothéliale étant en contact direct avec ces forces mécaniques accrues, elle agit tel un senseur et est à l'origine d'une grande part de la réponse vasodilatatrice menant à la réduction de ces forces de cisaillement (Hamburg et al., 2011). La méthode la plus utilisée dans l'évaluation de la VRA est l'évaluation de la dilatation artérielle médiée par le flux ou *flow mediated dilation (FMD)*. Cette méthode

non-invasive consiste en l'évaluation du diamètre artériel ou de la perfusion des tissus suite à un important gradient de flux sanguin (pré-/post-occlusion artérielle) (Corretti et al., 2002). La mesure de FMD est sensible aux altérations de la fonction endothéliale dans un cadre pathologique (Peled et al., 2009) et permet d'en apprécier l'évolution au cours du temps (Hansen et al., 2017). De manière plus générale, la mesure de FMD a été montrée comme un marqueur intéressant du risque cardiovasculaire.

La mesure de FMD apparait en effet dans plusieurs études comme un prédicteur indépendant du risque d'événements cardiovasculaires chez des patients présentant des maladies cardiovasculaires (Brevetti et al., 2003; Gokce et al., 2003; Hamburg et al., 2008, 2011; Meyer et al., 2005). De plus, il a été montré par de nombreuses études que la FMD est un prédicteur indépendant de l'apparition de maladies cardiovasculaires chez des sujets asymptomatiques (Green et al., 2011; Rossi et al., 2008). Dans la prise en charge des maladies cardiovasculaires, première cause de mortalité mondiale, la prévention apparaît comme la stratégie la plus efficace (Green et al., 2011). Ainsi, la mesure de la FMD permet d'identifier des anomalies pré-cliniques permettant d'agir avant le développement de maladies cardiovasculaires. La FMD permet également de fournir une évaluation de l'évolution de ce risque cardiovasculaire sous l'effet du temps, d'un comportement à risque ou au contraire d'une intervention thérapeutique. Il a été en effet montré qu'une amélioration de 1% de la FMD permettait une réduction consécutive de 9 à 17% du risque d'évènements cardiovasculaires (Green et al., 2011; Inaba et al., 2010). De plus, même si aucun seuil cliniquement significatif n'existe pour la FMD, certains seuils ont été montrés comme prédictifs de l'évolution du risque cardiovasculaire dans les sept années suivantes (Rubinshtein et al., 2010). Enfin, la valeur de FMD post-intervention est apparue comme prédictrice du risque de resténose intra-stent (Kitta et al., 2005). L'évaluation de l'effet d'une intervention thérapeutique sur la prévention du risque cardiovasculaire n'est pas toujours aisée en l'absence de suivi longitudinal au long-terme. La FMD apparait ainsi comme un marqueur pertinent d'atteintes pré-cliniques qui, si elles sont corrigées directement après une intervention de quelques semaines/mois, peuvent attester d'un effet sur le risque cardiovasculaire futur. La modification de la FMD peut avoir lieu grâce à la mise en œuvre d'amélioration des voies de vasoréactivité dépendantes de la cellule endothéliale.

4.1.2 Les voies de régulation de la VRA dépendantes de l'endothélium

Le tonus vasculaire au niveau artériel et artériolaire est régulé majoritairement par l'action de contractions ou de dilatations des muscles lisses entourant ces vaisseaux. Localement, le senseur des forces de cisaillement et des pressions vasculaires demeure cependant l'endothélium, qui constitue la face interne des vaisseaux et est donc aux premières loges pour établir toute nécessité d'adaptation vasculaire. Bien que nous ne développerons pas ce point dans ce travail, de nombreuses voies de régulation indépendantes de l'endothélium ont également été mises en évidence et impliquées dans l'évolution du risque cardiovasculaire (pour revue (Maruhashi et al., 2018)).

L'endothélium va pouvoir induire une dilatation vasculaire en agissant de manière paracrine sur les cellules musculaires lisses vasculaires. Cette action est médiée principalement par le monoxyde d'azote (NO), les prostacyclines (PGI₂) ou par une famille de molécules regroupées sous le nom de facteurs d'hyperpolarisation dérivés de l'endothélium (EDHF). Tous ces médiateurs peuvent être produits par l'endothélium sous l'influence de situations nécessitant une vasodilatation, une élévation des forces de cisaillement par exemple, ou de facteurs agonistes comme l'insuline ou l'acétylcholine.

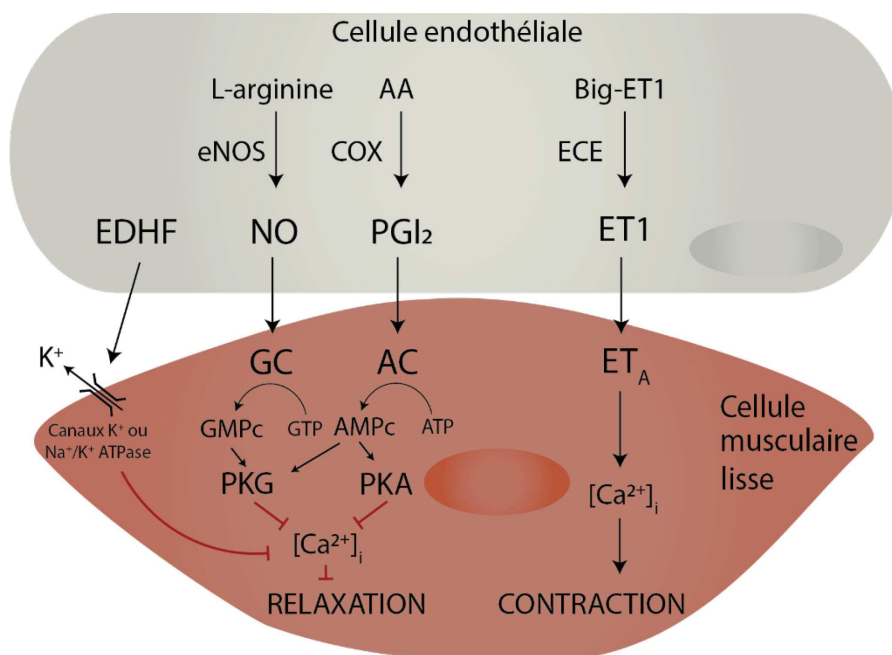


Figure 14. Régulation du tonus des cellules musculaires lisses vasculaires par l'endothélium.

Le NO produit par l'endothélium va agir au niveau des cellules musculaires lisses en se liant à l'enzyme guanylate cyclase soluble (GCs)(Denninger & Marletta, 1999). Cette dernière va, une fois activée par le NO, convertir la guanosine 5'-triphosphate (GTP) en guanosine 3',5'-monophosphate cyclique (GMPC). Le GMPC, *via* une action sur des effecteurs intracellulaires tels que la protéine kinase G (PKG), va induire une diminution des taux de calcium intracellulaires et ainsi une relaxation des muscles lisses menant à la dilatation vasculaire (Denninger & Marletta, 1999).

Les PGI2 sont quant à elles synthétisées au niveau endothélial à partir d'acide arachidonique sous l'action de la cyclooxygénase (COX). Les PGI2 vont se lier à l'adénylyl-cyclase (AC) au niveau du muscle lisse, transformant l'ATP en adénosine monophosphate cyclique (AMPc)(Rembold, 1992). L'AMPc va, tout comme le GMPC, induire une baisse de concentration du calcium intracellulaire en agissant sur des seconds messagers, majoritairement la protéine kinase A (PKA) mais aussi, à l'image de la GMPC, la PKG (Rembold, 1992).

Les EDHF, contrairement au NO et aux PGI2, sont en réalité non pas une mais un ensemble de molécules induisant une hyperpolarisation du muscle lisse vasculaire, *via* une action stimulatrice des canaux ioniques potassiques (K^+) ou sodium/potassium-ATPase (Na^+/K^+ -ATPase) (Féléto & VanHoutte, 2009). On retrouve parmi ces molécules le monoxyde de carbone (CO), le CNP, les acides epoxyeicosatriénoïques (EETs) et bien d'autres. En hyperpolarisant les cellules musculaires lisses, ces facteurs vont réduire la probabilité d'ouverture des canaux calciques voltage dépendants ainsi que l'activation du réticulum sarcoplasmique (Féléto & VanHoutte, 2009). Ceci aura pour effet de limiter le relargage de calcium au niveau cytoplasmique et consécutivement induire une relaxation musculaire.

L'endothélium est également capable d'induire une constriction des muscles lisses vasculaires.

La voie d'action principalement décrite pour ce phénomène est la voie de l'endothéline 1 (ET-1) (Haynes & Webb, 1994). Cette molécule est produite au niveau endothélial par la transformation de l'endothéline dite « Big » (Big-ET1) en ET1 active sous l'action de l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE) (Yanagisawa et al., 1988). L'ET1 va ensuite se lier aux récepteurs ET_A au niveau des cellules musculaires lisses. Cette liaison va induire une libération de calcium du réticulum sarcoplasmique ainsi qu'une entrée calcique depuis le milieu extracellulaire, menant à une augmentation de la contraction musculaire (Kato et al., 2013).

4.1.3 La voie du NO et sa régulation

Parmi les voies de régulation du tonus vasculaire dépendantes de l'endothélium, la plus étudiée reste cependant la voie endothéliale de production du NO que nous allons décrire ici plus en détail. Cette voie est sous le contrôle de la NO-synthase endothéliale (eNOS) qui est le siège de nombreuses régulations.

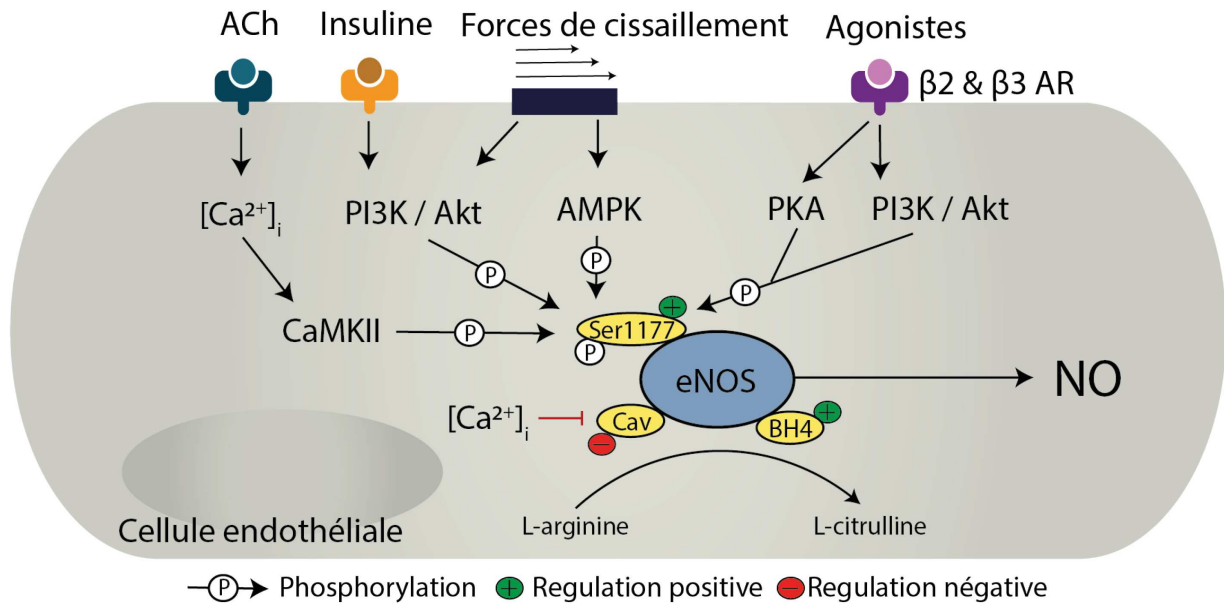


Figure 15. Modulation de l'activité de la eNOS.

Physiologiquement, la eNOS se présente sous la forme d'une unité dimérique, produisant du NO en transformant la L-arginine en L-citrulline (Green et al., 2004). Dans des circonstances particulières, le plus souvent pathologiques, la eNOS peut être retrouvée sous la forme de monomère, engendrant la production d'anion superoxyde plutôt que de NO (Yang et al., 2009). L'anion superoxyde, s'il est produit en trop grande quantité, peut mener à l'apparition d'un stress oxydant. Parmi les régulateurs de la dimérisation de la eNOS, la tétrahydrobioptérine (BH4), un de ses cofacteurs, joue un rôle déterminant. En effet, ce facteur se lie à la eNOS et favorise l'oxydation de la L-arginine. Il a été montré que la BH4 stabilise la forme dimérique de la eNOS et prévient son découplage (Yang et al., 2009). L'activité de la eNOS est également en grande partie régulée par des phénomènes de phosphorylation. Ces phosphorylations se font principalement au niveau de résidus sérine

(Ser) ou thréonine (Thr). Les sites de phosphorylation les mieux décrits et caractérisés sont la Ser1177, qui accroît l'activité de la eNOS, et la Thr495 qui au contraire l'inhibe. D'autres sites existent (Ser617, Ser635 ...) mais sont moins bien caractérisés (Farah et al., 2018).

La Ser1177 peut être phosphorylée sous l'influence de plusieurs stimuli. En effet, des agonistes tels que l'insuline, *via* la voie PI3K/PKB (Masaki et al., 2019), ou l'acétylcholine, *via* une augmentation de calcium (Ca^{2+}) intracellulaire (Cau et al., 2012), peuvent phosphoryler cette sérine. L'apparition de contraintes mécaniques, étirements ou forces de cisaillement, peuvent également induire la phosphorylation de la Ser1177 par l'intermédiaire des voies PI3K/PKB ou AMPK (Chen et al., 2010). Enfin, il a été montré que la stimulation β 2&3-adrénergique engendre une phosphorylation de la Ser1177, *via* PKA et PKB (Kou & Michel, 2007; Queen et al., 2006). Le calcium (Ca^{2+}) joue un rôle central dans la régulation de l'activité de la eNOS. En effet, sous une stimulation agoniste de la voie du NO, ce dernier va permettre de libérer la eNOS de sa liaison inhibitrice avec les cavéolines et se lier à la Calmoduline pour permettre la formation d'un complexe Ca^{2+} -Calmoduline-eNOS stimulant l'activité de cette dernière (Cau et al., 2012). Enfin, le complexe Ca^{2+} -Calmoduline va permettre l'activité de la protéine kinase de type II dépendante du complexe Ca^{2+} -Calmoduline (CAMKII), connue pour induire la phosphorylation de la Ser1177 (Farah et al., 2018). Enfin, l'activité de la eNOS a été montrée comme régulée par un certain nombre de mécanismes tels que l'acétylation et les S-nitrosylations et S-glutathionylations (Farah et al., 2018). La modulation de l'activité de la eNOS va *in fine* déterminer la biodisponibilité du NO et la capacité de vasoréactivité endothéliale.

La voie du NO est apparue déterminante dans la valeur de FMD, et donc dans la régulation du risque cardiovasculaire. Ce rôle semble être plus prédominant au niveau microvasculaire qu'au niveau des artères de conduit (Green et al., 2014; Hirai et al., 2014). La biodisponibilité du NO occupe un rôle central dans les mesures de FMD et leurs modifications sous l'effet d'une pathologie ou d'une intervention. Dans les points suivants, nous verrons en quoi des modifications au niveau de la voie du NO peuvent être déterminantes dans la réponse à l'entraînement et en quoi une altération de cette voie sous l'effet d'une pathologie pourrait expliquer en partie une réponse de VRA au réentraînement émoussée.

4.2 L'effet de l'entraînement sur la VRA

4.2.1 Mécanismes et cinétiques d'adaptation de la VRA à l'entraînement

L'exercice physique engendre une élévation de la pression artérielle, des contraintes vasculaires et une modification de l'équilibre humoral. En guise de compensation à ces phénomènes aigus, la répétition d'exercices, sous la forme d'entraînement, engendre des adaptations de la fonction vasculaire.

Ainsi, il a été montré que plusieurs semaines d'entraînement en endurance amélioraient la FMD chez des sujets sains (Tinken et al., 2008), comme chez des patients hypertendus ou diabétiques (Montero et al., 2013; Pedralli et al., 2018). De manière intéressante, les adaptations artérielles au réentraînement, tout comme l'angiogenèse, s'inscrivent dans un processus dynamique comportant plusieurs phases (Green et al., 2004). Il a été décrit que, durant l'adaptation à l'entraînement, les vaisseaux présentent une amélioration de leurs capacités fonctionnelles, transitoire, régressant spontanément une fois les améliorations biomécaniques et structurelles en place (Green et al., 2004). De manière cohérente, une étude chez le sujet sain a montré que la FMD était augmentée sous l'effet de 2 à 4 semaines de réentraînement mais revenait à des valeurs pré-entraînement à la fin de 8 semaines de réentraînement (Tinken et al., 2008). Les adaptations structurelles artérielles se mettent quant à elles en place plus tardivement, vers 4 semaines de réentraînement mais perdurent au-delà de 8 semaines (Tinken et al., 2008). Ces éléments nous démontrent la nécessité d'accorder une attention particulière à la cinétique d'évaluation de la FMD lors d'études se focalisant sur les évolutions de ce paramètre sous l'effet de l'entraînement. La question est de savoir quels sont les mécanismes impliqués dans l'amélioration de la fonction vasculaire à l'entraînement.

Le réentraînement à l'effort augmente l'expression, la phosphorylation et l'activité de la eNOS, tant chez l'homme que chez l'animal (Green et al., 2004). Inversement, le blocage de la eNOS a été associé à une forte diminution des effets de l'entraînement sur la FMD (Green et al., 2004). Chez des patients présentant une maladie coronaire, une augmentation de la production de NO tout comme une diminution du stress oxydant sous l'effet d'un

réentraînement à l'effort ont toutes les deux été associées à une amélioration de la FMD (Edwards et al., 2004a). Une perturbation de la voie de la eNOS pourrait donc être impliquée dans les réponses émoussées de VRA au réentraînement à l'effort retrouvées dans certaines pathologies chroniques, dont la BPCO.

D'autres mécanismes médiant l'effet de l'entraînement sur la VRA ont été également proposés. Le réentraînement en aérobic réduit entre autres la réponse vaso-constrictive sous l'effet de l'ET-1, favorisant la relaxation vasculaire (Bowles et al., 1995; Van Guilder et al., 2007). D'autre part, un rôle pour les progéniteurs endothéliaux circulants dans la médiation du rôle de l'exercice sur la VRA a été proposé.

4.2.2 *La contribution des progéniteurs endothéliaux circulants*

Les progéniteurs endothéliaux circulants ont suscité ces dernières années un grand intérêt dans le champ scientifique de la dysfonction endothéliale. Parmi ces progéniteurs, les cellules endothéliales formant des colonies (ECFC) sont une population de progéniteurs endothéliaux qui partage, avec les cellules endothéliales, un grand nombre de caractéristiques, des marqueurs cellulaires (CD31...) à la fonction de tubulogenèse *in vitro* (Smadja et al., 2019). Ces cellules peuvent être isolées à partir des cellules mononuclées du sang, selon une méthode qui a fait l'objet de récentes standardisations et sont représentatives des dysfonctions de l'endothélium artériel (Smadja et al., 2019).

Le nombre d'ECFC après 7 jours de culture a été montré comme un prédicteur indépendant de la FMD et du risque cardiovasculaire (Hill et al., 2003; Werner et al., 2005). Au-delà du nombre de cellules, la proportion de sénescence, un processus de lente dégradation des fonctions cellulaires, dans la population d'ECFC est également apparue associée à la FMD (Hill et al., 2003). Les ECFC sont impliquées dans la réparation vasculaire et une réduction de leur nombre est associée à une perte de l'intégrité endothéliale (Sabatier et al., 2009; Wassmann et al., 2006), visible notamment *via* une augmentation du nombre de microparticules endothéliales (Sabatier et al., 2009). Si la VRA est altérée lors de dommages endothéliaux, la transplantation d'ECFC permet d'augmenter la réparation endothéliale et de restaurer la VRA (Wassmann et al., 2006). Ainsi, un déséquilibre entre réparations et dégâts vasculaires mène

à une perte d'aptitudes vasculaires (Sabatier et al., 2009) pouvant expliquer des effets limités du réentraînement à l'effort sur la VRA. En effet, l'exercice induit des bénéfices sur un principe de stress/réponse qui pourrait être aboli en l'absence de capacité de réparation de l'endothélium par les ECFC (Hunt et al., 2013; Wassmann et al., 2006).

Le réentraînement à l'effort est connu pour augmenter le nombre et améliorer la fonction de progéniteurs endothéliaux (Laufs et al., 2004a; Sarto et al., 2007; Thorell et al., 2009; Van Craenenbroeck et al., 2010; Yang et al., 2007). Ces améliorations sont accompagnées d'amélioration de la FMD (Steiner et al., 2005). Enfin, les progrès de la FMD sous l'effet d'un réentraînement ont été montrés comme étroitement corrélés à la capacité d'augmentation de la quantité d'ECFC (Steiner et al., 2005). De manière intéressante, la mobilisation des ECFC sous l'effet de l'entraînement en aérobie est apparue dépendante d'une augmentation de l'activité de la eNOS (Laufs et al., 2004b; Steiner et al., 2005; Yang et al., 2007), confirmant le rôle central de cette voie dans l'adaptation vasculaire à l'entraînement. Au total, une altération du nombre et de la fonction des ECFC pourrait être un intermédiaire des conséquences de pathologies chroniques sur la capacité d'amélioration de la FMD en réponse à l'entraînement.

4.3 La vasoréactivité artérielle dans la BPCO

4.3.1 Les altérations à l'état de base

Nous avons évoqué au point 1.6.2 la problématique des comorbidités cardiovasculaires chez les patients BPCO. Ainsi, la mesure de la FMD apparaît comme un outil intéressant de prévention et d'étude des répercussions cardiovasculaires de la BPCO, comme dans le cas de patients présentant des pathologies cardiovasculaires primitives. Plusieurs études ont évalué la FMD à l'état de base chez des patients BPCO et **une méta-analyse synthétique a conclu en faveur d'une altération de la FMD chez les patients BPCO** (Vaes et al., 2017).

Les patients BPCO présentent un taux anormalement élevé de stress oxydant et d'inflammation au niveau circulant (Pinto-Plata et al., 2012), soit directement en contact avec l'endothélium. Ce dernier est par ailleurs particulièrement sensible à l'influence néfaste des

cytokines inflammatoires et des espèces réactives de l'oxygène (Huang & Vita, 2006). En effet, ces éléments sont, entre autres, impliqués dans la perturbation de la voie de synthèse du NO, engendrant le découplage de la eNOS (Griendling & FitzGerald, 2003). Ce découplage crée par ailleurs un cercle vicieux, où la eNOS produit de l'anion superoxyde qui, en interagissant avec le NO, en diminue la biodisponibilité et crée du peroxyde d'azote, une molécule au fort potentiel nitrosylant qui va induire des modifications protéiques délétères, notamment au niveau de la eNOS (Griendling & FitzGerald, 2003). Au niveau des cytokines inflammatoires, des éléments tels que le TNF- α ont été impliqués dans la réduction de l'activité de la eNOS tout comme dans son découplage (Agnoletti et al., 1999). Ainsi, la perturbation de la voie de la eNOS en réponse à l'inflammation et au stress oxydant pourrait expliquer la plus faible FMD chez les patients BPCO. De manière cohérente avec cette idée, **la supplémentation en molécules antioxydantes a été montrée comme bénéfique pour la FMD de patients BPCO** (Ives et al., 2014).

D'autre part, la réduction de l'activité de la eNOS a également été associée à une diminution de la biodisponibilité du BH₄, le cofacteur de la eNOS qui en stimule l'activité, consécutivement à un stress oxydant accru (Scott-Burden, 1995). **Chez le patient BPCO, une supplémentation en BH₄ accroît la FMD, tout comme la phosphorylation de la eNOS** au niveau de cellules endothéliales exposées au sérum de patients post-supplémentation (Rodriguez-Miguel et al., 2018). Ainsi, la biodisponibilité du BH₄ pourrait être un médiateur clef de l'altération de la FMD dans le contexte de la BPCO. Le BH₄ présente également une fonction antioxydante qui pourrait médier une partie des effets de la supplémentation (Rodriguez-Miguel et al., 2018). Bien qu'une dysfonction endothéliale soit présente chez les patients BPCO, associée avec un nombre important de facteurs connus pour induire des perturbations de la eNOS (stress oxydant...) et des indices indirects de baisse de biodisponibilité du NO (Csoma et al., 2019), aucune étude n'a évalué directement l'état de couplage et la phosphorylation de la eNOS chez les patients BPCO.

Chez ces patients, une altération de la fonction des ECFC et une augmentation des dommages de l'ADN et de la sénescence de ces cellules ont été observés (Paschalaki et al., 2013). Or, nous avons vu précédemment que les ECFC jouent un rôle clef dans la réparation vasculaire et sont déterminantes dans la FMD et le risque cardiovasculaire. L'altération des ECFC chez ces patients semble être majoritairement la conséquence d'une exposition à un

stress oxydant important (Paschalaki et al., 2013, 2018). Les effets délétères de ce stress oxydant sur ces cellules semblent être médiés par une réduction de l'expression de la Sirtuin1 et des micro ARN 126, des régulateurs importants de la fonction endothéliale (Paschalaki et al., 2013, 2018). Malheureusement, ces études n'ont pas intégré dans leur design une mesure de la FMD chez les patients BPCO, ne permettant aucune conclusion vis-à-vis du lien entre fonction et sénescence des ECFC d'une part et défaut de FMD chez les patients BPCO d'autre part. Le niveau d'activité physique a été montré comme étant, au-delà de la sévérité, l'un des principaux déterminants de la FMD chez les patients BPCO (Clarenbach et al., 2013). Or, un haut niveau d'activité physique a également été associé à une réduction de la sénescence des ECFC chez le sujet âgé, renforçant l'hypothèse d'un lien entre FMD et ECFC chez les patients BPCO (Witkowski et al., 2010). Cependant, ce lien reste encore aujourd'hui exclusivement hypothétique.

4.3.2 *Le défaut de réponse à l'entraînement*

La réhabilitation respiratoire fait partie de la prise en charge recommandée de la BPCO et cette intervention se base en grande partie sur le réentraînement à l'effort. En réponse à cette intervention, une amélioration de facteurs prédictifs du risque cardiovasculaire en plus des bénéfiques classiquement observés serait extrêmement profitable aux patients BPCO, notamment au regard de l'importante morbi-mortalité attribuable aux pathologies cardiovasculaires dans cette maladie. Malheureusement, **le peu d'étude s'étant intéressé aux variations de FMD en réponse au réentraînement à l'effort, en endurance ou en résistance, chez les patients BPCO ne soutient pas l'efficacité de la réhabilitation respiratoire dans l'amélioration de la VRA** (Brønstad et al., 2013; Gelinas et al., 2017; Iepsen et al., 2016b).

Cependant, le design de ces études ne permet pas de statuer avec confiance sur cette absence d'efficacité. En effet, le peu de facteurs intégrés dans ces analyses rend difficile l'identification de déterminants ayant pu mener à cette absence de réponse. Nous avons décrit au point 4.2.1 que la réponse de la FMD au réentraînement s'établit dans un processus dynamique précis et que les bénéfiques sont maximaux après 4 semaines pour disparaître au profit d'autres adaptations après 8 semaines. Or, les études précédentes évaluaient les patients après minimum 8 semaines de réentraînement, souvent sans groupe contrôle de

surcroît. Ainsi, la possibilité pour ces études d'avoir manqué le pic d'amélioration de FMD est importante. Renforçant cette idée, la seule étude ayant inclus un groupe contrôle n'observe pas d'amélioration de FMD chez les patients BPCO mais également chez les sujets sains contrôles après 8 semaines de réentraînement (Gelinis et al., 2017). Les patients BPCO pourraient ainsi présenter des réponses partielles ou hétérogènes qui, mises en relation avec les déterminants de la FMD évoqués précédemment, pourraient conduire à des stratégies d'optimisation des réponses.

Nous avons vu que la eNOS était au centre des mécanismes conduisant à l'amélioration de la FMD sous l'effet de l'entraînement. Ainsi, les facteurs délétères circulants de l'inflammation et du stress oxydant, impliqués dans des perturbations de la eNOS, pourraient contribuer à émousser la réponse chez ces patients. Nous avons vu que l'activité de la eNOS est également déterminante dans la mobilisation des ECFC. Vu que l'entraînement est source d'un stress endothélial important conduisant à une surcompensation fonctionnelle bénéfique, une mobilisation importante d'ECFC est nécessaire pour augmenter la fonction endothéliale. Les altérations de la voie de la eNOS, tout comme les dégâts directs engendrés sur les ECFC observés dans le cadre de la BPCO (Paschalaki et al., 2013, 2018), pourraient contribuer aux effets limités du réentraînement sur la VRA chez le patient BPCO.

Résumé du chapitre 4

Les troubles de vasoréactivité artérielle (VRA) sont des altérations précliniques précoces présentant une grande valeur prédictive de l'évolution d'une maladie cardiovasculaire existante ou de son apparition chez le sujet asymptomatique. L'amélioration de la fonction endothéliale, sous l'effet de l'entraînement par exemple, permet une forte réduction concomitante du risque cardiovasculaire.

La VRA est étroitement liée à la capacité de production de NO au niveau endothélial *via* la eNOS. Cette enzyme est régulée par de nombreuses voies et est très sensible aux atteintes extérieures, notamment au stress oxydant et à l'inflammation. Le NO permet également la mobilisation de progéniteurs endothéliaux, les ECFC, des cellules jouant un rôle clef dans la VRA et son adaptabilité.

Chez le patient BPCO, la VRA est abaissée à l'état de base. De plus, sous l'effet de l'entraînement, une amélioration uniquement partielle de la VRA pourrait être à déplorer. Les facteurs circulants de la maladie (stress oxydant, inflammation...) pourraient induire des altérations de la voie de la eNOS et des ECFC expliquant les anomalies de VRA.

Cependant, le lien entre ces anomalies cellulaires et la VRA n'a jamais été exploré dans le cadre de la BPCO. Nous avons donc formulé comme dernière hypothèse de ce travail la proposition suivante :

« Des anomalies de la cellule endothéliale et/ou de ces progéniteurs sont engendrées par les facteurs circulants délétères de la BPCO et expliquent le défaut d'adaptation de la vasoréactivité artérielle (VRA) au réentraînement à l'effort chez ces patients. »

Objectifs de thèse

Nous avons pu voir en introduction de ce travail que les patients BPCO présentent de manière fréquente et grave des phénomènes d'intolérance à l'effort et d'atteintes cardiovasculaires. Nous avons vu que les répercussions vasculaires de la maladie, notamment pré-cliniques, étaient impliquées dans ce défaut mais que la prise en charge de ces défauts *via* le réentraînement à l'effort ne produisait qu'un effet partiel chez ces patients.

Ainsi, l'objectif général de cette thèse s'est articulé autour de l'évaluation des déterminants des défauts de réponses vasculaires capillaires et artériels au réentraînement à l'effort chez le patient BPCO.

Au niveau capillaire, sur la base des précédents travaux menés par notre équipe, nous avons pu faire le constat qu'une raréfaction capillaire ainsi qu'un émoussement de la réponse angiogénique en réponse au réentraînement à l'effort étaient présents chez les patients BPCO, mais demeuraient mal caractérisés. Nous avons également évoqué la plus-value importante fournie par l'étude ultrastructurale des capillaires. Ainsi, nous avons pu définir un premier objectif de thèse :

Objectif 1 : Caractériser les anomalies ultrastructurales associées aux phénomènes de raréfaction capillaire et d'angiogenèse musculaire émoussée en réponse au réentraînement à l'effort chez les patients BPCO.

Pour répondre à cet objectif, l'étude n°1 a intégré l'analyse de l'ultrastructure des capillaires sanguins musculaires par microscopie électronique en transmission et ce, avant et après 6 semaines de réentraînement à l'effort chez des patients BPCO mais également des contrôles sédentaires sains (CSS).

Au terme de cette étude, l'absence d'anomalies suggèrera que l'angiogenèse émoussée est due à un problème de stimulation de l'angiogenèse, donc de stimuli trop faibles ou d'un phénomène de résistance aux stimuli.

Au contraire, si nous observons des défauts au niveau de l'ultrastructure des capillaires à l'état de base ou en réponse au réentraînement à l'effort, la thèse d'une réelle atteinte pathologique du capillaire sera étayée. Il convient alors d'explorer les pistes cellulaires et moléculaires pouvant expliquer ces anomalies.

Nous avons évoqué dans la première partie de ce travail deux pistes cellulaires pouvant être à l'origine d'un défaut d'angiogenèse musculaire chez le patient BPCO : le péricyte et/ou la cellule musculaire.

Concernant les péricytes, nous avons émis l'hypothèse que des défauts d'adaptation de la couverture péricytaire sont impliqués dans l'angiogenèse émoussée lors du réentraînement à l'effort chez le patient BPCO et résultent d'effets délétères de facteurs circulants de la BPCO. Ainsi, notre second objectif de thèse était :

Objectif 2 : Rechercher des anomalies d'adaptation de la couverture péricytaire au cours de l'angiogenèse induite par le réentraînement à l'effort chez les patients BPCO et tester l'effet des facteurs circulants de la BPCO sur des déterminants de la couverture péricytaire.

Pour cela, nous avons dans l'étude n°2 étudié la couverture péricytaire des capillaires sanguins musculaires au cours du réentraînement à l'effort chez des patients BPCO et des CSS. Nous avons intégré dans cette étude des évaluations de la couverture péricytaire après 5 et 10 semaines de réentraînement à l'effort et avons intégré deux intensités de réentraînement différentes au sein du groupe de patients BPCO. Cette particularité méthodologique permettra de vérifier que les défauts observés sont d'origine intrinsèque et non le fruit de modalités de durée ou d'intensité d'entraînement particulières.

En effet, si une modalité de réentraînement permet des gains de capacité fonctionnelle et d'angiogenèse similaires aux sujets sains contrôles, alors l'angiogenèse émoussée sera expliquée par des modalités de réentraînement inadéquates.

Dans le cas inverse, les anomalies seront alors le reflet de perturbations intrinsèques au niveau musculaire. Si des anomalies de la couverture péricytaire sont mises en évidence, il est possible qu'elles soient la conséquence de facteurs circulants délétères. Pour cela, l'étude incluait également le test de l'effet de sérum des patients BPCO et CSS post-entraînement sur le détachement et le recrutement péricytaire *in vitro*.

Qu'une anomalie des péricytes soit présente ou non, nous avons également fait l'hypothèse que des anomalies de la réponse pro-angiogénique de la cellule musculaire lors de la stimulation par l'exercice chez le patient BPCO expliquent l'angiogenèse musculaire émoussée en réponse au réentraînement à l'effort de ces patients.

Notre troisième objectif de thèse était donc :

Objectif 3 : Explorer en réponse à une stimulation par l'exercice l'expression de la voie PGC1- α et de ses cascades de signalisation pro-angiogéniques sous-jacentes dans la cellule musculaire issue de patients BPCO ou de sujets sédentaires contrôles.

Pour répondre à cet objectif, dans l'étude n°3 nous avons isolé des cellules musculaires de patients BPCO et de contrôles sédentaires sains et dosé l'expression génique de facteurs conditionnant leur capacité à produire des facteurs pro-angiogéniques en réponse à une stimulation mimant l'exercice en endurance *in vitro*.

La présence d'anomalies de réponse de la cellule musculaire à ce stimulus confiera un rôle à la cellule musculaire dans l'étiologie de l'angiogenèse émoussée chez le patient BPCO.

Cependant, une absence de réponse nous invitera à considérer d'autres voies d'exploration du rôle de cette cellule musculaire avant d'exclure sa contribution dans les défauts d'angiogenèse musculaire du patient BPCO.

Nous avons précédemment décrit le rôle potentiel des atteintes cellulaires dans les défauts de réponse capillaire au réentraînement à l'effort chez le patient BPCO. Or, nous pensons qu'une atteinte cellulaire puisse également expliquer les anomalies présentes au niveau artériel, car l'effet délétère de la BPCO sur les cellules est systémique. Nous avons donc fait l'hypothèse que des anomalies de la cellule endothéliale et/ou de ces progéniteurs sont engendrées par les facteurs circulants délétères de la BPCO et expliquent le défaut

d'adaptation de la vasoréactivité artérielle (VRA) au réentraînement à l'effort chez ces patients. Cette hypothèse nous a menés au dernier objectif de cette thèse :

Objectif 4 : Comprendre les déterminants cliniques, fonctionnels, cellulaires et moléculaires impliqués dans le défaut de réponse de la vasoréactivité artérielle au réentraînement à l'effort chez le patient BPCO.

Dans l'étude n°4, nous avons donc mis au point un protocole permettant d'explorer les facteurs influençant la réponse de VRA au réentraînement à l'effort, en y intégrant des déterminants cliniques et fonctionnels, mais également une caractérisation des défauts pouvant atteindre les voies de signalisation endothéliales dont dépend en partie la VRA. De plus, cette étude intégrait l'isolement de cellules endothéliales progénitrices pour pouvoir adresser leur contribution à la réponse de VRA au réentraînement à l'effort chez le patient BPCO. Enfin, des analyses moléculaires sur des prélèvements sanguins des patients BPCO ainsi que l'exploration de l'effet de ces sérums *in vitro* permettront de comprendre quels facteurs circulants délétères sont impliqués dans ce défaut de réponse.

MATÉRIEL & MÉTHODES

Présentation

Les méthodes expérimentales et le matériel utilisés durant ces travaux de thèse sont décrits dans cette partie, sous la forme de fiches techniques permettant de reproduire les expériences présentées dans la partie *Contribution scientifique*. La démarche méthodologique quant à elle sera décrite pour chaque étude, dans la partie *Contribution scientifique* également, en faisant référence aux fiches techniques présentées ci-dessous. Ces fiches sont classées en trois grandes familles d'expériences :

Les évaluations fonctionnelles : Ces expériences sont réalisées chez les sujets (patients ou sujets sains contrôles) dans l'optique d'obtenir des informations sur la capacité fonctionnelle d'organes spécifiques (muscle strié squelettique, vaisseaux sanguins ...) ou de réponses physiologiques globales au niveau de l'organisme en réponse à un stress (entraînement, effort intense ...). Elles sont conduites de manière non-invasive.

L'analyse de biopsies musculaires : Ces analyses sont réalisées à partir de prélèvement, de manière invasive, d'échantillons de tissu musculaires chez les sujets (patients ou sujets sains contrôles). Elles ont pour but d'étudier les altérations tissulaires (organisation cellulaire ...) mais également moléculaires (expression de gènes ou de protéines ...) conséquence d'une perturbation d'ordre pathologique ou en réponse à une intervention thérapeutique. Elles sont majoritairement basées sur des techniques d'histologie, de microscopie à fluorescence, de biochimie et de biologie moléculaire.

La culture cellulaire : Ces expériences se basent sur la culture primaire de cellules humaines, préalablement isolées de prélèvement tissulaires. L'intérêt va se porter sur la comparaison de caractéristiques cellulaires (prolifération, expression protéique ...) de cellules provenant de sujets différents et/ou de la réponse de ces cellules à des interventions *in vitro* (exposition à du sérum humain, électrostimulation ...). Ces expériences se basent sur des techniques de microscopie à fluorescence, de biochimie et de biologie moléculaire.

Évaluation fonctionnelle

Fiche n° 1 – Évaluation de la force et de l'endurance musculaire.

Principe

Les patients BPCO présentent une réduction de la force et de l'endurance locale musculaire (Jaitovich & Barreiro, 2018). L'évaluation de ces paramètres permet une mesure de la fonction musculaire sans engendrer une grande demande cardiorespiratoire et permet donc de s'affranchir d'une possible limitation sur ce plan chez les patients (Serres et al., 1998). L'évaluation se fait sur segment isolé, habituellement le quadriceps par extension du genou (Serres et al., 1998).

Matériel

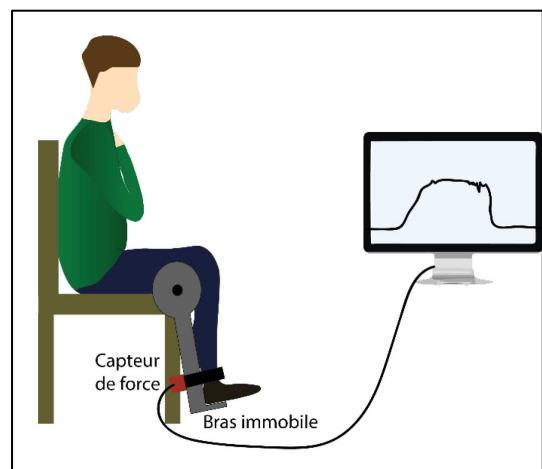
Banc d'exercice
Poids et haltères
Capteurs de force reliés à un ordinateur

Procédure

Évaluation de la force de contraction maximale volontaire du quadriceps.

L'évaluation se fait sur un banc d'exercice comportant un dossier et un bras articulé, qu'il est possible de bloquer. Pour l'évaluation de la force, le bras est réglé individuellement, bloqué et relié au capteur de force. Les deux jambes sont successivement évaluées.

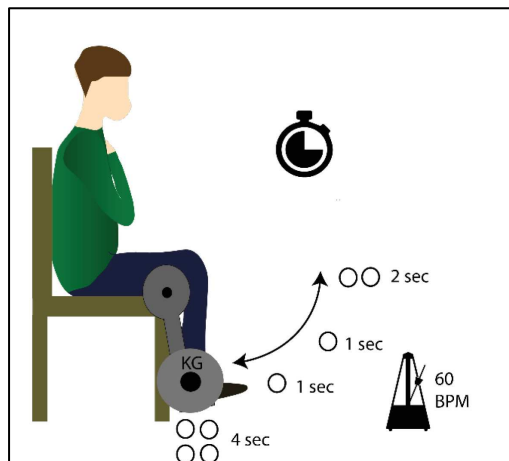
1. Le sujet est installé le genou plié à 90°, la hanche en flexion, les bras croisés sur la poitrine.
2. Le sujet réalise des contractions maximales du quadriceps de 4 secondes, en présence d'encouragements standardisés.
3. Au minimum 3 contractions, espacées de 1 minute, doivent être réalisées.



◆ **Une contraction est valide si un plateau de force d'au moins 1 seconde apparait.**

4. Si les 3 contractions sont valides et reproductibles (moins de 10% de différence entre chaque), la plus haute valeur est conservée. Sinon, jusqu'à 2 contractions de plus peuvent être réalisées.
5. La valeur en Newton est rapportée à la distance du bras de levier (genou-point de pression) puis cette valeur en Newton-mètre est convertie en kilogrammes.

Evaluation de l'endurance du quadriceps.



L'évaluation de l'endurance du quadriceps se fait au travers du temps limite de contraction, sur la jambe présentant la plus haute valeur de force maximale volontaire.

1. Le bras articulé est libéré et une masse équivalente à 30% de la force maximale volontaire (en kg) est ajoutée.
2. Le sujet se trouve dans la même position que lors de l'évaluation de la force maximale volontaire.
3. Le sujet doit réaliser des cycles d'extensions du genou comportant 10 temps, 3 temps d'extension, 3 temps de flexion et 4 temps de repos. Chacun des temps dure 1 seconde et le respect de la vitesse d'exécution du mouvement est contrôlé à l'aide d'un métronome réglé sur 60bpm.
4. Le test est considéré comme fini si le sujet, malgré des encouragements standardisés :
 - Ne respecte plus la vitesse d'exécution du mouvement.
 - Ne réalise pas des extensions de genou complètes.
 - Compense de manière flagrante à l'aide d'autres groupes musculaires.

Dans ce cas, le temps d'exercice (en seconde) est relevé et considéré comme le temps limite d'**endurance du quadriceps**.

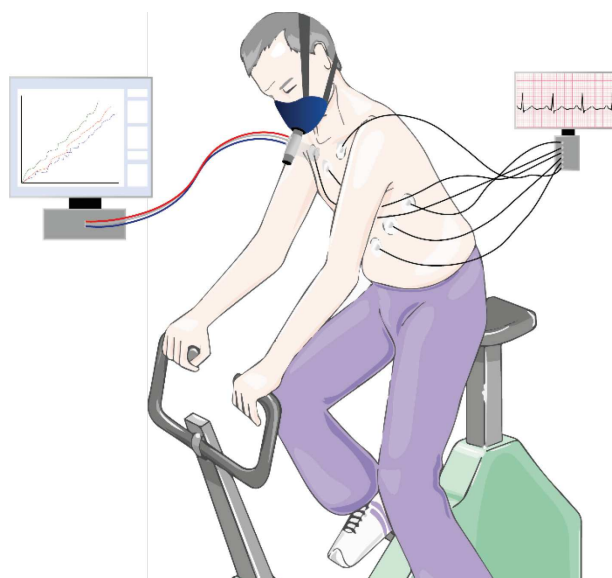
Fiche n° 2 – Epreuve d'effort maximale incrémentale

Principe

L'épreuve d'effort maximale incrémentale (EFX) est un test qui consiste à réaliser un exercice à une intensité augmentant progressivement au cours du temps jusqu'à l'atteinte d'un effort d'intensité maximale. Sont analysés, pour les paramètres cardio-pulmonaires, les cinétiques jusqu'au maximum ainsi que les valeurs maximales, toutes ayant des significations cliniques très précieuses (Radtke et al., 2019) .

Matériel	Fournisseur	Référence
STATION D'ÉPREUVE D'EFFORT CARDIO-RESPIRATOIRE / AVEC VÉLO D'EXERCICE	Exemple : MSE Electronique Medicale	Exemple : CUSTO MC5000

Procédure



- ◆ **L'analyseur des gaz doit être correctement étalonné avant chaque utilisation avec un mélange gazeux contenant 4% de CO₂, 21% d'O₂ et 75% d'azote.**

1. Le sujet est ensuite installé sur l'ergomètre, qui doit être réglé précisément en fonction du sujet.
2. Les électrodes de l'électrocardiogramme sont installées tout comme le tensiomètre.
3. Pour l'installation du masque, l'absence de fuite doit être vérifiée en bouchant avec la main la sortie du masque et en demandant au sujet de souffler. En cas de fuite, changer la taille de masque.
4. L'ensemble des paramètres sont enregistrés au repos.
5. Le programme d'incrémentation est ensuite choisi. Il comprend une phase d'échauffement à une puissance donnée suivi d'une incrémentation d'un certain nombre de watts toutes les minutes. La valeur de départ comme celle de l'incrémentation sont à déterminer en fonction de l'âge, du sexe et de la condition physique du sujet, de manière à ce que l'EFX permette l'atteinte de l'intensité d'effort maximale en 8 à 12 minutes.
6. Durant l'EFX, les variables suivantes sont enregistrées :
 - $V'O_2$: Débit de consommation d'oxygène ($L \cdot \text{min}^{-1}$).
 - $V'CO_2$: Débit de production de CO_2 ($L \cdot \text{min}^{-1}$).
 - Volume inspiratoire (VI) (L).
 - Volume expiratoire (VE) (L).
 - Fréquence respiratoire (FR) (min^{-1}).
 - Fréquence cardiaque (FC) (bpm) à l'aide de l'électrocardiogramme en continu.
 - La saturation artérielle en O_2 (%), en continue à l'aide du saturomètre.
 - La tension artérielle (mmHg) à l'aide du tensiomètre, à chaque pallier.
 - Dyspnée (0-10), à l'aide d'une échelle visuelle analogique chaque minute.
7. Avant le test, les éventuelles contre-indications sont vérifiées, alors que durant l'effort l'absence de critère d'arrêt est monitorée en continu par un médecin formé.

Analyseur des gaz, en continu

AVANT L'EFFORT	DURANT L'EFFORT
<p>Contre-indications absolues :</p> <p><u>Pathologies cardiovasculaires non contrôlées :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Infarctus aigu du myocarde • Sténose coronaire principale gauche ou équivalent • Angor instable • Cardiopathie valvulaire sténotique modérée ou sévère • Arythmies symptomatiques non contrôlées, y compris la fibrillation auriculaire avec une fréquence ventriculaire non contrôlée • Hypertension artérielle sévère non traitée • Syncope • Tachycardies / bradycardies • Endocardite • Bloc auriculo-ventriculaire de haut degré • Myocardite aiguë ou péricardite • Cardiomyopathie hypertrophique • Insuffisance cardiaque incontrôlée • Suspicion d'anévrisme disséquant • Thrombose veineuse profonde des membres inférieurs <p><u>2) Conditions respiratoires non contrôlées</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Embolie pulmonaire • Œdème pulmonaire • Hypertension artérielle pulmonaire sévère • Asthme non contrôlé <p><u>3) Conditions non cardiorespiratoires non contrôlées</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Infection • Insuffisance rénale • La thyrotoxicose • Saignement aigu • Troubles électrolytiques <p><u>4) Grossesse avancée ou compliquée.</u></p> <p>Contre-indications relatives :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Saturation en oxygène au repos (SpO2 ≤ 85% sur l'air ambiant) • Déficience orthopédique qui compromet la performance physique. • Déficience mentale ou cognitive entraînant une incapacité à coopérer 	<p>Critères d'arrêt absolus :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Chute de la pression artérielle systolique (sous les valeurs basales), malgré l'augmentation de la charge • Douleur angineuse modérée à sévère • Sus-décalage du segment ST en l'absence d'onde Q • Signes de bas débit (cyanose, pâleur, troubles cérébraux) • Tachycardie ventriculaire soutenue <p>Critères d'arrêt relatifs</p> <ul style="list-style-type: none"> • Douleur angineuse croissante • Sous-décalage du segment ST majeur • Changement d'axe de QRS marqué • Trouble du rythme de gravité moindre (ESV multifocales, triplets, salves) ou de conduction • Fatigue, dyspnée, crampes ou claudication • Pression artérielle systolique > 250 mmHg ou diastolique > 115mmHg <p><i>Contre-indications et critères d'arrêt de l'épreuve d'effort maximale incrémentale (d'après Graz et al., 2009 & Radtke et al., 2019)</i></p>

8. L'EFX est considérée comme maximale si au moins un des critères suivant est validé (Radtke et al., 2019):

- La VO_2 présente un plateau malgré l'augmentation de la charge.
- Le quotient respiratoire (QR) est supérieur à 1.05.
- La fréquence cardiaque (FC) est supérieure à 100% de la FC théorique.
- La ventilation atteint 85% ou plus de la ventilation maximale volontaire.
- La lactatémie sanguine est supérieure ou égale à 8 mmol. L⁻¹.

9. En l'absence d'atteinte d'au moins deux des critères précédents une VO_{2pic} est rapportée. En cas d'épreuve limitée par une manifestation pathologique (e.g. Épuisement de la réserve ventilatoire chez un patient insuffisant respiratoire), une VO_2 symptôme-limitée peut être rapportée.

10. Les paramètres, particulièrement le rythme cardiaque, doivent être enregistrés et surveillés au moins 3 minutes suivant l'arrêt de l'effort, durant la phase de récupération.

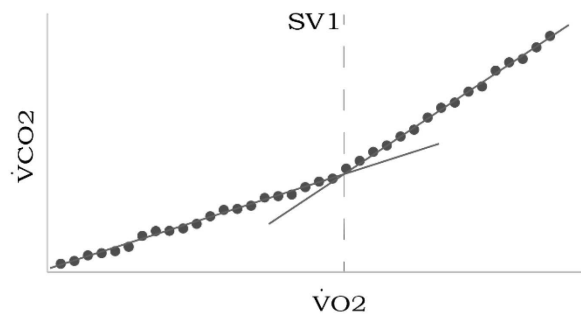
Calculs

Sur la base des variables mesurées, un certain nombre de calculs permettent d'obtenir des informations supplémentaires. En général, sont calculés :

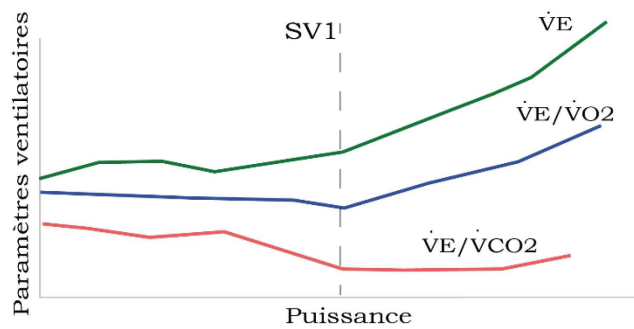
- Le débit ventilatoire ($V'E$) (L.min⁻¹) : $\dot{V}E = (VI + VE) \times FR$
- Le quotient respiratoire (QR) : $QR = \left(\frac{\dot{V}CO_2}{\dot{V}O_2} \right)$. Ce paramètre permet d'obtenir l'origine de la fourniture d'énergie : un QR = 0.7 correspondant à un recours exclusif à l'oxydation des lipides alors qu'un QR = 1 correspond à une utilisation exclusive des glucides.
- Le premier seuil ventilatoire (SV1) : Bien que controversé, est un paramètre intéressant pour apprécier la capacité d'endurance d'un sujet. Il est habituellement réduit dans le cadre de maladies chroniques comme la BPCO. Ce premier seuil permet de cibler une intensité de réentraînement individualisée correspondant à l'intensité maximale avant la survenue d'une dérive ventilatoire pouvant mener à un inconfort chez des patients BPCO. Le réentraînement à l'intensité correspondant au SV1 permet de meilleurs résultats qu'une intensité fixe (e.g. 60% de $V'O_2$) (Vallet et al., 1997a). La détermination du SV1 est faisable d'après les tracés de $V'O_2$, $V'CO_2$ et $V'E$ de l'EFX. Le SV1 est caractérisé par une augmentation brusque de la production de CO_2 , et

donc de la $\dot{V}'E$, qui deviennent toutes les deux disproportionnées par rapport à la $\dot{V}'O_2$. Plusieurs méthodes permettent d'identifier ce découplage, résumées dans la figure ci-dessous. Dans le cadre de nos études, nous croisons les méthodes et faisons la détermination des seuils suite à l'avis concordant de deux opérateurs différents, se basant chacun sur deux méthodes *a minima*.

a. Méthode de Biever



b. Méthode de Wasserman



Fiche n° 3 – Evaluation de la fonction endothéliale (EndoPAT)

Principe

La technologie PAT® (Peripheral Arterial Tone) permet la mesure du tonus artériel des lits artériels périphériques de manière non-invasive. Le signal PAT® est mesuré au bout du doigt et enregistre les variations de volume digital sous l'effet du pouls artériel. L'appareil EndoPAT2000 se base sur la technologie PAT® et permet la mesure simultanée des variations de volume digital des index droit et gauche à l'aide de sonde pléthysmographiques. Cette mesure présente l'avantage d'intégrer de fait un contrôle controlatéral lorsqu'on évalue l'hyperémie réactive post-occlusive sur un bras. L'indice d'hyperémie réactive (RHI) est calculé à l'aide de la formule suivante : $RHI = \frac{DH_{PO}}{DH_{BASE}} / \frac{DC_{PO}}{DC_{BASE}}$, où DH : Amplitude de pouls du doigt hyperémique ; DC : Amplitude de pouls du doigt contrôle ; BASE : Pre-occlusion ; PO : Post-occlusion. Le RHI a été validé comme indicateur de la (dys)fonction endothéliale (Yeboah et al., 2007).

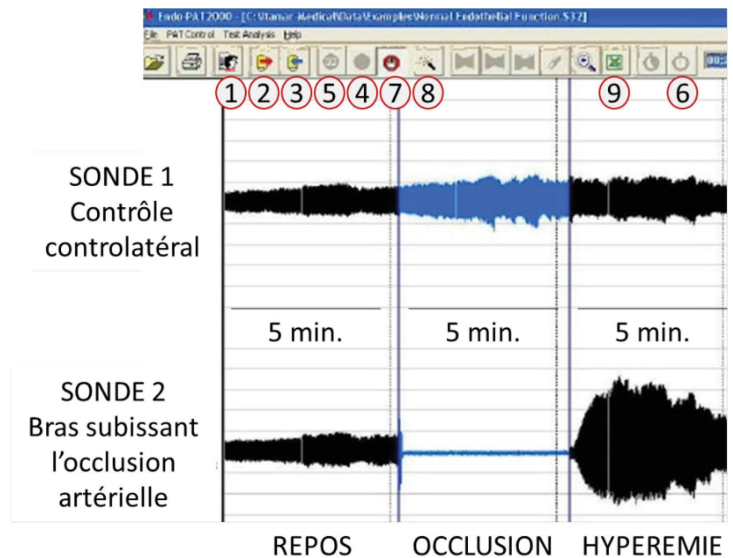
Matériel	Fournisseur	Référence
EndoPAT2000	Itamar Medical	OM1695214
2 sondes compatibles par test + 2 anneaux digitaux en mousse.	Itamar Medical	
Tensiomètre		
Repose bras en mousse	Itamar Medical	

Procédure

◆ **Avant de commencer le test, le sujet doit être au repos total depuis au moins 30min. Toutes prises alimentaires ainsi que de café ou de nicotine doivent être évitées dans les 2 heures précédant le test.**

1. Le sujet est installé en position semi-assise ou allongée en fonction des capacités respiratoires.
2. Mettre la clef USB sur l'ordinateur et brancher le câble USB de l'appareil.

3. Ouvrir le logiciel : Si l'icône PAT en bas à droite de l'écran ainsi que la diode sur l'appareil sont allumées en vert, la communication est OK.
4. Commencer par prendre la tension artérielle au niveau du bras dominant.
5. Renseigner la fiche patient (bouton 1, figure ci-dessous) en indiquant les pressions systoliques et diastoliques mesurées.
6. Placer les 2 supports en mousse de part et d'autre du patient, brancher les sondes au bout des câbles puis les placer dans les trous prévus à cet effet dans les supports en mousse.
7. Placer le brassard pneumatique au niveau du bras dominant du patient.
8. Mettre l'anneau bleu sur le majeur du patient et y clipper le câble.
9. Demander au patient de placer ses index dans chacune des sondes, en butée.



10. Appuyer sur le bouton « Deflate » (bouton 2) puis une fois les sondes dégonflées cliquer sur « Inflate » (bouton 3).

◆ **Une fois les sondes bien gonflées, placer les mains du patient dans le vide, la limite du support doit être au niveau de la limite distale de la paume.**

11. Appuyer sur Test Standby (bouton 4). Repérer les sondes en les tapotant et vérifier que le signal est bon. A cette étape, le processus peut encore être stoppé pour un éventuel ajustement sans perdre les sondes.

◆ **IMPORTANT : Le test de standby ne doit PAS dépasser 5 min, sinon le test est à recommencer et les sondes à jeter.**

12. Si le signal des 2 sondes est bon et que le sujet est prêt, appuyer sur «GO » (bouton 5).

13. Lancer également le chronomètre (bouton 6)

14. **PHASE 1** : 5 minutes au repos.

◆ **IMPORTANT : Faire 5 min MINIMUM donc plutôt 5min20 sinon le test sera invalide.**

15. **PHASE 2** : Gonfler le brassard à 200 mmHg minimum et/ou ou 60 mmHg de plus que la valeur pression systolique du patient.

16. Maintenir l'occlusion durant 5min minimum.

◆ **Être attentif à garder la pression constante et éviter à tout prix les mouvements.**

17. **PHASE 3** : Lever l'occlusion et enregistrer durant 5min20.

◆ **Bien prévenir le patient de ne pas bouger malgré les fourmis dans les doigts.**

18. A la fin du test appuyer sur le bouton STOP (bouton 7) puis sur la baguette magique (bouton 8).

Si le test est valide, la zone d'obstruction va apparaître en bleu et la valeur d'hyperémie réactive (RHI) va apparaître à droite de l'écran.

Pour plus d'informations sur le test, il est également recommandé d'imprimer le rapport au format .xlsx à l'aide du bouton 9.

Fiche n° 4 – Réentraînement à l'effort

Principe

Le réentraînement à l'effort fait partie intégrante du traitement de nombreuses maladies chroniques dont la BPCO (Spruit et al., 2013). Il est associé dans la prise en charge de ces pathologies à une approche multidisciplinaire appelée réhabilitation respiratoire, intégrant des aspects d'éducation thérapeutique, de changement de comportement, de support psychologique, etc. Comme nous pensons que les effets vasculaires sont principalement médiés par l'action du réentraînement à l'effort, nous avons spécialement travaillé sur l'harmonisation du protocole de ce dernier. En effet, les études portant sur l'effet de ce réentraînement sont nombreuses, mais pas toujours comparables du fait de disparités dans les protocoles de réentraînement. L'idée ici est de proposer un protocole de réentraînement à l'effort bien défini qui nous permettra d'harmoniser cette intervention entre les différents centres de notre étude clinique multicentrique DysEndoBPCO.

Matériel
Cycloergomètres
Poids et haltères
Elastiques de différentes raideurs
Saturomètre
Cardiofréquencemètre

Procédure

L'entraînement, composé d'un mixte d'exercice en endurance et en résistance, est conduit sur plusieurs semaines (5-6 semaines pour l'étude n°1 et 3, 10 pour l'étude n°2 et 4 pour l'étude n°4).

Entraînement aérobie sur cycloergomètre (50minutes, 3 séances par semaine) :

1. Les patients sont installés sur les cycloergomètres.
 - ◆ **Bien penser à prendre de temps de régler les ergomètres. Le mieux étant de garder le même pour chaque patient d'une séance à l'autre.**
2. L'entraînement débute par une phase d'échauffement à la fréquence cardiaque (FC) atteinte à 30% de la puissance maximale aérobie lors de l'EFX d'évaluation (Fiche 3).

3. Après 5 minutes d'échauffement, la résistance de l'ergomètre est augmentée pour atteindre la FC associée au premier seuil ventilatoire (SV1) lors de l'EFX initiale (Fiche n°3). Cette intensité d'effort est maintenue durant 10 minutes.
4. La résistance est ensuite diminuée pour un retour à la résistance d'échauffement pour 5 min.

◆ **On alterne de cette manière 3 blocs de 15 min (10min au SV1, 5min à 30%) pour 45 min d'effort, 50min avec l'échauffement.**

Séance 1 .../.../...	Watts CIBLE	Fc SV CIBLE	5'			10'			5'			10'			5'			10'			5'		
			Ech		Palier 1			Recup			Palier 2			Recup			Palier 3			Recup			
			FC	Watts	Sat	FC	Watts	Sat	FC	Watts	Sat	FC	Watts	Sat	FC	Watts	Sat	FC	Watts	Sat	FC		
Patient 1	60	106																					
Patient 2	85	121																					
Patient 3	25	125																					
Patient 4	20	105																					
Patient 5	80	128																					
Patient 6	20	95																					
Patient 7	70	93																					
Patient 8	90	128																					

◆ **Points importants :**

- La FC doit être contrôlée *a minima* 2 fois par pallier, le mieux étant un contrôle en continu.
- L'intégralité de la séance (nombre de Watts, FC, saturation artérielle en O₂ pour chaque seuil et chaque patient) doit être rapportée pour permettre un suivi de l'évolution des charges et de l'observance au cours des séances.
- Si l'entraînement est efficace, le maintien d'un travail aux FC cibles nécessitera une **augmentation de la charge de semaine en semaine.**
- Dans le cas d'une évaluation intermédiaire en cours de protocole, si les valeurs de seuils ventilatoires sont modifiées par rapport à la mesure pré-entraînement, l'intensité de réentraînement doit être ajustée.

Renforcement musculaire analytique (1heure, 1-2 séances par semaine) :

Le renforcement musculaire doit être conduit sur 8 à 10 groupes musculaires, comprenant des séries de 8 répétitions sur 2 séries. Une à deux répétitions par semaine sont ajoutées pour atteindre 12-14 répétitions la dernière semaine du programme.

Le réentraînement est commencé à 30% de la force maximale développée sur une répétition (1-RM). La détermination du 1-RM étant un exercice délicat et potentiellement dommageable

pour des personnes âgées et/ou présentant une maladie chronique, nous faisons le choix d'utiliser une valeur de 1-RM estimée, à l'aide de la méthode de Brzyski (Brzyski, 1993). L'intensité d'effort est ensuite progressivement augmentée pour atteindre 60-70% de la 1-RM en fin de programme. Dans le cas d'exercices nécessitant le recours à des élastiques, sans quantification possible de la charge, l'objectif est de pratiquer l'activité en ciblant une intensité d'effort de 5-6 sur 10 sur une échelle visuelle analogique d'effort perçu, de manière standardisée, comme recommandé par les sociétés savantes (Nelson et al., 2007). L'effort perçu évoluant avec les progrès, une augmentation de la tension des élastiques pour un même degré d'effort perçu devrait être observé au fil du programme.

Poids optimal	Poids le plus lourd que le patient peut soulever 5 à 10 fois.			
Répétitions	Nombre de répétition réalisée avec le poids optimal			
METHODE D'ESTIMATION DE BRZYSKI (Brzyski, 2013 <i>JOPERD</i>)				
Patient 1 (exemple)	A remplir		Calcul automatique	
GROUPE MUSCULAIRE	Poids optimal (kg)	Répétitions (n)	1 RM prédit (kg)	Intensité cible - 30% de 1RM (kg)
Biceps	10	6	11,61	3,48
Triceps	13	7	15,60	4,68
Quadriceps	22	5	24,75	7,43
Dorsaux	14	9	18,00	5,40
....				

Analyses de biopsies musculaires.

Fiche n° 5 – Prélèvement et conditionnement de biopsies musculaire humaines

Principe

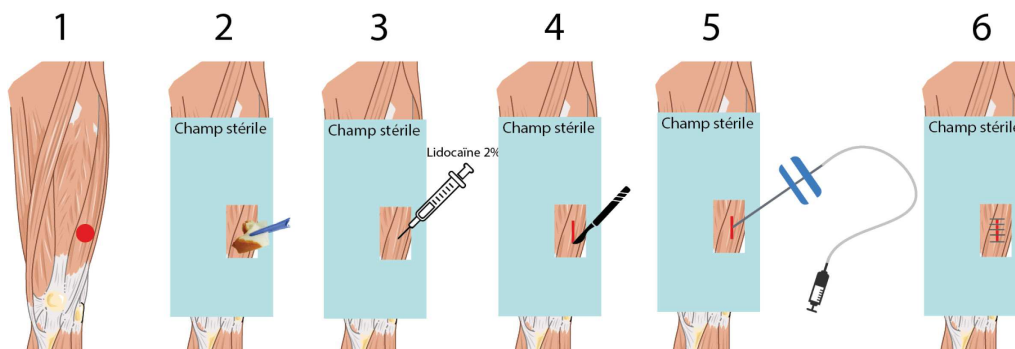
La biopsie musculaire, prélevée à l'aide de trocart, est une technique qui permet de prélever un échantillon musculaire humain de manière relativement aisée (Hayot et al., 2005). En effet, cette technique ne nécessite qu'une anesthésie locale, n'engendre que des douleurs modérées et ne donne lieu qu'à de très rares complications. Elle permet en outre le prélèvement d'une quantité de muscle suffisante pour de multiples analyses ultérieures.

Matériel	Fournisseur	Référence	
Cryostats Cryotome™	Thermo Scientific		
UltraMicrotome	Leica, UltraCut E		
Azote liquide			
Scalpel / Champs et équipements stériles			
Seringue et tubulure stérile			
Sutures cutanées adhésives			
Trocart à usage unique KBM 6/10 de 5 mm de diamètre	Laurane Médicale		
Corning CoolCell	Sigma	CLS432011	
Cryotubes			
Réactifs	Fournisseur	Référence	Conservation
Lidocaïne chlorhydrate 2%	Fourniture médicale de pharmacie		
Glutaraldehyde	Sigma	340855	T°A
Acetate d'uranyle	Agar scientifique	AGR1260A	T°A
Citrate de plomb	Sigma	15326	T°A
Tetroxide d'osmium	Sigma	201030	T°A
Résine EmBed 812	Fisher Scientific	50-980-446	T°A
Isopentane	Sigma-Aldrich	PHR1661	T°A
Ethanol anhydre	Fisher Scientific	12377103	T°A
Sérum de Veau Foetal (SVF)	Dutscher	S11971S1810	-20°C / 4°C
Dimethyl sulfoxyde (DMSO)	Sigma	D2650	T°A

Procédure

◆ **Nous nous sommes intéressé dans ce travail aux effets chroniques de l'exercice. Ainsi la biopsie était réalisée au minimum 48h après la dernière séance de réentraînement à l'effort.**

5. Après repérage [1], au niveau de la jonction du tiers moyen-inférieur de la cuisse (15cm au-dessus de la patella), une asepsie de la zone est réalisée [2].
6. Une anesthésie locale est réalisée à l'aide d'environ 5mL de Lidocaïne chlorhydrate 2% [3].
7. Une incision de 1cm, parallèle à l'axe du fémur, est effectuée à l'aide d'un scalpel [4].
8. Le trocart est ensuite inséré jusqu'à 1 cm sous l'aponévrose du vaste latéral où le prélèvement d'un échantillon de 200 à 300 mg est effectué. L'échantillon est aspiré à l'aide d'une seringue et d'une tubulure stérile actionnées par un assistant [5].
9. La plaie est ensuite refermée à l'aide de sutures cutanées adhésives [6].



Traitement de l'échantillon

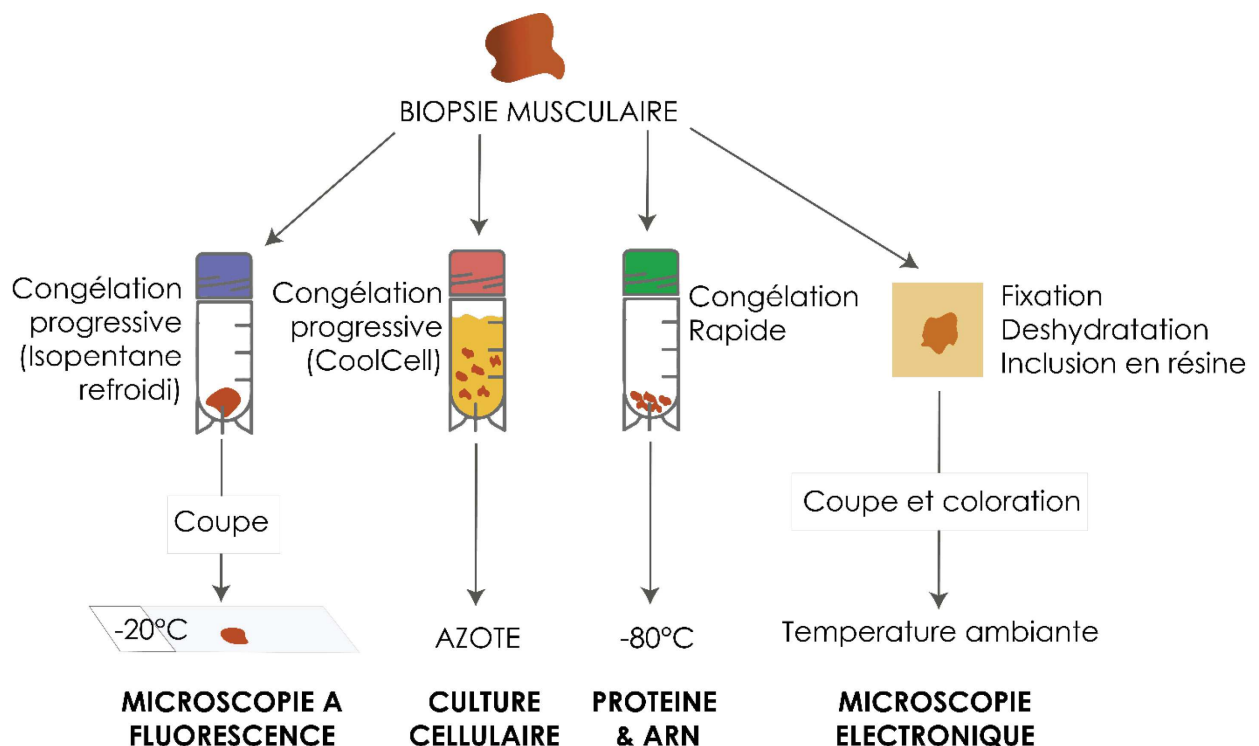
Le prélèvement est traité au plus vite par un ou plusieurs assistants, à l'aide de matériel stérile.

Il est séparé en 4 parties, traitées selon 4 modalités :

1. **Congélation progressive :** Congélation préalable dans de l'isopentane pré-refroidi à l'azote liquide puis transfert dans l'azote liquide. L'échantillon est ensuite utilisé pour réaliser des cryosections de 14µm d'épaisseur à l'aide d'un Cryostats Cryotome™. Les cryosections sur lames sont ensuite stockées à -20°C en attendant les analyses d'immunofluorescence (fiche n°6).
2. **Congélation directe :** Congélation immédiate dans de l'azote liquide. Stockage à -80°C en attendant l'extraction des protéines et ARN totaux (fiche n°8).
3. **Congélation pour culture cellulaire :** Le morceau de biopsie est plongé dans un cryotube contenant 1mL de SVF/10% DMSO et recoupé directement dans le tube en petits cubes (~1.5 mm de côté) à l'aide de ciseaux stériles. Le cryotube est placé dans un compartiment de boîte de congélation pour cellules (CoolCell par ex.), placé rapidement à -80°C pour 24h et ensuite stocké dans des vapeurs d'azote en attendant l'extraction des cellules (fiche n°10).

4. Traitement pour analyses en microscopie électronique :

- a) Fixation 1 : Solution 2.5% glutaraldehyde dans un tampon PHEM (18.14 g Pipes, 6.5 g Hepes, 3.8 g EGTA, 0.99 g MgSO₄, pH 7.0 w/ KOH).
- b) Recoupe en morceaux de 12 mm³.
- c) Fixation 2 : Solution de 0.5 % de tetroxide d'osmium. 2h dans le noir, T° ambiante.
- d) Déshydratation : Série de bains à l'éthanol 30-100%.
- e) Imprégnation : Résine EmBed 812.
- f) Coupe : Transversale, 70nm d'épaisseur à l'aide d'un UltraMicrotome.
- g) Coloration : Acetate d'uranyle et citrate de plomb avant prise d'image et analyse (fiche n°7).



Fiche n° 6 – Analyse de la couverture péricytaire par immunofluorescence

Principe

L'analyse de cryosections musculaires par immunofluorescence permet de mettre en évidence l'expression de protéines spécifiques de manière à révéler différents types cellulaires. Il est également possible, grâce à une quantification de l'intensité de fluorescence, de quantifier l'expression relative de protéines spécifiques dans le tissu. Pour cela, la protéine est reconnue à l'aide d'un anticorps primaire spécifique de cette protéine. Ensuite, un anticorps secondaire dirigé contre l'espèce d'origine de l'anticorps primaire et couplé à un fluorochrome à longueur d'onde d'excitation et d'émission spécifique est ajouté. Cela nous permet à l'aide d'un microscope à fluorescence de faire apparaître en couleur les protéines marquées par le couple anticorps primaire et secondaire.

Matériel	Fournisseur	Référence	
Microscope à fluorescence multicanal			
Stylo DakoPen	Dako	S200230-2	
Lames & Lamelles	Dutcher	140619	
Cônes stériles de 10, 200 et 500 µL avec filtres			
Chambre humide			
Tube de 1.5 stérile			
Pipeteur de 2.5, 10, 20, 200 et 500 µL			
Réactifs	Fournisseur	Référence	Conservation
Anticorps anti-CD31, Souris (1/100)	BD Pharma.	550389	4°C
Anticorps anti-NG2, Lapin (1/100)	Abcam	ab83178	-20°C
Anticorps anti- αSMA, Souris (1/100)	Abcam	ab7817	-20°C
Anti-mouse Alexa Fluor® 488, Donkey (1/1000)	InVitrogen	A32766	4°C
Anti-rabbit Alexa Fluor® 555, Goat (1/1000)	InVitrogen	A32727	4°C
Milieu de montage Fluoroshield™	Sigma-Aldrich	F6182	4°C
DAPI (1/10000)	Abcam	ab228549	4°C

Procédure

1. Sortir les cryosections musculaires [voir fiche n°5 pour procédure de cryosection] du congélateur (5 à 10 coupes) et les placer dans la chambre humide.
2. Une fois la coupe décongelée (5-10 min.), tracer un trait circulaire au stylo DakoPen autour de la coupe.

◆ **Ne pas faire le trait trop proche de la coupe, risque d'auto fluorescence.**

3. Faire une solution d'anticorps primaire, en diluant les anticorps dans du PBS 1X, en suivant les concentrations indiquées dans la partie *Réactifs*.

◆ **Penser à centrifuger les tubes d'anticorps 20s. / 10 000 g avant de prélever.**

4. Déposez délicatement 100µL de solution sur chaque coupe.

🕒 **Incubation | 1h | T° ambiante**

5. Faire 4 lavages avec 200µL de PBS 1X par coupe.
6. Faire le mix d'anticorps secondaires. Diluer le DAPI dans un tube de 15 mL puis prendre 1 à 2 mL de cette solution (en fonction du nombre de coupe) et y diluer les anticorps secondaires.

◆ **Penser à centrifuger les tubes d'anticorps 20s. / 10 000 g avant de prélever.**

7. Déposer 200µL de la solution d'anticorps sur chaque coupe.

🕒 **Incubation | 1h | T° ambiante | dans le noir**

8. Faire 4 lavages avec 200µL de PBS 1X par coupe.
9. Mettre une goutte de milieu de montage sur chaque coupe et y déposer délicatement la lamelle.

🕒 **12 à 24 h | 4°C | dans le noir**

10. Analyse au microscope.

◆ **Pour les images destinées aux analyses d'intensité de fluorescence, la durée d'excitation doit être la même pour toutes les conditions.**

Quantification du pourcentage de pericyte α SMA positifs

1. Ouvrir dans ImageJ les images du canal vert (C1) et rouge (C2) correspondant respectivement aux marquages anti α SMA et anti-NG2.
2. Lancer la macro « AnalyseSMA.ijm » dans le logiciel ImageJ.

```

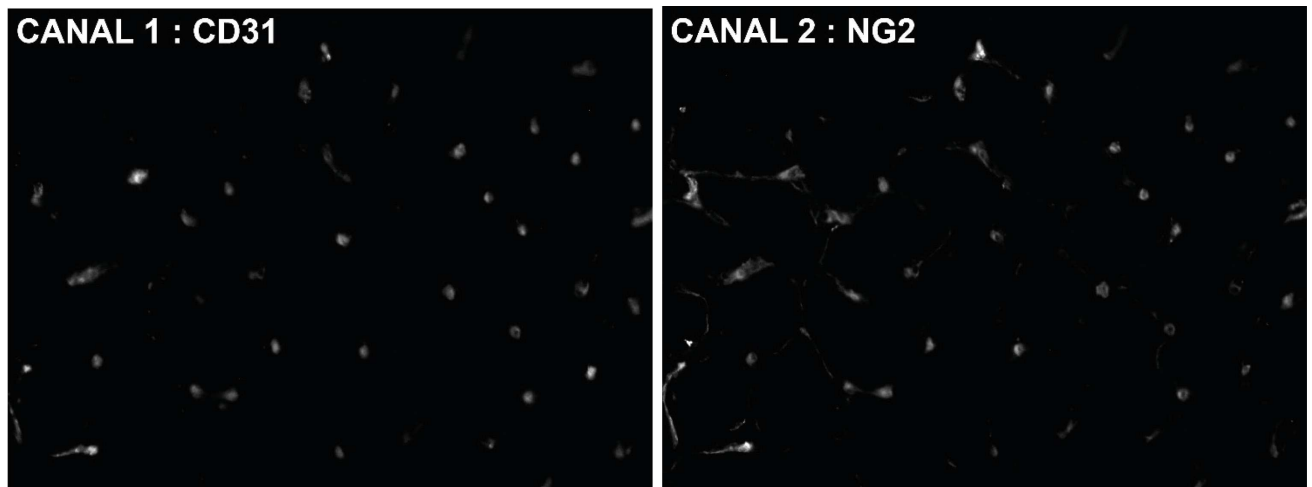
1 selectWindow("Expo 3_c2.tif"); ## Selection de L'image
2 run("Threshold..."); ## Seuillage de L'image
3 waitForUser; ## Paramétrer Le seuil de façon à capter 95% du signal
4 run("Convert to Mask"); ## création d'un masque d'écrêtage à partir du marquage NG2 = Péricytes
5 run("Analyze Particles...", "size=0.008-Infinity display clear add");
6 ;## Comptage du nombre de péricyte -> Copier Les résultats dans Excel.
7 close();
8 selectWindow("Expo 3_c1.tif");
9 run("Clear Results");
10 roiCount = roiManager("count");
11 for (i=0; i<roiCount; i++) {
12     roiManager("select", i);
13     run("Measure");
14 }
15 ;## Mesure du niveau de gris du marquage αSMA à L'intérieur du masque créé à la ligne 4,
16 ;## donc à L'intérieur des péricyte. Après différentes mises au points,
17 ;## il a été déterminé qu'un niveau > 20 indique un péricyte αSMA positif. |

```

3. Sur Excel, calculer ratio entre le nombre de zone (i.e. péricytes) avec un gris moyen de marquage α SMA >20 et le nombre de zone total.

Quantification de la couverture péricytaire

1. Ouvrir dans ImageJ la photo issue du canal 1 (CD31 : capillaires) ou canal 2 (NG2: péricytes).



2. Fixer manuellement le seuil de coupure du bruit de fond (Fonction Threshold, over/under, Huang), réduire au minimum puis augmenter jusqu'à disparition des halos noirs entourant les points de signal.
3. Effacer les éventuels artefacts de signal (contrôle visuel).
4. A l'aide de la fonction Analyze Particles, calculer le nombre de points de signal, en fixant comme seuil de détection $0,01 - \infty$ inch² pour les images c1 (capillaires) et $0,008 - \infty$ inch² pour les images c3 (péricytes).

5. Enregistrer les valeurs d'aire de chaque point en c1 et c3 et les additionner pour chaque canal puis calculer le ratio APc/AC (Aire cumulée en c3/Aire cumulée en c1) qui constitue un indice de couverture périocytaire (Caporali et al., 2015; Fukada & Kajiya, 2020b; Giannibarrera et al., 2016; Vono et al., 2016).

Validation de la méthode

A	Variables	Mesure 1	Mesure 2	Concordance de Lin ¹	
	Ratio Pc/Cap	0,86 ± 0,29	0,86 ± 0,26	$\rho_c=0,96$	Reproductibilité intra-opérateur
	Ratio Apc/Cap	0,68 ± 0,46	0,67 ± 0,44	$\rho_c=0,95$	
	Capillaires (nombre)	28,88 ± 6,15	28,5 ± 5,88	$\rho_c=0,96$	Validité externe

B	Courbe ROC	C	Seuil : 0,008 inch ²	Standard (comptage manuel 40x) ²			
			Nouvelle méthode ▼	▼	Péricyte	Non-péricyte	total
			Compté comme péricyte	VP = 130	FP = 1	131	
			Non-Compté comme péricyte	FN = 10	VN = 126	136	
			Total	140	127	267	
			Kappa de Cohen	K = 0,92			

Résultats des tests de validité de la méthode de comptage semi-automatisée. A. Validité intra- opérateur et validité externe (mesure 1 : nouvelle méthode; mesure 2 : standard ⁴). B. Courbe ROC résumant les valeurs de sensibilité (Se) et de spécificité (Sp) en fonction de différents seuils de détection des péricytes testés (inch²).

C. Erreurs de détection (FN et FP) et concordance (Kappa de Cohen) entre la nouvelle méthode et la méthode standard pour la détection des péricytes. VP= Vrai Positif; FP= Faux Positifs; FN= Faux Négatifs; VN= Vrai Négatifs.

Fiche n° 7 – Analyse de l’ultrastructure capillaire musculaire

Principe

L’acquisition d’images de sections transverses musculaires en microscopie électronique permet une analyse de l’ultrastructure des capillaires sanguins musculaires au travers d’analyses morphométriques et d’évaluations qualitatives (présence/absence d’un phénomène). Le but est de comparer l’ultrastructure de ces capillaires entre deux conditions (e.g. sujet sain vs patient BPCO), des modifications visibles entre deux conditions pouvant avoir une signification biologique.

Acquisition des images

1. Les images sont acquises à l’aide d’un microscope électronique (Tecnai F20 à 120kV) à partir des coupes obtenues précédemment (fiche n°5). La plupart des manipulations et réglages sont effectués par l’ingénieur de recherche en charge de la plateforme.
2. La coupe est balayée méthodiquement et dès qu’un capillaire est repéré, une photo de ce dernier est capturée avec un zoom éventuel sur des événements notables. Tous les capillaires de la coupe sont capturés.

Analyse des images

1. Ouvrir l’image dans ImageJ et l’étalonner avec la fonction *Set Scale*
2. Réaliser l’entourage à la main des différentes structures (Lumière, Endothélium, membrane basale et péricytes) pour obtenir leur aire (A) et leur périmètre (P).

◆ **Permet le calcul de l’épaisseur de ces structures et leur volume relatif, en suivant les équations suivantes :**

- Epaisseur de la lumière = $2 \cdot A_{\text{Lumière}} / P_{\text{Lumière}}$
- Epaisseur de l’endothélium = $2 \cdot [(A_{\text{ENDOTHÉLIUM}} - A_{\text{Lumière}} - A_{\text{Nucl}}) / (P_{\text{ENDOTHÉLIUM}} + P_{\text{Lumière}} + P_{\text{Nucl}})]$
- Epaisseur de la membrane basale = $2 \cdot [(A_{\text{MEMBRANE BASALE}} - A_{\text{ENDOTHÉLIUM}} - A_{\text{Péricyte}}) / (P_{\text{MEMBRANE BASALE}} + P_{\text{ENDOTHÉLIUM}} + P_{\text{Péricyte}})]$
- Volume relatif de la lumière = $A_{\text{Lumière}} / A_{\text{MEMBRANE BASALE}}$
- Volume relatif de l’endothélium = $[(A_{\text{ENDOTHÉLIUM}} - A_{\text{Lumière}}) / A_{\text{MEMBRANE BASALE}}]$

- Volume relatif de la membrane basale = $[(A_{\text{MEMBRANE BASALE}} - A_{\text{ENDOTHÉLIUM}})/A_{\text{MEMBRANE BASALE}}]$
- Volume relatif des péricytes = $A_{\text{Péricyte}}/A_{\text{MEMBRANE BASALE}}$
- Densité de noyau endothéliaux (ECNucl) = $A_{\text{ECNucl}}/(A_{\text{ENDOTHÉLIUM}} - A_{\text{Lumière}})$

3. Tracer une grille avec des carrés de $0.5625 \mu\text{m}^2$ (image B). Compter le nombre de carrés contenant :

- de la Lumière (PL)
- de l'Endothélium (PE)
- de la Membrane Basale (PMB)
- des Péricytes (PPc)
- une partie du capillaire (Ptot).

◆ Permet le calcul du volume : $Vv = P_{\text{structure}} / P_{\text{tot}}$

4. Toujours sur l'image B, compter les ratios :

Nb Lignes croisant le contact EC/BM et un péricyte -> **Couverture péricytaire**

Total NbLignes croisant le contact EC/BM

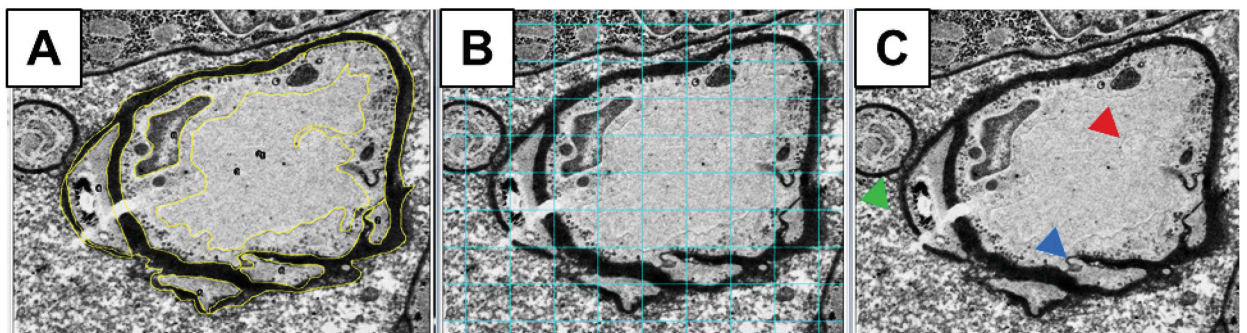
NbLignes croisant le contact EC/Lum et une projection intraluminaire -> **projections intra-luminales**

Total NbLignes croisant l'interface EC/Lum

5. Analyse semi quantitative (image C). Noter la présence pour chaque capillaire :

- D'un contact Pc / Ec (flèche bleue).
- De projections intraluminales (flèche rouge).
- De bourgeons vasculaires (flèche verte).

◆ Pour chaque sujet établir le ratio **Nb capillaires concernés par un de ces événements / Nb capillaires total du sujet.**



Fiche n° 8 – Extraction des protéines et ARN totaux musculaires

Principe

Le but de ce protocole est de présenter les étapes successives permettant l'obtention d'extraits purifiés de protéines et d'ARN totaux provenant d'échantillons musculaires humains. Ces extraits ont pour intérêt un dosage de protéines spécifiques, à l'aide d'analyses biochimiques et/ou l'analyse de l'expression de certains gènes, à l'aide de techniques de biologie moléculaire.

Matériel	Fournisseur	Référence	
Bain-marie sec			
Vortex			
Mortier / pilon céramique	Dutcher	140619	
Cônes stériles de 10, 200 et 500 µL avec filtres			
Azote liquide			
Tube de 1.5 stérile			
Pipeteur de 2.5, 10, 20, 200 et 500 µL			
Réactifs	Fournisseur	Référence	Conservation
Kit d'extraction NucleoSpin® RNA/protein	Macherey-Nagel	740933	-20°C / 4°C / T°A
Eau « PCR Grade »	Millipore	C100693	-20°C
1,4-Dithiothreitol (DTT) à 1M	Roche	10197777001	4°C
Ethanol anhydre	Thermo Scientific	12377103	T°A

Lyse de biopsies musculaires en vue de l'extraction d'ARN & protéines

❖ Préparer des tubes contenant 350 µL de RP1 (Kit NucleoSpin®) – 1% DTT 1M (1 par biopsie) puis vortexer.

◆ **Sous la hotte car le DTT est toxique**

1. Prévoir un conteneur d'azote liquide avec dedans les cryotubes contenant les biopsies.

◆ **Toutes les étapes suivantes doivent être réalisées en portant des gants de protection contre le froid et des lunettes de protection.**

2. Laver le mortier et le pilon à l'éthanol 70% et les refroidir à l'aide d'azote liquide.

3. Déposer le morceau de biopsie dans le mortier rempli d'azote.

4. Broyer le morceau avec le pilon.

◆ **Le mortier doit toujours contenir de l'azote, en verser à nouveau au besoin**

5. Attendre l'évaporation de l'azote en penchant le mortier. Une fois l'azote évaporé, gratter la poudre de muscle à l'aide d'un cône 1mL préalablement refroidi et la faire tomber dans le tube contenant 350 µL de RP1 – 1% DTT 1M.

◆ **Être le plus rapide possible pour éviter toute décongélation du muscle.**

6. Vortexer le tube et attendre la lyse du tissu.

🕒 **10-15 min. | T° ambiante**

7. Homogénéiser en faisant 7 aller-retour avec une seringue et une aiguille 20 gauges.

🔄 **14 000 g | 5 min**

8. Transférer le surnageant dans un nouveau tube de 1.5 mL et ajouter 300 µL d'éthanol 100%. - **Mélanger à la pipette + 3 sec de vortex.**

🔄 **14 000g | 10 min**

9. Surnageant -> **Extraction des protéines (p. 116)**

Culot -> **Extraction des ARN totaux (p. 117)**

Extraction des protéines musculaires

1. Transférer 500µL du surnageant obtenu dans un tube de 1.5 mL.

2. Ajouter 500µL de Protein Precipitator (Kit NucleoSpin).

🕒 **10 min. | T° ambiante**

🔄 **11 000 g | 3 min**

3. Retirer le surnageant.

4. Ajouter 500µL d'éthanol 50%.

🔄 **11 000 g | 1 min**

5. Retirer le surnageant au maximum

◆ **Retirer au cône 1mL puis centrifugation rapide (11000g) et retirer le reste au cône 200µL.**

6. Laisser sécher.

 **10 min. | T° ambiante | Couvercle ouvert**

7. Ajouter 120µL de PSB-TCEP (Kit NucleoSpin).

8. Mélanger et casser le culot à la pipette.

 **3 min au bain-marie sec à 95°C**

◆ **Bien attendre que le bain marie soit à 95°C avant de mettre les tubes**

 **11 000 g | 1 min**

9. Stocker les tubes à -20°C

Extraction des ARN totaux musculaires

◆ **Toutes les étapes suivantes doivent être réalisées avec des gants, sur une portion de paille spécifique et avec des pipeteurs préalablement nettoyés et différents de ceux utilisés pour les synthèses d'ADNc.**

1. Ajouter 350µL de RP1 (Kit NucleoSpin) au culot obtenu précédemment.

Mélanger à la pipette + 3 sec. de vortex.

2. Ajouter 350µL d'éthanol 70%. Mélanger à la pipette.

3. Transférer la solution obtenue dans une colonne anneau bleu (Kit NucleoSpin).

 **11 000 g | 30 sec.**

4. Changer le tube de collecte et ajouter 350µL de Membrane Desalting buffer (MDB ; Kit NucleoSpin) pour désaliniser la membrane pour optimiser l'action de la rDNase.

 **11 000 g | 1 min**

5. Préparer de la rDNase à 10% en mélangeant un volume de rDNase à 9 volumes de Reaction buffer for rDNase (Kit NucleoSpin).

Verser 95 µL de rDNase 10% dans chaque tube pour digérer les acides nucléiques.

 **15 min. | T° ambiante**

6. Ajouter 200µL de tampon RA2 (Kit NucleoSpin) pour inactiver la rDNase.

 **11 000 g | 30 sec.**

7. Changer le tube de collecte et ajouter 600µL de tampon RA3 (Kit NucleoSpin)

 **11 000 g | 30 sec.**

8. Changer le tube de collecte et ajouter 250µL de tampon RA3 (Kit NucleoSpin)

 **11 000 g | 2 min.**

◆ **Ne surtout pas remouiller le filtre en retirant la colonne !**

9. Changer le tube de collecte (**Tube 1.5mL**) et ajouter 40µL d'eau RNase-free (Kit NucleoSpin).

◆ **Bien verser au centre de la colonne, sur la membrane.**

 **11 000 g | 1 min.**

10. Jeter la colonne et congeler l'éluât à -80°C.

Fiche n° 9 – RT-qPCR

Principe

La Reverse Transcriptase-quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR) a pour intérêt d'apprécier la quantité d'ARNm codant pour un gène dans un tissu, pour obtenir une information sur le niveau d'expression de ce gène. Cette quantification se fait à l'aide d'une étape intermédiaire de transcription inverse des ARN en ADN complémentaire (ADNc). Ces ADNc sont ensuite amplifiés lors de l'étape de PCR. L'ajout de composés fluorescents (SYBR green) permet de suivre en temps réel la synthèse exponentielle des amplicons correspondant aux amorces choisies. Le nombre de cycles d'amplification nécessaires pour obtenir une fluorescence supérieure au bruit de fond (Ct) correspond à une mesure relative de la concentration de l'ADNc cible dans l'échantillon.

Matériel	Fournisseur	Référence	
LightCycler 480	Roche	05015278001	
Plaques 96 puits qPCR	Roche	04707516001	
NanoDrop	Ozyme		
MasterCycler	Eppendorf	6311000010	
Cônes stériles de 10, 200 et 500 µL avec filtres			
Tube de 1.5 stérile			
Pipeteur de 2.5,10, 20, 200 et 500 µL			
Réactifs	Fournisseur	Référence	Conservation
Transcriptor Universal cDNA Master	Roche	5893151001	-20°C
Eau « PCR Grade »	Millipore	C100693	-20°C
Amorces	Eurofins		-20°C
SyBR Green I Master (2X)	Roche	04707516001	-20°C

Synthèse des ADNc

1. Doser les ARN extraits lors de la fiche n°8 à l'aide d'un appareil type NanoDrop.

- ◆ **Toutes les étapes suivantes doivent être réalisées avec des gants, sur une portion de pailleuse spécifique et avec des pipeteurs préalablement nettoyés et différents de ceux utilisés pour les extractions d'ARN.**

2. Préparer des tubes contenant 500 ng d'ARN dans un volume total d'eau « PCR grade » de 15µL.
3. Dénaturer les ARN sur un bain-marie sec.

🕒 **75°C | 5 min**

4. Placer les échantillons sur glace.

🕒 **Glace | 10 min**

5. Ajouter dans chaque tube 4µL de Tampon 4X ainsi que 1µL de Transcriptase.

◆ **Les étapes suivantes peuvent être réalisées à l'aide d'un MasterCycler ou de 2 bains marie secs**

6. Synthèse des ADNc

🕒 **42°C | 30min**

7. Inactivation de la transcriptase

🕒 **95°C | 2 min**

8. Arrêt de la réaction

🕒 **Glace | 10 min**

9. Centrifugation rapide des échantillons

10. Dilution des échantillons dans un volume total de 250 µL d'eau « PCR grade ».

11. Stockage des ADNc à -20°C.

PCR quantitative

◆ **L'ensemble des étapes suivantes doivent être réalisées sur glace, avec des gants, sur une portion de pailleuse spécifique et avec des pipeteurs préalablement nettoyés et différents de ceux utilisés pour les extractions d'ARN et les synthèses d'ADNc.**

1. En suivant les volumes d'eau fournis par le fabricant, re-suspendre les amorces dans de l'eau « PCR grade » pour atteindre une concentration de 100 pmol/µL.
2. Réaliser une solution de 200 µL contenant 5µM d'amorce sens et anti-sens (dilution au 1/20, 10µL sens, 10µL anti-sens et 180µL d'eau).
3. Faire décongeler sur glace l'eau, les amorces, le SYBR Green et les ADNc.
4. Faire un mix réactionnel contenant :
 - SyBR Green: 5 µL/puits
 - Eau qPCR: 1,5 µL/puits
 - Mix Amorces 5 µM : 1µL/puits

◆ **Réaliser les expériences en triplicata en prévoyant un calibrateur et un contrôle négatif ce qui donne : NB de puits = (NB d'échantillon x 3) + 6**

5. Dans une plaque 96 puits, déposer tout d'abord 7.5 mL de mix réactionnel dans le nombre de puits déterminé ci-avant.
6. Déposer ensuite 2.5 μ L d'ADNc dans les puits (en triplicata).
7. Finir en apposant un film protecteur sur la plaque.
8. La dernière phase correspond à l'amplification des ADNc à l'aide du LightCycler480 en suivant le programme suivant :
 - Pré-incubation : 15 min à 95°C
 - 45 cycles d'amplification : 10 s à 95°C → 5 s à 60°C (**peut varier en fonction des amorces, se référer à la température fournie par le fabricant**) → 15 s à 72°C
 - Courbe de fusion : 5 s à 95°C → 1 min à 65°C → chauffage progressif jusqu'à 97°C (+0,1°C/s)
 - Refroidissement : 30 s à 40°C

Analyse des résultats

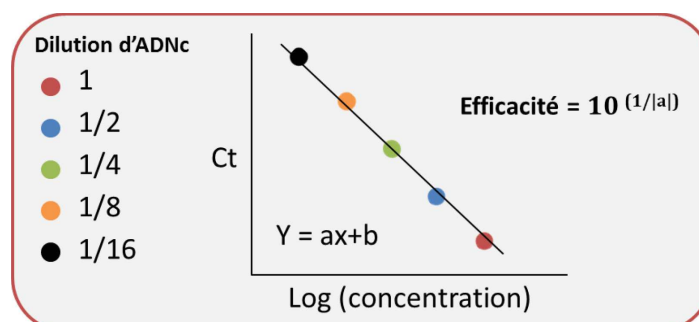
◆ **Avant analyse des résultats, certains paramètres doivent être vérifiés**

1. Vérifier l'absence de discordance entre les réplicas. Si deux valeurs concordent, la troisième valeur discordante peut être retirée.
2. Vérifier que la courbe de fusion est uni modale, ce qui permet de confirmer qu'un seul produit de PCR a été amplifié.
3. Fixer une limite basse de bruit de fond.
4. Analyser les résultats en fonction du Ct, qui correspond au nombre minimal de cycles pour atteindre une quantité d'ADN amplifié détectable. Rapporter le Ct du gène cible au Ct du gène de ménage de la façon suivante :

$$\text{Résultat} = 2^{-(Ct \text{ gene cible} - Ct \text{ gene de ménage})}$$

◆ **Si plusieurs plaques sont nécessaires pour un même gène cible, rapporter ce résultat au calibrateur**

◆ **Pour chaque nouveau gène, déterminer une efficacité des amorces comme ci-dessous. Une efficacité comprise entre 1.8 et 2.2 est acceptable (Schmittgen et al., 2008).**



Culture cellulaire

Fiche n° 10 – Isolement des myoblastes à partir de prélèvements musculaires humains.

Principe

Ce protocole permet la mise en culture primaire de myoblasts humains à partir d'un prélèvement musculaire (biopsie) conditionné au préalable dans du SVF/ 10%DMSO et congelé en azote liquide (Fiche n°5). L'intérêt de cette technique réside dans le fait que les myoblastes isolés de cette manière conservent les caractéristiques pathologiques acquises *in vivo* (insulino-résistance, production d'espèce réactive de l'oxygène (ERO) ...). La purification des myoblastes se fait *via* un système d'immunodétection couplé à des billes magnétiques.

Matériel	Fournisseur	Référence	
MiniMACS™ Separator	Miltenyi Biotec	130-090-312	
Boîtes de cultures de 35 et 100mm caotées Collagène I	Corning		
Compteur de cellules			
Hotte de culture à flux laminaire			
Cônes stériles de 10, 200 et 500 µL			
Tube de 1.5, 15 et 50 mL stérile			
Pipette de 5,10 et 25 mL stériles			
Pipeteur électrique			
Pipeteur P1000, P200, P20 & P10			
Réactifs	Fournisseur	Référence	Conservation
Milieu de culture DMEM	Sigma	D6546	4°C
Antibiotique Pénicilline/Streptomycine	Sigma	P4458	-20°C
Sérum de Veau Fœtal (SVF)	Dutscher	S11971S1810	-20°C / 4°C
Ultrosor G	Biosepra	15950-017	-20°C/ 4°C
L-Glutamine	Sigma	G8540	4°C
Phosphate Buffer Saline (PBS)	Sigma	D8537	4°C
Bovine Serum Albumine (BSA)	Euromedex	04-100-810-C	4°C
EDTA	Sigma	E6758	4°C
Cell Dissociation 1X (Non-enzymatique)	Sigma	C5914	4°C
Anticorps souris anti-CD56 humain	BD Bioscience	BD559043	4°C
Microbilles couplées à des IgG mouton anti-souris	Miltenyi Biotec	130-048-402	4°C

Colonne de séparation magnétique (MACS)	Miltenyi Biotec	130-042-201	4°C
Matrigel	Corning via VWR	734-1100	-20°C
Dispase	BD Bioscience	354235	-20°C
Trypsine	Sigma	T4049	-20°C

Milieux de culture

Milieu de culture complet :

DMEM- 20% SVF-0.5% ultrosor-10%Penicilline-streptomycine-0.06% L-Glutamine

Milieu BSA :

DMEM + 0.5% BSA (filtrée avec filtre 0.22 μ) : 4mL par boîte. Faire 10mL soit **50 mg BSA**

PBS/BSA :

PBS + 0.5% BSA (filtrée avec filtres 0.22 μ) : 20mL pour 1 purification soit **100 mg BSA**

PBS/BSA /EDTA :

PBS + 0.5% BSA (filtrée avec filtres 0.22 μ)+ 2mM EDTA : 40mL soit **200mg BSA + 160 μ L EDTA à 0.5 M**

Procédure : Mise en culture des explants

◆ **L'intégralité de la procédure doit être réalisée sous une hotte de culture à flux laminaire.**

1. Douze heures avant la procédure, mettre un aliquot de Matrigel, une boîte de cônes stériles et une boîte 35mm coatée au Collagène I à 4°C.
2. Sortir le cryotube contenant la biopsie de l'azote liquide et le mettre à décongeler **le plus rapidement possible**.

🕒 **5- 10 min | 37°C |5% CO₂**

◆ **Toujours nettoyer le cryotube à l'alcool 70° avant de le rentrer en salle de culture.**

3. Retirer le **milieu de congélation** du tube sans aspirer les bouts de muscles puis les rincer 2 fois avec du **milieu complet**, directement dans le cryotube.
4. Sortir le Matrigel, la boîte 35mm et les cônes et les disposer dans un bac de glace, sous la hotte.
5. Répartir les bouts de muscles dans la boîte 35mm coatée Collagène I en les espaçant du bord de la boîte ainsi qu'entre eux, à l'aide d'un cône stérile.

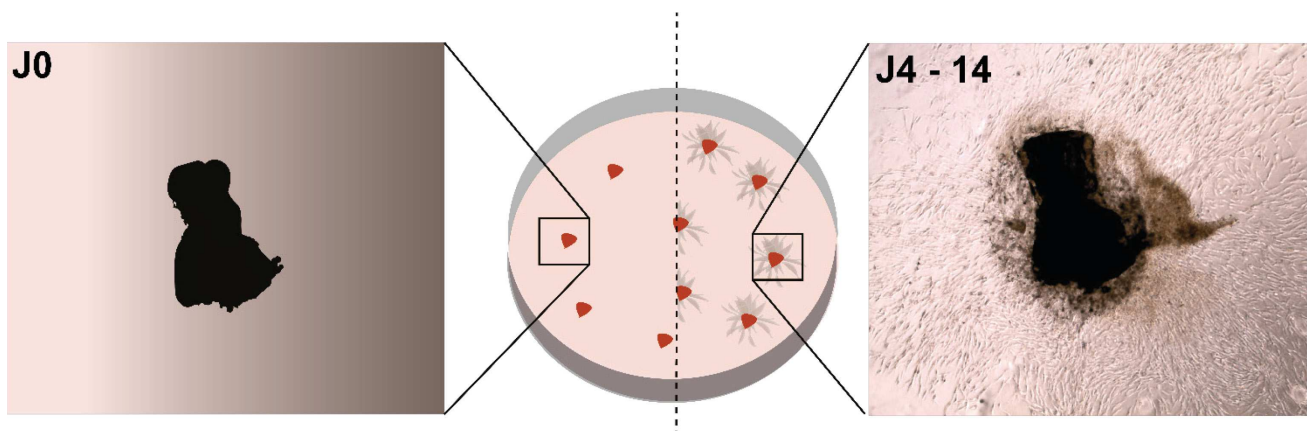
6. Recouvrir les explants goutte à goutte à l'aide de Matrigel dilué (dans du **milieu complet**, concentration finale : 6mg.mL^{-1}) très délicatement sans les faire bouger.

◆ **Le Matrigel doit toujours être dans la glace et utilisé avec des cônes et des boîtes préalablement refroidies (risque de polymérisation)**

🕒 **30 min | 37°C | 5% CO₂**

7. Recouvrir les explants **très délicatement** avec du **milieu complet**.

8. Lorsqu'un réseau de cellules se forme autour des bouts de biopsies (habituellement de J4 à J14), récupérer les cellules sans attendre.



Procédure : Mise en culture des cellules totales

1. Aspirer le milieu de culture.
2. Ajouter 2.5 mL de Dispase (50 U.mL^{-1}).

🕒 **2 heures | 37°C | 5% CO₂**

3. Aspirer le tout et le mettre dans un tube 50mL
4. Rincer la boîte avec du **DMEM/20%SVF** plusieurs fois.

🔄 **1 100 rpm | 5 min.**

5. Retirer le surnageant et rincer le culot avec du milieu **DMEM/20%SVF**.

🔄 **1 100 rpm | 5 min.**

6. Reprendre le culot dans 10ml de **milieu complet** et ensemer les cellules dans une boîte de culture coatée Collagène I, diamètre 100mm.

Une fois les cellules à 70-80% de confluence, réaliser un **passage des cellules** :

◆ **Ne jamais dépasser 80% de confluence, au risque de voir les myoblastes se différencier.**

7. Aspirer le milieu.
8. Ajouter 4mL de **Trypsine**.

🕒 **5min | 37°C | 5% CO₂**

9. Tapoter la boîte puis récupérer les cellules en la rinçant plusieurs fois avec du **DMEM/20%SVF**.
10. Transférer le milieu avec les cellules dans un tube 50mL après chaque rinçage.

🔄 **1 100 rpm | 5 min.**

11. Reprendre le culot dans 4 mL de **milieu complet**.
12. Compléter à 40 mL et répartir dans 4 nouvelles boîtes 100mm.
13. Une fois ces boîtes à 70-80% de confluence, réaliser la purification des myoblastes sur une des boîtes, congeler les cellules des autres dans un milieu **90%SVF/10%DMSO** (2 cryotubes de 1mL par boîte).

Procédure : Purification des myoblastes

A partir d'une boîte 100mm de cellules totales à 70-80% de confluence.

1. Aspirer le milieu de culture et ajouter 4mL de **Milieu BSA** + 4µL d'anticorps anti-CD56.

🕒 **30min | 37°C | 5% CO₂ + Sortir le Cell Dissociation du frigo**

2. Aspirer le milieu et mettre 4mL de **Cell Dissociation solution**.

🕒 **15min | 37°C | 5% CO₂**

3. Récupérer le surnageant dans un tube de 50mL et rincer plusieurs fois la boîte avec 2mL de **PBS/ BSA/ EDTA** pour bien décoller toutes les cellules.

🔄 **1 100 rpm | 5 min.**

4. Retirer le surnageant et resuspendre le culot en tapotant le tube.
5. Ajouter 8mL de **PBS/ BSA/ EDTA**.

🔄 **1 100 rpm | 5 min.**

6. Retirer le surnageant complètement (finir à la P200) puis ajouter 80µL de **PBS/ BSA/ EDTA + 20µL de la solution de billes magnétiques**.

◆ **Bien homogénéiser les billes avant de prélever, en évitant les bulles.**

🕒 **15min | 4°C**

7. Ajouter 8mL de de **PBS/ BSA/ EDTA**.

 **1 100 rpm | 5 min.**

8. Retirer le surnageant puis reprendre le culot dans 500µL de **PBS/ BSA/ EDTA**.

9. Placer le support aimanté (partie colorée) sur le support métal puis placer la colonne stérile sur le support et un tube poubelle sous la colonne.

◆ **Nettoyer toutes les pièces du système à l'éthanol 70° avant de les disposer sous la hotte.**

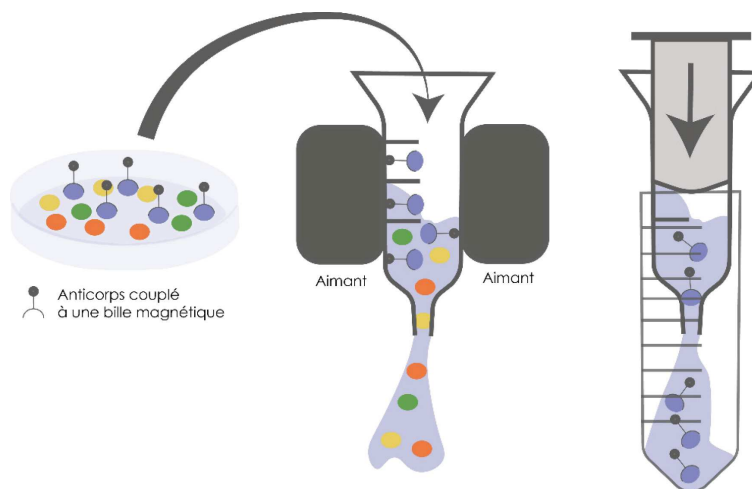
10. Déposer 1mL de **PBS/ BSA/ EDTA** dans la colonne pour l'hydrater.

11. Transférer la **solution avec les cellules** dans la colonne.

12. Laver la colonne 3 fois à l'aide de 1 mL de **PBS/BSA**.

◆ **Bien attendre que la colonne soit vide avant d'ajouter à nouveau du liquide.**

13. Retirer la colonne du support en ne touchant que la collerette et la placer sur un tube 15mL annoté « Cellules CD56+ » comprenant 1 mL de **milieu complet**.



14. Ajouter 2 ml de **PBS/BSA** dans la colonne et pousser fortement et rapidement à l'aide de la seringue.

15. Compléter à 10mL avec du **milieu complet** et transférer le tout dans une boîte de culture 100mm coatée Collagène I.

Cultiver ces myoblastes jusqu'à 70-80% de confluence, les expandre en 4 boîtes 100 mm que l'on congèlera une fois à 70-80% de confluence (2 ampoules par boîte).

Fiche n° 11 – Différenciation et électrostimulation de myotubes humains.

Principe

Le principe de cette expérience est de cultiver les myoblastes humains purifiés (fiche n°10) puis d'induire leur différenciation avant de les exposer à une stimulation électrique par impulsion (SEI). Cette SEI permet l'activation de voies de signalisation cellulaires et permet de reproduire *in-vitro* un certain nombre de réponses physiologiques des cellules musculaires à une contraction musculaire (Nikolić et al., 2017).

Matériel

Matériel	Fournisseur	Référence	
C-Pace EP	IonOptix	130-090-312	
C-Dish 6 puits	IonOptix		
Compteur de cellules			
Hotte de culture à flux laminaire			
Cônes stériles de 10, 200 et 500 µL			
Tube de 1.5, 15 et 50 mL stérile			
Pipette de 5,10 et 25 mL stériles			
Pipeteur électrique			
Pipeteur P1000, P200, P20 & P10			
Produit	Fournisseur	Référence	Conservation
Milieu de culture DMEM	Sigma	D6546	4°C
Antibiotique Pénicilline/Streptomycine	Sigma	P4458	-20°C
Sérum de Veau Foetal (SVF)	Dutscher	S11971S1810	-20°C / 4°C
Ultrosor G	Biosepra	15950-017	-20°C/ 4°C
L-Glutamine	Sigma	G8540	4°C
Phosphate Buffer Saline (PBS)	Sigma	D8537	4°C
Trypsine	Sigma	T4049	-20°C
Kit d'extraction NucleoSpin® RNA/protein	Macherey-Nagel	740933	-20°C / 4°C / T°A
Eau « PCR Grade »	Millipore	C100693	-20°C
1,4-Dithiothreitol (DTT) à 1M	Roche	10197777001	4°C
Ethanol anhydre	Thermo Scientific	12377103	T°A

Milieux de culture

Milieu de prolifération :

DMEM- 20% SVF-0.5% ultroser-10%Penicilline-streptomycine-0.06% L-Glutamine

Milieu de différenciation :

DMEM- 2% SVF -10%Penicilline-streptomycine-0.06% L-Glutamine

Procédure

1. Décongeler une ampoule de myoblastes humains de passage 1 à 4 dans une boîte 100mm.
2. Une fois à 70-80% de confluence, décoller les cellules en ajoutant 4 mL de **trypsine**.

🕒 **5min. | 37°C | 5%CO₂**

3. Récupérer les cellules en lavant plusieurs fois la boîte avec du **DMEM/ 20%SVF**

🔄 **1100 rpm | 5 min**

4. Retirer le surnageant, resuspendre les cellules dans 4 mL de **milieu de prolifération** puis les compter.
5. Ensemencer le nombre de plaque 6 puits que l'on souhaite pour l'expérience à une densité de 5000 cellules par cm².

◆ **Toujours prévoir les plaques en double pour avoir une condition non-électrostimulée.**

6. Ensemencer les cellules restantes dans des boîtes 100mm, à 5000 cellules par cm², que l'on recongèlera à raison de 2 ampoules par boîte 100mm une fois à 70-80% de confluence.
7. Une fois les cellules des plaques 6 puits à 70-80% de confluence (2-3 jours), induire la différenciation :
 - Retirer le milieu de prolifération.
 - 1 à 2 lavages au PBS.
 - Ajouter 2 mL /puits de **milieu de différenciation**, à renouveler tous les 2 jours.
8. Après 4 jours de différenciation, remplacer le milieu par 3 mL de **milieu de prolifération** frais.
9. Placer ensuite les électrodes *via* le couvercle de stimulation.

◆ **Les électrodes doivent être nettoyées à l'aide d'éthanol 70° et d'irradiation aux UV (15min) avant chaque utilisation.**

10. Mettre la boîte à l'incubateur et relier le couvercle au générateur C-Pace.

11. Lancer le programme de SEI :

Pour une SEI mimant un exercice en endurance, le programme utilisé est le suivant :

Fréquence : 1 Hz | Durée de pulsation : 4 ms | Voltage : 11,5 V | durée : 24h

🕒 **24 heures | 37°C | 5%CO₂**

Les protéines et ARN sont ensuite récupérés de la façon suivante :

1. Retirer le milieu et laver 1 fois avec du PBS à 37°C.
2. Ajouter 350µL de **RP1 / 1% DTT 1M**
3. Racler le fond de chaque puits avec un racloir à cellules.
4. Transférer le contenu du puits dans un tube 1,5mL.
5. Congeler le tube à -80°C ou passer directement à l'étape 8 de la fiche technique 8 pour la purification des protéines et ARN.

Fiche n° 12 – Test de l'effet du sérum sur la différenciation de cellules souches mésenchymateuses en péricytes.

Principe

Les cellules souches mésenchymateuses (MSCs) sont connues entre autres pour leur capacité à se différencier en péricytes lorsqu'elles établissent un contact avec des cellules endothéliales (EC). La mesure de l'expression de marqueurs péricytaires comme la calponine dans les MSCs après 7 jours de coculture avec des ECs en présence de sérum humain permet d'apprécier la capacité de ce dernier à perturber les interactions EC/MSc et la différenciation des MSC en péricyte (E. Rossi et al., 2017).

Matériel	Fournisseur	Référence	
Microscope confocal à fluorescence			
Flasques T25 non-coatées			
Compteur de cellules			
LabTEK 8 puits	Thermofisher	154534	
Hotte de culture à flux laminaire			
Cônes stériles de 10, 200 et 500 µL			
Tube de 1.5, 15 et 50 mL stérile			
Pipette de 5,10 et 25 mL stériles			
Pipeteur électrique			
Pipeteur P1000, P200, P20 & P10			
Réactifs	Fournisseur	Référence	Conservation
Milieu de culture MEM-alpha	Dutscher	702547	4°C
Antibiotique Pénicilline/Streptomycine (P-S)	Sigma	P4458	-20°C
Sérum de Veau Foetal (SVF)	Dutscher	S11971S1810	-20°C / 4°C
Milieu de culture EBM2 BulletKit	Lonza	C3202	-20°C / 4°C
Phosphate Buffer Saline (PBS)	Sigma	D8537	4°C
bFGF recombinant	Sigma	GF446	-20°C
Anticorps anti-Calponine, Lapin	Abcam	ab46794	-20°C
Anticorps anti-vWF, Souris	Dako	M0616	4°C
Anticorps anti- Lapin, FITC-green, Goat	Thermofisher	F-2765	4°C
Anticorps anti-Souris, Texas Red, Horse	Vector	TI-2000	4°C
PFA 4%	Thermo Scientific	J19943K2	4°C
Trypsine	Sigma	T4049	-20°C
RMPI Medium	Sigma	R0883	4°C
Fibronectine	Sigma	341635	-20°C

Milieux de culture

Milieu ECFC:

Mélanger les éléments du Kit Lonza EBM2 en suivant les instructions + Ajouter du SVF pour atteindre 10% finaux.

Milieu MSCs :

MEM-alpha + 10%SVF + P-S 10% + bFGF 4^{e-5} ng/mL

Milieu STOP :

RPMI + 10%SVF

Procédure

1. Cultiver des MSCs et ECFC de manière à obtenir deux T25 à confluence.
 - ❖ Les MSCs doivent être cultivées sur des boîtes non-coatées, dans du **milieu MSC**.
 - ❖ Les ECFC doivent être cultivées sur des boîtes coatées fibronectine (10µg/mL), dans du **milieu ECFC**.
2. Coater les puits des Labtek avec 150µL de Fibronectine 10µg/mL par puits
 - 🕒 **30 min | 37°C**
3. Récupérer les cellules (MSCs et ECFC):
 - Ajouter 0.1 mL/cm² de **trypsine**.
 - 🕒 **30 min | 37°C | 5%CO₂**
 - Récupérer les cellules dans du **milieu STOP**.
 - ♻️ **250g | 5 min.**
 - Retirer le surnageant et resuspendre dans 1mL de **milieu ECFC**.
4. Compter les cellules
5. Ensemencer 10.000 cellules ECFC + 10.000 cellules MSC/chambre 8 puits avec 120µl de **milieu ECFC** sans SVF +30µl du sérum à tester (20%) pour volume total 150µL.
 - ◆ **Faire 4 puits par condition. Garder 4 puits en 20% SVF comme contrôle positif.**
 - 🕒 **Cultiver les cellules durant 7 jours, en changeant le milieu tous les 3 jours.**
1. Fixation des cellules **PFA 4%**.
 - 🕒 **15min, T° ambiante**
2. Incubation des cellules avec des anticorps primaires d'anti-calponin (1 : 100) & d'anti-vWF (1 :500).
 - 🕒 **1h | T° ambiante**

3. Incubation des cellules avec des anticorps secondaires Texas Red anti-souris (1 : 1000) & FITC anti-lapin (1 :1 000) + DAPI (1 :10 000).

🕒 **1h | T° ambiante**

4. Prise d'image au microscope confocal.

Analyse des images

1. Ouvrir l'image correspondant au marquage de la calponine (canal vert) dans *ImageJ*.
2. Faire *Image / Adjust / Brightness & Contrast*. Régler le contraste de façon à faire disparaître le bruit de fond de l'image.
3. Faire *Image / Adjust / Threshold*. Régler sur *Over/Under*, régler la limite haute à 255 et la limite basse sur 60.
4. Appuyer sur la touche M (*Measure*).
5. L'intensité de fluorescence est rapportée dans la colonne *Mean*.

Fiche n° 13 – Effet du sérum sur la morphologie des péricytes

Principe

Les péricytes sont des cellules capables d'adhérer à la surface des capillaires sanguins. En cas de stress, les péricytes s'allongent et se détachent. Un moyen simple d'évaluer la souffrance cellulaire en réponse à un agent extérieur (ici le sérum humain) est d'apprécier à l'aide de mesures morphométriques l'allongement de la structure péricytaire (Klement et al., 2018b). La structure de la cellule est mise en évidence à l'aide d'une coloration des filaments de F-actine du cytosquelette.

Matériel	Fournisseur	Référence	
Microscope confocal à fluorescence			
Flasques T25 non-coatées			
Compteur de cellules			
LabTEK 8 puits	Thermofisher	154534	
Hotte de culture à flux laminaire			
Cônes stériles de 10, 200 et 500 µL			
Tube de 1.5, 15 et 50 mL stérile			
Pipette de 5,10 et 25 mL stériles			
Pipeteur électrique			
Pipeteur P1000, P200, P20 & P10			
Réactifs	Fournisseur	Référence	Conservation
Human Brain Vascular Pericytes (HBVP)	ScienCell	#1200	-180°C
Milieu péricyte	ScienCell	#1201	-20°C / 4°C
Sérum de Veau Foetal (SVF)	Dutscher	S11971S1810	-20°C / 4°C
Phosphate Buffer Saline (PBS)	Sigma	D8537	4°C
Phalloïdine iFluor	Abcam	ab176756	-20°C
DAPI	Abcam	ab228549	4°C
PFA 4%	Thermo Scientific	J19943K2	4°C
Trypsine	Sigma	T4049	-20°C
RMPI Medium	Sigma	R0883	4°C

Milieus de culture

Milieu péricyte : Mélanger les éléments du Kit ScienCell en suivant les instructions

Milieu STOP : RPMI + 10%SVF

Procédure

1. Décongeler une ampoule de péricytes dans une boîte 60mm coatées avec $2\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de poly-L-lysine.
2. Une fois à confluence, réaliser un passage :
 - Ajouter $0.1\text{ mL}/\text{cm}^2$ de **trypsin**.
 - 🕒 **30 min | 37°C | 5%CO₂**
 - Récupérer les cellules dans du **milieu STOP**.
 - ♻️ **250g | 5 min.**
 - Retirer le surnageant et resuspendre dans 1mL de **milieu péricyte** puis compter les cellules.
3. Ensemencer les péricyte à 5000 cellules par cm^2 , sur des boîtes coatées avec $2\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de poly-L-lysine.
4. Une fois les cellules à 80% de confluence, récupérer les cellules (comme décrit ci-dessus) et ensemencer 10 000 péricytes par chambre de Labtek 8 puits coaté poly-L-lysine dans du **milieu péricyte** supplémenté à 20% de sérum de patient ou de sujet contrôle.
 - ◆ **Garder une condition SVF comme contrôle positif.**
 - 🕒 **15 h | 37°C | 5%CO₂**
5. Changer le milieu pour du **milieu péricyte** frais.
 - 🕒 **24 h | 37°C | 5%CO₂**
6. Fixation des cellules **PFA 4%**.
 - 🕒 **15min, T° ambiante**
7. Incubation des cellules avec la phalloïdine (1 : 1000) + DAPI (1 : 10 000) dans PBS 1% BSA
 - 🕒 **1h15 | T° ambiante**
8. Prise d'images en microscopie à fluorescence.
 - ◆ **Prendre des images d'au moins 40 péricytes par condition, issus d'au moins 10 champs différents**

Analyse des images

6. Ouvrir l'image de péricytes marqués à la phalloïdine dans ImageJ.
7. Faire *Image / Adjust / Threshold*. Régler sur *Over/Under*, régler la limite haute à 255 et ajuster le niveau bas de façon à faire disparaître le bruit de fond.
8. Aller dans *Analyse/Set Measurements...* et cocher la case *Shape Descriptors*.
9. Choisir l'outil *baguette magique* et sélectionner les péricytes. Appuyer sur la touche M (*Measure*).
10. Répéter l'opération pour chaque cellule et copier la partie résultat dans Excel.
11. La variable nous intéressant est l'*Aspect Ratio* (AR) qui est le rapport entre les axes long et court de la cellule.

Fiche n° 14 – Isolement et culture de cellules endothéliales formant des colonies (ECFC) à partir d'un prélèvement de sang périphérique humain.

Principe

Les cellules endothéliales formant des colonies sont des cellules progénitrices présentes dans le sang humain périphérique. Leur isolement est possible par mise en culture des cellules mononuclées (CM) du sang à forte densité. En effet, ces cellules, faisant partie des CM, sont les seules à pouvoir adhérer et proliférer dans les conditions suivantes et se caractérisent par l'apparition typique de colonies rondes de plus de 50 cellules (Smadja et al., 2019). Elles peuvent ensuite être cultivées en culture primaire pour quelques passages.

Matériel	Fournisseur	Référence	
Flasques T25 non-coatées			
Plaques de culture 6,24 et 96 puits non coatées			
Compteur de cellules			
Hotte de culture à flux laminaire			
Cônes stériles de 10, 200 et 500 µL			
Tube de 1.5, 15 et 50 mL stérile			
Pipette de 5,10 et 25 mL stériles			
Pipeteur électrique			
Pipeteur P1000, P200, P20 & P10			
Tube héparine 10 mL	BD Medical	367526	
Réactifs	Fournisseur	Référence	Conservation
Milieu de culture EBM2 BulletKit	Lonza	C3202	-20°C / 4°C
Sérum de Veau Foetal (SVF)	Dutscher	S11971S1810	-20°C / 4°C
Phosphate Buffer Saline (PBS)	Sigma	D8537	4°C
Trypsine	Sigma	T4049	-20°C
RMPI Medium	Sigma	R0883	4°C
Fibronectine	Sigma	341635	-20°C
EDTA (0.5 M)	Sigma	E6758	4°C
PANCOLL Humain - densité 1,077 g/mL	Dutscher	P04-60500	4°C
Matrigel (10mg/mL minimum)	Corning via VWR	734-1100	-20°C
Trypsine	Sigma	T4049	-20°C
Kit d'extraction NucleoSpin® RNA/protein	Macherey-Nagel	740933	-20°C / 4°C / T°A
Eau « PCR Grade »	Millipore	C100693	-20°C

1,4-Dithiothreitol (DTT) à 1M	Roche	10197777001	4°C
Ethanol anhydre	Thermo Scientific	12377103	T°A

Milieux de culture

Milieu complet :

Mélanger les éléments du Kit Lonza EBM2 en suivant les instructions + Ajouter du SVF pour atteindre 10% finaux.

PBS - EDTA: PBS + 2mM EDTA

Milieu STOP: RPMI + 10%SVF

Procédure

1. Prélèvement d'au moins 25 mL de sang veineux périphérique en tubes héparinés (vert).
2. Si plaque non-coatée, réaliser un coating Fibronectine en se rapportant au tableau 1.

🕒 **30 min | 37°C.**

3. Préparer des tubes contenant 15 mL de Pancoll (1 tube pour chaque 15mL de sang obtenu).
4. Pooler le contenu des tubes héparinés (Falcon 50mL)
5. Diluer au ½ dans du **PBS – EDTA**.
6. Transférer très délicatement 30 mL de sang dilué par falcon contenant 15 mL de Pancoll

◆ **Attention ! Si les phases se mélangent l'expérience est ratée, pencher le tube au maximum et déposer le sang dilué très lentement (~ 0.5mL par seconde).**

🔄 **1200 g / 20 min / T°A SANS FREIN**

7. Retirer le plasma & collecter l'anneau de cellules mononuclées (CM) (2 anneaux par tubes 50mL).

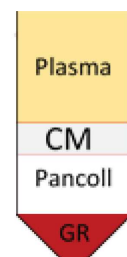
8. Compléter à 50 mL avec du **PBS/EDTA**

🔄 **400 g / 10 min / T°A (avec frein)**

9. Eliminer le surnageant par retournement.
10. Resuspendre dans 1 mL de **PBS – EDTA** puis compléter à 25mL.

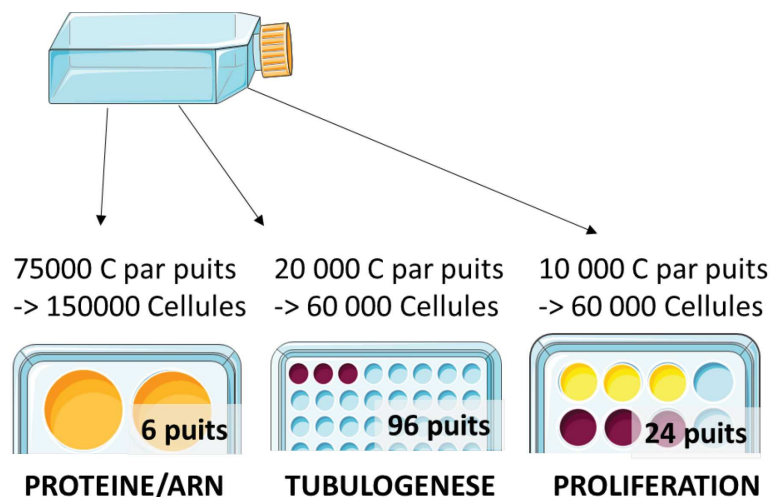
🔄 **300 g / 10 min / T°A (avec frein)**

11. Eliminer le surnageant par retournement.
12. Resuspendre dans 1 mL de **PBS – EDTA** puis compléter à 25mL.
13. Récupérer 50 µL -> Compter les cellules durant la centrifugation qui suit.



 **200 g / 10 min / T°A (avec frein)**

14. Reprendre le culot dans 1 mL de **milieu complet** puis compléter de manière à obtenir une solution de 2.5×10^6 cellules/mL.
15. Répartir 2 mL de la solution obtenue par puits de P6 coatée collagène ou fibronectine.
16. Changer le milieu de culture à J2 puis chaque jour jusqu'à J7. Ensuite 2/3 changements par semaine.
17. Surveiller l'apparition de colonies
18. Une fois qu'une colonie d'environ 50 cellules est visible, passer chaque puits de P6 dans un nouveau puits de P6. Changer le milieu tous les 2/3 jours et attendre la confluence. Passer ensuite les cellules dans une T25 (1 puits de P6 par T25).
19. Il faut réaliser les expériences sur des cellules « fraîches », la congélation sélectionnant les cellules les plus résistantes.
20. Après le passage de la T25, les cellules sont réparties pour les différentes expériences.



Tubulogenèse en Matrigel

2 heures avant l'expérience.

1. Décongeler un aliquot de Matrigel dans le frigo (au fond).
2. Placer la plaque 96puits + cônes jaunes à -20°C .

30 min avant l'expérience.

1. Descendre cône + plaque + Matrigel dans de la glace.
2. Travailler avec cônes + plaque dans la glace.
3. Déposer $50\mu\text{L}$ de Matrigel / puits. Prélever $55\mu\text{L}$.
(Toucher le fond du puits avec le cône et verser doucement sans aller totalement au bout.)

🕒 **30 min | 37 °C**

Récupération des cellules.

1. Mettre 150 µL de **trypsine**/ puits.

🕒 **30 min | 37 °C**

2. Ajouter 1 mL de **milieu STOP** par puits et transférer le tout dans un tube 50 mL.

🔄 **250g | 5 min**

3. Resuspendre le culot dans un petit volume de **milieu complet**
 → Compter les cellules avec un compteur de cellules
4. Ajouter du **milieu complet** de façon à obtenir une solution à 200 000 cellules/mL.
5. Déposer 100µL de la suspension cellulaire par puits.
6. Prendre des photos à 4, 6 et 20h.

Analyse de la prolifération

1. Faire 6 puits de P24 par condition, 3 puits pour le T0 et 3 puits pour le T72.
2. Regrouper les T0 sur la même plaque et les T72 sur une autre plaque.
3. Ensemencer 10 000 cellules par puits.

Comptage

7. Après 24h, récupérer les cellules de 3 puits par condition et compter un point P0 de la façon suivante :
8. Mettre 150 µL de **trypsine**/ puits.
 🕒 **30 min | 37 °C**
9. Récupérer 20 µL pour comptage directement.
10. Réaliser la même procédure 72h plus tard dans les 3 puits restants.

Calcul du temps de doublement (TD)

$$TD = 72 * \ln(2) / (\ln(\text{Nombre cellule à T0}) - \ln(\text{Nombre cellule à T72}))$$

Purification Protéines et ARN

Voir Fiche technique n°8.

CONTRIBUTION SCIENTIFIQUE

Etude 1

Article original

Impaired training-induced angiogenesis process with loss of pericyte-endothelium interactions is associated with an abnormal capillary remodelling in the skeletal muscle of COPD patients

Léo Blervaque, Emilie Passerieux, Pascal Pomiès, Matthias Catteau, Nelly Héraud, Marine Blaquièrre, François Bughin, Bronia Ayoub, Nicolas Molinari, Jean-Paul Cristol, Antonia Perez-Martin, Jacques Mercier, Maurice Hayot and Fares Gouzi

Article publié en Décembre 2019 dans la revue

Respiratory Research

Présentation de l'étude n°1

A l'issue du chapitre 3 de la partie 1 de ce document, nous étions arrivés à la conclusion que l'analyse de l'ultrastructure des capillaires donnait accès à d'importantes informations, complémentaires à l'analyse du nombre de capillaires sanguins musculaires, notamment durant le processus d'angiogenèse induit par le réentrainement à l'effort (REE). Ainsi, nous avons fait l'hypothèse que l'ultrastructure musculaire pouvait être altérée sous l'effet de la BPCO et que les changements ultrastructuraux induits par le REE pouvaient être anormaux chez ces patients. Le stress oxydant induisant un remodelage anormal des capillaires dans d'autres maladies chroniques, nous avons également supposé que le stress oxydant systémique présent dans la BPCO pourrait être impliqué dans un remodelage capillaire anormal sur le plan ultrastructural. Pour répondre à ces hypothèses, nous avons analysé des biopsies musculaires prélevées au niveau du vaste latéral (fiche technique n°5), avant et après 6 semaines de REE (fiche technique n°4) à l'aide de techniques de microscopie électronique (fiche technique n°7). Grâce à cette approche expérimentale, nous avons pu montrer que les patients BPCO présentaient un remodelage anormal de la membrane basale capillaire sous l'effet du REE. De plus, en focalisant notre attention sur les marqueurs ultrastructuraux indirects de l'angiogenèse musculaire, nous avons pu montrer qu'une perte d'interactions entre péricytes et capillaires s'effectuait chez les patients BPCO, en parallèle d'un émoussement du gain de capillaires au cours du REE au niveau histologique. En complément des analyses en microscopie électronique et d'histologie, nous avons également réalisé des analyses indirectes de dommages oxydatifs sur les prélèvements sanguins des patients avant et après REE. Nous avons choisi de porter notre attention sur des marqueurs de peroxydations lipidiques, les isoprostanes libres et estérifiés (F2-isoprostanes), un marqueur validé dans l'étude des niveaux de stress oxydants circulants. Nous avons pu observer que, malgré une réduction des niveaux de F2-isoprostanes sous l'effet du REE dans les deux groupes (BPCO et sujets sains), ces niveaux demeuraient plus élevés à chaque temps chez les patients BPCO. Bien que nous n'ayons pas pu démontrer le lien direct entre stress oxydant et remodelage pathologique de l'ultrastructure capillaire chez le patient BPCO, nous avons trouvé une corrélation entre relation péricyte/capillaire et stress oxydant.

RESEARCH

Open Access



Impaired training-induced angiogenesis process with loss of pericyte-endothelium interactions is associated with an abnormal capillary remodelling in the skeletal muscle of COPD patients

Léo Blervaque^{1*}, Emilie Passerieux¹, Pascal Pomiès¹, Matthias Catteau¹, Nelly Héraud², Marine Blaquièrè³, François Bughin³, Bronia Ayoub³, Nicolas Molinari⁴, Jean-Paul Cristol³, Antonia Perez-Martin⁵, Jacques Mercier³, Maurice Hayot³ and Fares Gouzi³

Abstract

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is associated with exercise intolerance and limits the functional gains in response to exercise training in patients compared to sedentary healthy subjects (SHS). The blunted skeletal muscle angiogenesis previously observed in COPD patients has been linked to these limited functional improvements, but its underlying mechanisms, as well as the potential role of oxidative stress, remain poorly understood. Therefore, we compared ultrastructural indexes of angiogenic process and capillary remodelling by transmission electron microscopy in 9 COPD patients and 7 SHS after 6 weeks of individualized moderate-intensity endurance training. We also assessed oxidative stress by plasma-free and esterified isoprostane (F₂-IsoP) levels in both groups. We observed a capillary basement membrane thickening in COPD patients only ($p = 0.008$) and abnormal variations of endothelial nucleus density in response to exercise training in these patients when compared to SHS ($p = 0.042$). COPD patients had significantly fewer occurrences of pericyte/endothelium interdigitations, a morphologic marker of capillary maturation, than SHS ($p = 0.014$), and significantly higher levels of F₂-IsoP ($p = 0.048$). Last, the changes in pericyte/endothelium interdigitations and F₂-IsoP levels in response to exercise training were negatively correlated ($r = -0.62$, $p = 0.025$). This study is the first to show abnormal capillary remodelling and to reveal impairments during the whole process of angiogenesis (capillary creation and maturation) in COPD patients.

Trial registration: NCT01183039 & NCT01183052, both registered 7 August 2010 (retrospectively registered).

Keywords: COPD, Capillaries, Angiogenesis, Skeletal muscle, Exercise training

* Correspondence: leo.blervaque@umontpellier.fr

¹Physiologie & médecine expérimentale du Cœur et des Muscles (PhyMedExp), INSERM - CNRS - Montpellier University, CHU Arnaud De Villeneuve, 371 avenue du Doyen Gaston Giraud, 34295 Montpellier cedex 5, France

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2019 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Background

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is characterized by a persistent airflow limitation due to airway and/or alveolar abnormalities, and it is systematically associated with other concomitant chronic diseases [1]. Limb skeletal muscle dysfunction, for example, affects the morbi-mortality of these patients [2–4]. Yet, skeletal muscle capillarization, despite its key role in this dysfunction in COPD patients [5], is an under-considered explanation of this phenomenon. A previous study of our group nevertheless demonstrated a significantly lower increase in skeletal muscle capillarization in response to exercise training in COPD patients compared with sedentary healthy subjects (SHS) [6]. This blunted angiogenesis was linked to the limited functional gains from exercise training observed in the patients [6]. Thus, while impaired angiogenesis appears to be relevant to the muscle misadaptations to exercise training in COPD patients, it remains insufficiently understood.

Physiologically, the angiogenic process in response to exercise training is highly dynamic, resulting from a balance between pro- and anti-angiogenic factors. However, two main phases of angiogenesis have been described: an early phase of new capillary creation and a later phase of neo-capillary maturation [7]. The morphologic markers of capillary creation [abluminal endothelial (EC) sprouts or intraluminal EC folding] and maturation [pericyte/endothelium (Pc/EC) interdigitations] in skeletal muscle were initially described in studies using transmission electron microscopy (TEM) [8–11], which is the reference method for their identification [12, 13]. Capillary remodelling in response to exercise training also appears to be linked to angiogenesis [12], and it too can be assessed by TEM through a morphometric analysis of the main capillary components (lumen, endothelium, basement membrane and pericytes) [8].

In chronic diseases like diabetes, both impaired angiogenesis [14] and pathological capillary remodelling [15] have been described in response to exercise training. Oxidative stress is a potential factor of these impairments, causing basement membrane protein accumulation [16] and pericyte apoptosis [17]. Moreover, oxidative stress promotes isoprostane formation, [18] which is a direct inhibitor of angiogenesis [19] and a promotor of pericyte loss [20]. In COPD patients, increased levels of plasma-free and esterified isoprostanes (F_2 -IsoP) and muscle oxidative stress have been reported [5, 21, 22]. We thus hypothesized that the blunted angiogenesis in COPD patients in response to exercise training [6] would be associated with abnormal capillary remodelling, an impaired angiogenic process (i.e. capillary creation and maturation), and increased plasmatic oxidative stress levels.

Therefore, the aim of this study was to compare capillary remodelling and the morphologic markers of the angiogenic process in skeletal muscle after a 6-week exercise training programme in COPD patients and SHS. In addition, we sought to determine whether the changes in the capillary ultrastructure and the changes in plasmatic levels of F_2 -IsoP were correlated in both groups.

Materials and methods

Study design

This study was conducted on skeletal muscle samples from subgroups of both COPD patients and SHS recruited in two previous studies (registration numbers for clinicaltrials.gov: NCT01183039 and NCT01183052). The subjects were recruited at PhyMedExp (INSERM-CNRS-UM), Montpellier University Hospital, Montpellier, France, or the “La Solane” and “La Vallonie” Pulmonary Rehabilitation Centres in Osseja and Lodève, France. These studies were the subject of a previous publication [Gouzi et al., 2013] [6]. The present study used TEM to more closely investigate the underlying mechanisms of the blunted angiogenesis in response to exercise training found in the main study. The inclusion criteria are available in the previous study [6] and in clinicaltrials.gov/. Briefly, COPD patients were defined by dyspnoea, chronic cough or sputum production and/or a history of exposure to risk factors for the disease, and post-bronchodilator forced expiratory volume in 1 s/forced ventilator capacity ratio < 70% [23]. The exclusion criteria were other respiratory diagnoses, decompensated comorbidity, exacerbation within the last 3 months, and previous participation in an exercise training programme. Study protocols followed the European guidelines for good clinical practice and the Declaration of Helsinki.

Pulmonary function assessment

Pulmonary function was assessed using whole-body plethysmography (Transmural Bodybox 2800; Sensomedics, Yorba Linda, CA, USA). PaO_2 was measured in radial artery blood samples from seated COPD patients under room air condition, with a blood gas analyser (Roche OMNIS, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

Assessment of skeletal muscle function and exercise

The 6-min walking test was conducted in accordance with the ATS statement [24]. COPD patients and SHS also performed an incremental cycleergometric test on a calibrated, electrically-braked cycleergometer (Ergoselect 200P, Ergolyne, Bitz, Germany) in accordance with the ATS/ACCP statement [25]. The mean $\dot{V}O_2$ value over

the last 20 s of the test was used as symptom-limited oxygen uptake ($\dot{V}O_{2i}$). The endurance time of the quadriceps ($T_{lim_{quad}}$) was assessed at a frequency of 10 movements per minute at 30% of the maximal voluntary contraction, as previously described [6]. The level of physical activity was assessed using the Voorrips questionnaire (modified Baecke's questionnaire) [26].

Exercise training programme

The exercise training programme was conducted for 6 weeks with 3 or 4 sessions per week (20 sessions in total) and was supervised by an experienced clinician. The protocol was consistent with the ATS/ERS statements [27]. The sessions lasted 1.5 h, with 45 min of endurance training (10 min of work at the intensity of the ventilatory threshold followed by 5 min of active recovery, repeated 3 times) completed by 30 min of strength-building exercise (8–10 exercises, with sets of 10–15 repetitions). The exercise intensity for the endurance exercise was set individually to the heart rate at the ventilatory threshold [28] and continuously monitored during the session with a cardiofrequency meter. The cycloergometer load was increased over the course of the sessions to maintain the targeted heart rate. The load for the resistance exercise was set at 40% of the isotonic one-repetition maximum (1-RM) of each muscle (deltoid, biceps, triceps and quadriceps) at the first session and progressively increased, targeting 5–6 out of 10 on an exertion scale [29]. This exercise training programme was part of a multi-component and comprehensive pulmonary rehabilitation programme, and it was completed by six small group education sessions (1–1.5 h each) conducted by an experienced therapist specialized in improving health-related behaviours.

Muscle biopsies

Biopsies from the *vastus lateralis* muscle of the COPD patients and SHS were performed before and after exercise training, using the Bergström technique as previously described [6, 30]. Each biopsy was separated into two samples: one part was immediately frozen in isopentane, precooled in liquid nitrogen, and stored at -80°C for histochemical analysis of muscle capillarization (C/F ratio and fibre type characterization; for more details, see Gouzi et al., 2013 [6]); and one part was fixated with a solution of 2.5% glutaraldehyde in PHEM buffer (1X, pH 7.4) and stored at 4°C for TEM analysis of capillary ultrastructure. The TEM samples were recut into smaller samples (about 12 mm^3) and immersed in a second fixative solution (0.5% osmic acid) for 2 h in the dark at room temperature. After dehydration (graded series of ethanol, 30–100%), these blocks were embedded in EmBed 812 resin using an Automated Microwave

Tissue Processor for Electronic Microscopy (Leica EM AMW) and cut into transversal sections 70 nm thick (Leica-Reichert Ultracut E). These sections were stained with a solution of uranyl acetate and lead citrate and observed with a Tecnai F20 transmission electron microscope at 120 kV (CoMET MRI facilities, INM France) to analyse the capillary ultrastructure.

TEM image analysis

Quantitative and semi-quantitative analysis of TEM images was performed using ImageJ software. The software was systematically scaled for each image. A mean 12.3 ± 3.2 capillaries/subject for each time (pre- and post-training) was analysed by three independent blinded operators. The reproducibility of the measurement of capillary morphometry between the three operators was assessed. The mean value of the Lin concordance coefficient [31] was 0.98 ± 0.02 . The capillary remodelling was assessed using morphometric analysis of the principal capillary components, as previously described [32]. The area (A) and circumference (C) of the capillary structures (Lum, EC, BM, Nucl and Pc) were obtained with the free-hand surrounding tool, as previously described [32]. The thickness (T) of Lum, EC and BM and Lum and the relative volume (RV) of EC, BM and Pc were calculated using formulae proposed by Bigler et al. (2016) [32]: $Lum_T = 2^*A_{Lum}/C_{Lum}$; $EC_T = 2^*[(A_{EC} - A_{Lum} - A_{Nucl})/(C_{EC} + C_{Lum} + C_{Nucl})]$; $BM_T = 2^*[(A_{BM} - A_{EC} - A_{Pc})/(C_{BM} + C_{EC} + C_{Pc})]$; $Lum_{RV} = A_{Lum}/A_{BM}$; $EC_{RV} = [(A_{EC} - A_{Lum})/A_{BM}]$; $BM_{RV} = [(A_{BM} - A_{EC})/A_{BM}]$; $Pc_{RV} = A_{Pc}/A_{BM}$. Endothelial nucleus density (ECNuclD) was calculated in the same manner: $ECNuclD = [ECNucl_A / (A_{EC} - A_{Lum})]$. Morphologic markers of the angiogenic process were assessed according to previous studies [12, 32]. The pericyte coverage (PcCov), considered as the ratio of the lines crossing the BM/EC interface and at least one pericyte to the total lines crossing the BM/EC interface, was obtained using grid-based analysis with test points equal to $0.56\text{ }\mu\text{m}^2$. A semi-quantitative analysis was performed to identify the percentage of capillaries associated with Pc/EC interdigitations, abluminal EC sprouts and intraluminal EC folding [9, 12, 32].

Markers of oxidative stress

The levels of plasma-free and esterified isoprostanes (F_2 -IsoP) were assessed to obtain an index of oxidative stress, as previously reported by Kadiiska et al. [33] and Roberts and Milne (2009). Venous blood samples were collected before and after exercise training and centrifuged (2500 rpm, 4°C , 10 min) and plasma was stored at -80°C until analysis. Free and esterified plasmatic F_2 -IsoP levels were determined using gas chromatography-negative ion chemical ionization mass spectrometry, as previously described [22].

Statistical analysis

Baseline characteristics of the COPD and SHS groups were compared with t-tests or the Mann-Whitney U depending on the normality and homoscedasticity of the data. Normality was assessed with the Kolmogorov-Smirnov (K-S) test and homoscedasticity with the Brown and Forsythe test [34]. The data are presented as MEAN (SD) or MEDIAN (Q₁-Q₃) according to the K-S test result. Correlations are described using the Pearson coefficient. As the two groups (SHS and COPD) were evaluated twice (before and after exercise training), we analysed the data with a linear mixed-effect model, taking into account the repeated measures and using the subject effect as a random effect. For this model, the fixed effects were the Time and Group effects and the interaction between these factors (Group x Time). For variables for which a single parametric value was obtained for each capillary, we performed a multilevel linear mixed-effect model, clustering each capillary value according to its subject of origin to avoid the inflation of Type I error [35]. Linear mixed models were fit using the *lme* function from the *nlme* R package [36]. To further detail our results, we completed the analysis with Fisher's LSD post-hoc test when the Group x Time interaction term was significant. The normality of the residual distribution was assessed by a Q-Q plot after each *lme* test [37]. Data were analysed with Statistica 7.1 (StatSoft, Inc.) and R 3.5.0 software (www.r-project.org). Data were plotted using GraphPad Prism 5 (GraphPad Software). A *p*-value < 0.05 was considered significant.

Results

Baseline values of clinical, functional and histomorphologic parameters and changes in response to exercise training

Among 24 COPD patients and 23 SHS included in the main study [Gouzi et al., 2013] [6], we selected all patients for whom we had at least one muscle sample conditioned for TEM analysis, i.e. 9 COPD patients and 7 SHS. The baseline clinical characteristics of the COPD patients and SHS are presented in Table 1.

As shown in Table 2, exercise training induced significant improvement in 6-min walking distance (%pred.) and in endurance time of the quadriceps (Tlim_{quad}) in both groups (Time effect: *p* < 0.001 and *p* = 0.009, respectively). As expected, these two functional parameters were significantly lower in COPD patients than in SHS, regardless of the training effect (Group effect: *p* = 0.006 and *p* = 0.024, respectively). A differential effect of exercise training on symptom-limited oxygen uptake ($\dot{V}O_{2st}$) was found in COPD patients compared with SHS (Group x Time interaction: *p* = 0.020) with a significant increase in the SHS group only (SHS: 13.8 ± 10.4%, *p* =

Table 1 Baseline clinical and functional characteristics of COPD patients and SHS

	COPD	Control	<i>p</i> -value
N	9	7	
Sex ratio (male/female)	8 / 1	6 / 1	
Age (years)	57.3 (6.0)	62.6 (4.5)	NS
FEV ₁ (% pred.)	54.6 (17.5)	116.0 (13.1)	<i>p</i> < 0.001
FEV ₁ / VC	43.6 (9.6)	76.2 (4.4)	<i>p</i> < 0.001
PaO ₂ (mmHg)	71.1 (9.9)		
PA level (Voorrips score)	7.3 (3.2–8.3)	4.1 (1.7–4.9)	NS [§]

Data are presented as mean (SD) or median (Q1-Q3). FEV₁ Forced expiratory volume in 1 s, VC slow vital capacity, % pred: % predicted, PaO₂ arterial oxygen tension, PA Physical activity. [§] Mann-Whitney U Test

0.003 vs COPD: 5.1 ± 8.1%, *p* = 0.28). Regarding the histochemical data, COPD patients showed lower baseline values for the capillary-to-fibre (C/F) ratio compared with SHS (*p* = 0.002 and *p* = 0.024, respectively; Table 2). In response to exercise training, we observed lower improvement in the C/F ratio of COPD patients than SHS (+15% versus +30%; Group x Time interaction: *p* = 0.003), leading to persistent lower post-training values in COPD patients compared with SHS (*p* < 0.001). Similarly, COPD patients presented a reduction of type I fibre proportion in response to exercise training leading to lower post-training values compared to SHS (Group x Time interaction: *p* = 0.01; Additional file 1: Figure. S1).

Angiogenesis-related capillary remodelling in response to exercise training

Capillaries from the *vastus lateralis* muscle biopsies, obtained before and after exercise training in the 9 COPD patients and 7 SHS, were analysed by TEM. The analyses were performed on 392 capillary profiles, which were always composed of at least Lum, EC and BM. Neither total capillary area nor the number of analysed capillaries differed between groups or training times (*p* > 0.05; data not shown). As shown in Table 3, the baseline values of lumen (Lum), endothelium (EC), basement membrane (BM) and pericyte (Pc) relative volume (RV) and thickness (T) did not differ between COPD patients and SHS.

Standard transmission electron micrographs of the skeletal muscle capillaries in COPD patients and SHS, before and after exercise training, are shown in Fig. 1a. Variations of relative volume and thickness of each capillary compartment in response to exercise training are presented in Fig. 1b. In response to exercise training, we observed a significant decrease in Lum_{RV} (COPD: -16.4 ± 21.5%; SHS: -23.3 ± 22.1%; Fig. 1b) and Lum_T (COPD: -7.1 ± 36.8%; SHS: -17.2 ± 22.4%; Fig. 1b) in both groups (Time effect: *p* < 0.001 and *p* = 0.002, respectively). Conversely, a significant training-induced increase was found in both EC_{RV} (COPD: +17.0 ± 24.1%;

Table 2 Functional and histomorphologic changes in response to exercise training in COPD patients and SHS

	Pre-training		Post-training		p-value
	COPD	SHS	COPD	SHS	
Functional parameters					
$\dot{V}O_{2L}$ (% pred.)	69.3 (17.3) †	113.7 (12.7)	72.44 (17.2) †	125.6 (9.6) *** §	T: $p = 0.004$ G: $p < 0.001$ GxT: $p = 0.020$
$\dot{V}O_{2L}$ (ml/min/kg)	19.8 (4.7) †	30.1 (4.4)	21.6 (4.1) †	33.1 (7.9) ** §	T: $p = 0.009$ G: $p < 0.001$ GxT: $p = 0.046$
6MWD (%pred.)	77.2 (10.7)	94.0 (7.3)	84.2 (11.5)	98.7 (7.7)	T: $p < 0.001$ G: $p = 0.006$ GxT: NS
6MWD (m)	539.6 (60.9)	643.3 (60.9)	591.2 (72.4)	684.6 (60.5)	T: $p < 0.001$ G: $p = 0.010$ GxT: NS
$Tlim_{quadr}$ (sec)	299.6 (123.4)	588.6 (382.2)	388.6 (201.2) ‡	830.3 (467)	T: $p = 0.009$ G: $p = 0.024$ GxT: NS
Histomorphologic parameters					
C/F ratio	1.29 (0.3) *	1.67 (0.3)	1.49 (0.3) ** †	2.18 (0.4) ***	T: $p < 0.001$ G: $p = 0.004$ GxT: $p = 0.003$

Data are presented as mean (SD). $\dot{V}O_{2L}$: symptom-limited oxygen uptake, 6MWD 6-min walking distance, $Tlim_{quadr}$: endurance time of quadriceps, C/F ratio Capillary-to-fibre ratio. §: $n = 5$, †: $n = 8$. Linear mixed-effect model, G Group effect, T Time effect, GxT Group x Time interaction. Post-hoc analysis for GxT: different from SHS group at same time: * $p < 0.05$; † $p < 0.01$; ‡ $p < 0.001$. Different from pre-training: ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

SHS: $+22.5 \pm 18.5\%$; Fig. 1b) and EC_T (COPD: $+27.1 \pm 24.9\%$; SHS: $+24.7 \pm 31.0\%$; Fig. 1b), regardless of the group (Time effect: $p < 0.001$ for both). Similarly, we observed a significant increase in Pc_{RV} in both the COPD and SHS groups (COPD: $+68.4 \pm 60.2\%$; SHS: $+40.3 \pm 65.7\%$; Time effect: $p < 0.001$; Fig. 1b). Last, a significantly different response to exercise training was observed in COPD patients compared with SHS for BM_{RV} (Group x Time interaction: $p = 0.008$; Fig. 1b) and BM_T (Group x Time interaction: $p = 0.050$; Fig. 1b), with a significant increase only in the COPD group for both BM_{RV} ($p = 0.005$; $+14.1 \pm 22.6\%$; SHS: $-2.2 \pm 17.3\%$; Fig. 1b) and BM_T ($p = 0.043$; $+9.7 \pm 13.8\%$; SHS: $-0.8 \pm 20.2\%$; Fig. 1b).

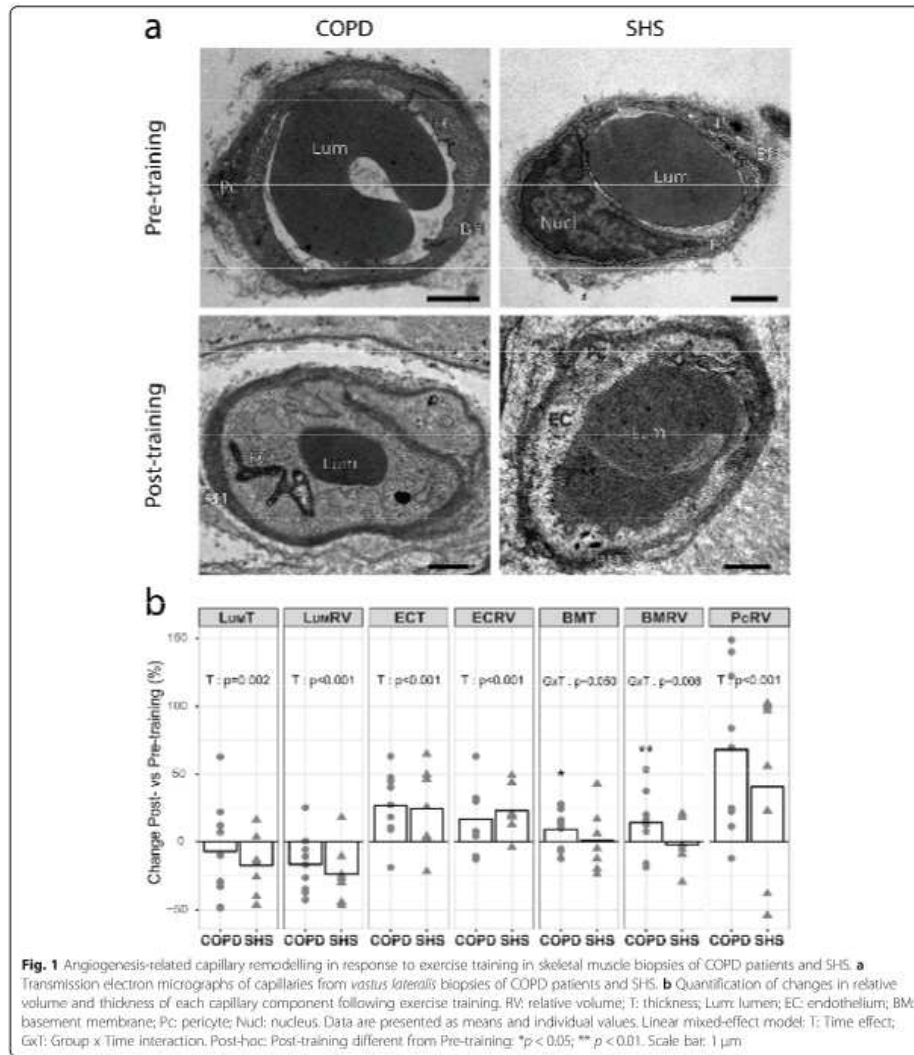
Changes in morphologic markers of the angiogenic process in response to exercise training.

Table 3 Baseline morphometric characteristics of capillary components in COPD patients and SHS

	COPD	SHS	p-value
Lum_T (nm)	1227 (634)	1203 (522)	0.90
EC_T (nm)	388 (122)	358 (116)	0.27
BM_T (nm)	211 (85)	220 (75)	0.99
Lum_{RV} (%)	38.2 (16.8)	39.5 (14)	0.53
EC_{RV} (%)	29.6 (9.1)	27.8 (8.3)	0.30
BM_{RV} (%)	21.0 (7)	22.8 (7.4)	0.64
Pc_{RV} (%)	5.7 (4.8)	5.9 (4.4)	0.82

RV Relative volume, T Thickness, Lum Lumen, EC, Endothelium, BM Basement membrane, Pc Pericyte. Data are presented as Mean (SD)

We quantified the ultrastructural morphologic markers of angiogenesis, which are presented on the transmission electron micrographs in Fig. 2a-c. As shown in Fig. 2d and e, the occurrence of intraluminal EC folding or abluminal EC sprouts did not increase significantly with exercise training ($p > 0.05$). COPD patients and SHS did not show different pre- or post-training values for these indexes either ($p > 0.05$). Conversely, Pc/EC interdigitation occurrence was significantly lower in the COPD group than in SHS (Fig. 2f) (pre-training: $0.46 \pm 0.14\%$ vs $0.56 \pm 0.22\%$; post-training: $0.38 \pm 0.16\%$ vs $0.67 \pm 0.21\%$; Group effect: $p = 0.014$). Moreover, taking into account the baseline difference between COPD patients and SHS, we noted a tendency towards a differential effect of exercise training on this parameter between the two groups (Group x Time interaction: $p = 0.062$). Similarly, we observed significantly different variations of endothelial nucleus density (ECNuclD) in the capillaries of COPD patients compared with SHS in response to exercise training (Group x Time interaction: $p = 0.042$; Fig. 2g). ECNuclD tended to decrease in response to exercise training only in the COPD patients ($-7.3 \pm 67.1\%$, $p = 0.053$; Fig. 2g), leading to a tendency towards lower post-training ECNuclD values in the patients compared with SHS ($p = 0.080$; Fig. 2g). The pericyte coverage ($PcCov$) tended to increase significantly with exercise training in both groups (Time effect: $p = 0.094$; Fig. 2h), with no difference between the groups (COPD: $+17.6 \pm 26.1\%$; SHS: $+16.9 \pm 50.5\%$).

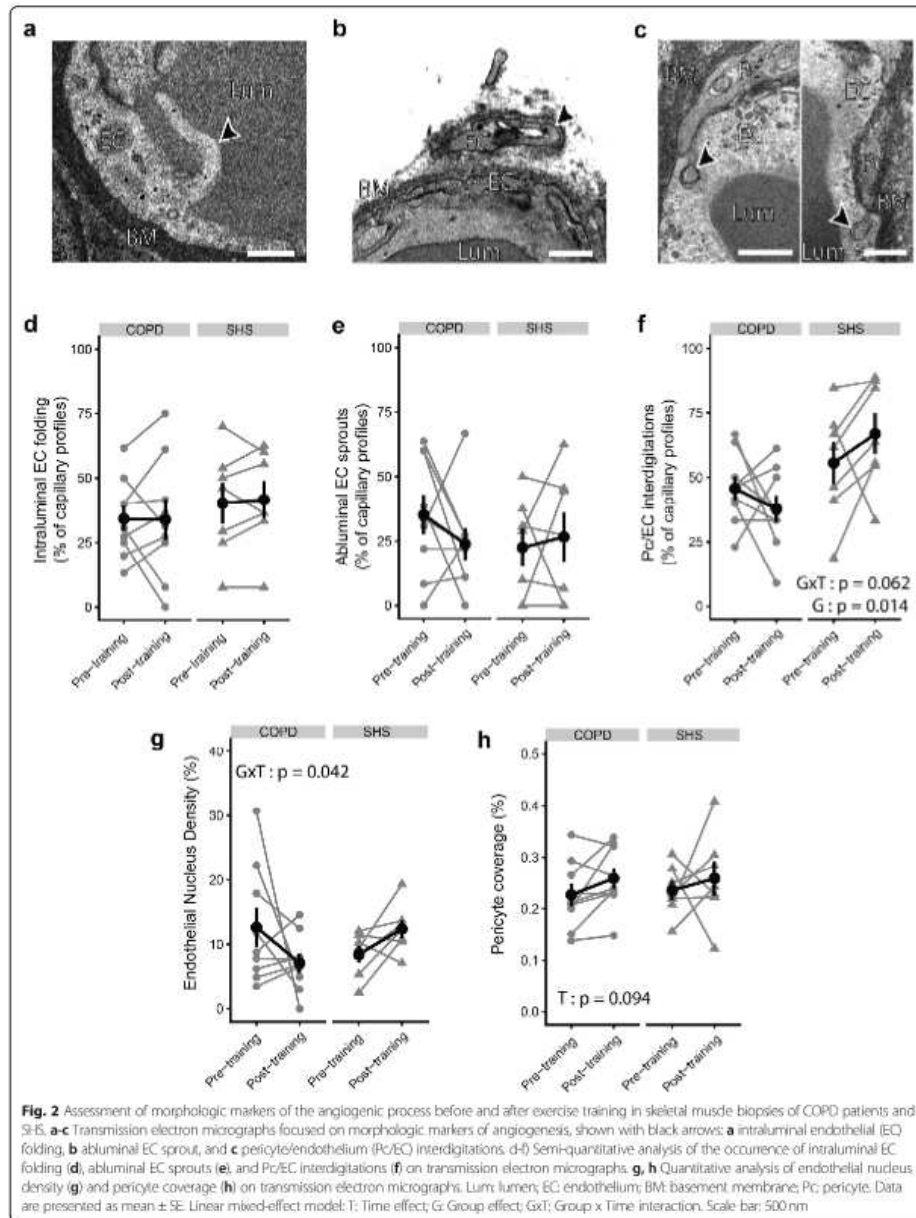


Correlations between the morphologic markers of the angiogenic process and the clinical, functional and histochemical parameters of COPD patients and SHS are presented in Fig. 3. After the 6-week exercise training programme, we found significant and positive correlations between the occurrence of Pc/EC interdigitations

and FEV₁ (%pred.; $r = 0.70$, $p = 0.003$; Fig. 3a), $\dot{V}O_{2st}$ (%pred.; $r = 0.57$, $p = 0.034$; Fig. 3b).

Training-induced changes in plasmatic F₂-IsoP levels

As shown in Fig. 4a, plasmatic levels of F₂-IsoP decreased significantly with exercise training in both



COPD patients and SHS ($-24.5 \pm 19.1\%$ and $-31.1 \pm 17.2\%$, respectively; Time effect: $p < 0.001$). However, regardless of exercise training, plasma F_2 -IsoP was significantly higher in COPD patients than in SHS (pre-training: 335.7 ± 96.1 vs 280.0 ± 71.4 ; post-training: 235.6 ± 42.2 vs 183.5 ± 16.9 ; Group effect: $p = 0.048$; Fig. 4a). Moreover, as shown in Fig. 4b, we found a significant and negative correlation between the changes in Pc/EC interdigitations and the changes in plasmatic levels of F_2 -IsoP in response to exercise training ($r = -0.62$, $p = 0.025$).

Discussion

This study is the first to assess skeletal muscle capillary ultrastructure after exercise training-related angiogenesis in COPD patients. The main result is that the blunted training-induced angiogenesis previously found in COPD patients [6] is associated with abnormal capillary remodelling and morphologic features of an impaired angiogenic process.

Consistent with the previous study in this trial, COPD patients showed significant but blunted improvements in exercise capacity and muscle angiogenesis (Table 2) and an impaired adaptation of the muscle typology (Additional

file 1: Figure S1) in response to exercise training in comparison with sedentary healthy subjects. Together, these observations highlight an impairment of the oxidative metabolism of COPD patients and a misadaptation of this last to exercise training. However, the changes in fibre type under exercise training and the training-induced angiogenesis were poorly correlated (Additional file 1: Figure S1). Moreover, another study on COPD patients found differential angiogenic responses to exercise

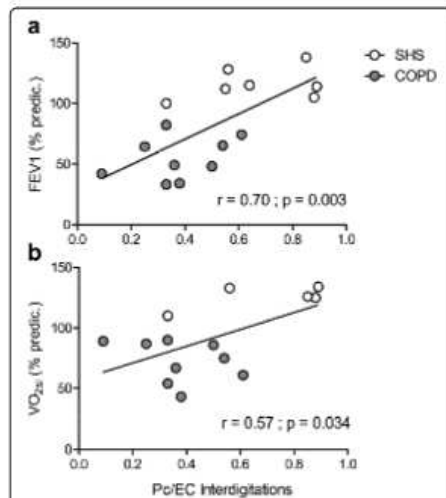


Fig. 3 Correlations between morphologic markers of the angiogenic process and clinical and functional parameters of COPD patients and SHS. Positive significant correlations between the proportion of capillary profiles associated with Pc/EC interdigitations in post-training vastus lateralis biopsies and **a** forced expiratory volume in 1 s (FEV₁) (% predic.), **b** post-training values of symptom-limited oxygen uptake (VO_{2max}), in both COPD patients (grey circles) and SHS (white circles)

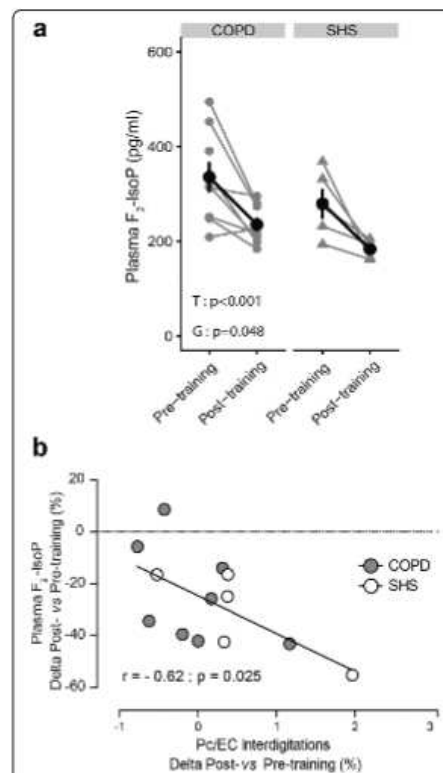


Fig. 4 Changes in plasma-free and esterified isoprostane (F_2 -IsoP) levels in response to exercise training in COPD patients and SHS and the relation to the angiogenic process. **a** Effect of exercise training on plasmatic levels of F_2 -IsoP in COPD and SHS. Linear mixed-effect model; T: Time effect, G: Group effect. Pre-training: COPD: $n = 9$, SHS: $n = 5$; Post-training: COPD: $n = 8$, SHS: $n = 6$. Data are presented as Mean \pm SE. **b** Correlation between the pre-to-post training variations of plasmatic F_2 -IsoP levels and the pre-to-post training variations in Pc/EC interdigitation occurrence in COPD patients (grey circles) and SHS (white circles)

training between two groups of COPD patients, although the groups presented similar adaptations of skeletal muscle typology to the training [38]. Muscle typology alone was thus insufficient to explain the blunted angiogenesis found in these COPD patients, which led us to suspect that other cellular mechanisms might be involved. We therefore conducted this study to investigate capillary remodelling and the morphologic markers of the angiogenic process associated with the blunted training-induced angiogenesis found in these patients. The capillary remodelling and the morphologic markers of the angiogenic process were assessed blindly following cross-validated and previously published methods [12, 32]. The inter-observer reliability of the measurements of capillary remodelling was assessed with three observers and was "excellent" (according to Lin's concordance coefficient) [39].

Our study brings the first evidence of an exercise training effect on capillary ultrastructure in both COPD patients and healthy subjects between 50 and 70 years old and identified as strictly sedentary using a validated method. Both exercise training and ageing are known to alter the capillary ultrastructure in skeletal muscles [12, 32]. To isolate the impact of COPD on capillary ultrastructure and its response to exercise training, we selected COPD patients and SHS who did not differ in age or physical activity level for this study. In SHS, we observed a significant increase in both EC_{RV} and EC_T and no changes in BM_{RV} and BM_T in response to the training (Fig. 1b,c), as previous described in younger and more active healthy subjects [12, 40]. In contrast, we found a decrease in both Lum_{RV} and Lum_T in these SHS following the training programme (Fig. 1b,c), and this decrease has been described as part of the angiogenic process in skeletal muscle [9, 10]. Physiologically, angiogenesis occurs in two phases, an early phase of capillary creation (by sprouting and/or intussusception) in the first 5 weeks of exercise training and then a late phase of capillary maturation [7, 41]. Consistent with this time-course, we observed later angiogenesis-related changes (increased $PcCov$ and PC_{RV}) in SHS at 6 weeks of exercise training (Fig. 1b and Fig. 2f,h) but not the early angiogenesis hallmarks (abluminal EC sprouts or intraluminal EC folding; Fig. 2d,e), in line with the findings of an earlier study in younger healthy subjects [12].

Conversely, the COPD patients presented an abnormal remodelling of capillaries in response to exercise training. While their adaptation of lumen (Lum_{RV} and Lum_T) and endothelium (EC_{RV} and EC_T) in response to training was physiological, they showed an unexpected increase in BM_{RV} and BM_T (Fig. 1b,c). The BM thickening after training was a non-physiological response, and this original result contrasts with what has been shown in other chronic diseases like hypertension, in which training induced BM thinning [40]. Exercise-induced oxidative

stress [42], which is a hallmark of COPD, may be a mechanism in this modification, because oxidative stress disturbs the BM turnover in favour of an accumulation of the BM component [16]. Last, the loss of Pc/EC interdigitations (Fig. 2f) may also have contributed to the BM thickening. Indeed, these interdigitations act as a mechanical link between the endothelium and pericytes, helping the capillaries to resist the dramatic increase in haemodynamic forces during exercise [43, 44]. Thus, the loss of the pericyte-endothelium link in COPD patients could be the cause of compensatory BM thickening.

In addition, our study showed an impaired angiogenic process in response to exercise training in the COPD patients. The skeletal muscle angiogenic process of COPD patients and SHS in response to exercise training was assessed through TEM analysis of the morphologic markers of specific capillary alterations [8–10, 12]. These markers inform about angiogenesis-related mechanisms and possible impairments [9, 12]. As described above, our measures were performed too late to assess the morphologic markers of the early phase of angiogenesis [7] (i.e. abluminal EC sprouts and intraluminal EC folding), and we thus found no changes in these markers in the COPD patients (Fig. 2d,e). However, it is possible to assess the final result of capillary proliferation by measuring the nucleus density in endothelial cells [8, 12]. Here, we found a significantly different response to exercise training for the ECNUd in the COPD patients compared with that of healthy subjects (Fig. 2g), suggesting impaired capillary proliferation during the angiogenic process. This finding is consistent with the blunted angiogenesis found at the histomorphologic level in these patients (Table 2). After 6 weeks of exercise training, we assessed the later phase of the angiogenic process, capillary maturation [7]. The Pc/EC interdigitations, as observed by TEM, are defined as the morphologic expression of capillary maturation [11], which increases during skeletal muscle stimulation [9]. In our study, we found a tendency towards a differential variation in the occurrence of the Pc/EC interdigitations in the COPD patients compared with SHS (Fig. 2f). Moreover, independently of exercise training, the patients presented a significantly lower occurrence of Pc/EC interdigitations. Surprisingly, the $PcCov$ was not impaired in the COPD patients. However, while $PcCov$ is described as a marker of capillary maturation, the maturation effect of pericyte is mainly driven by the exchange of multiple angiogenic factors. Among these, Ang1 plays a crucial role [45] and its exchange mostly occurs at the level of Pc/EC interdigitations [46]. Thus, while the $PcCov$ in COPD patients was not impaired, the loss of Pc/EC interdigitations could lead to a dysfunctional pericyte coverage. However, both Ang1/Tie2 axis and pericyte function remains to be experimentally

assessed in skeletal muscle capillaries of COPD patients. With these results, we bring the first evidence of impaired capillary maturation during exercise training-related angiogenesis in COPD patients. Regardless of exercise training, the COPD patients in our study presented higher levels of plasmatic F₂-IsoP, a marker of oxidative stress-related lipid peroxidation [18], than SHS (Fig. 4a). In addition, the changes in the occurrence of Pc/EC interdigitations in response to the training were negatively correlated with the changes in the plasmatic level of F₂-IsoP (Fig. 4b). In the literature, oxidative stress has been experimentally related to pericyte loss [17, 47]. Indeed, it can increase angiopoietin-2 levels [48], which antagonize the interaction between endothelial cells and pericytes [49, 50]. Moreover, partial suppression of F₂-IsoP by antioxidant supplementation prevents pericyte loss [20]. Based on the literature and the F₂-IsoP results of the present study, we hypothesize that oxidative stress can contribute to the impairment of capillary maturation found in COPD patients. Further experimental studies with oxidative stress intervention (pro- and anti-oxidant treatment in combination with training) in an animal model and COPD patients, associated with TEM analysis, are required to confirm this hypothesis.

The present study shows impairments in capillary remodelling and the angiogenic process in response to exercise training in COPD patients. As discussed in the previous paragraphs, our results constitute an original contribution to knowledge on the muscle cellular adaptations to cardiopulmonary rehabilitation. This study may be of interest to researchers working in the field of skeletal muscle dysfunction and angiogenesis in chronic respiratory diseases because it provides evidence that can guide their research questions and it specifically targets the angiogenesis mechanisms, i.e. the Pc/EC interactions. Our study constitutes a step forward in the search for complementary therapeutic interventions to restore physiological muscle adaptations to exercise training in COPD patients. While it was not the aim of our study, our results raise the question of their clinical relevance. Indeed, BM thickening increases the width of the capillary wall and thus the distance between erythrocytes and mitochondria. Because this distance is crucial in the process of oxygen diffusion and supply to the exercised muscle [51], this BM thickening might limit the improvements in muscle oxygen consumption and $\dot{V}O_{2sl}$ in patients, as in peripheral artery disease patients [13]. Also, contractile pericytes [43] can directly regulate capillary blood flow [52]. Thus, the loss of the Pc/EC interdigitations in COPD patients might also impact the oxygen supply [53] and $\dot{V}O_{2sl}$. Consistently, we found a positive correlation between post-training Pc/EC

interdigitation occurrence and $\dot{V}O_{2sl}$ (Fig. 3b). Last, given that capillary maturation prevents the regression of neo-capillaries [54, 55], the impaired capillary maturation might constitute a mechanism for the blunted training-related angiogenesis in COPD patients. Specifically designed studies with larger samples are required to generalize these results to the whole COPD population and to establish the clinical implications of the defective capillary remodelling and angiogenic process in these patients, as reported in our exploratory study.

Conclusion

Exercise training improves muscle function in COPD patients but to a lesser extent than in healthy subjects, especially regarding the increase in muscle capillarization (i.e. angiogenesis). Here, we provide the first evidence that this blunted angiogenesis is characterized by abnormal capillary remodelling and an impairment in both phases of the angiogenic process, i.e. capillary creation and maturation, in response to exercise training. The loss of pericyte-endothelium interaction appears to be a key factor for the capillary maturation. This study contributes to our understanding of the defective angiogenic process in COPD patients and constitutes a significant step towards isolating the blunted cellular mechanisms in endothelial cells and pericytes. Our observations suggest a hypothetic role for oxidative stress in the angiogenesis defect and open the way for further studies investigating this relationship in COPD patients.

Supplementary information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1186/s12931-019-1240-6>.

Additional file 1 Figure S1. Changes in skeletal muscle typology in response to exercise training in COPD patients and SHS and the relation to the angiogenic process. a) Effect of exercise training on the proportion of type I fibre in vastus lateralis cryosections of COPD patients (grey bars) and SHS (white bars). Linear mixed-effect model. GxT: Group x Time interaction. Post-hoc: **p* < 0.05; *** *p* < 0.001. Data are presented as mean ± SE. b) Correlation between the post-to-pre training variations of type I proportion and the post-to-pre training variations of capillary-to-fibre ratio in COPD patients (grey circles) and SHS (white circles).

Abbreviations

A: Area; BM: Basement Membrane; C: Circumference; C/F: Capillary-to-fibre; COPD: Chronic obstructive pulmonary disease; EC: Endothelial; ECNuclD: Endothelial nucleus density; F₂-IsoP: Plasma-free and esterified isoprostane; FEV1: Forced expiratory volume in one second; Lumen; Pc: Pericyte; PcCov: Pericyte coverage; RV: Relative volume; SHS: Sedentary healthy subjects; T: Thickness; TEM: Transmission electron microscopy; Tlimquad: Endurance time of the quadriceps; $\dot{V}O_{2sl}$: Symptom-limited oxygen uptake

Acknowledgements

The authors would like to thank Chantal Cazevielle from the CoMET MRI facilities (INM, France) for her valuable help in tissue preparation for the transmission electron microscopy and micrograph acquisitions. We also would like to thank C. Stott for her critical reading of the manuscript.

Authors' contributions

LB, EP, MB, PP, FG and JPC performed the experiments. JM, PP, LB, FG, EP, MH and MC conceived and designed the experiments and discussed the data and the manuscript. JM, FG, PP and MH supervised the work. BA, EP, LB and NM collected and analysed the data. APM, FB and NH provided expertise and resources and discussed the data and the manuscript. LB wrote the manuscript. All authors reviewed the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

This study was supported by joint grants from the Centre Hospitalier Régional Universitaire Montpellier, patient associations and the Association Pour l'Assistance et la Réhabilitation à domicile (APARD). FG was supported by a Conventions Industrielles de Formation par la Recherche (CIFRE) grant from the 5 Santé group, France, and the French Ministère Délégué à la Recherche et aux Nouvelles Technologies.

Availability of data and materials

The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Ethics approval and consent to participate

The two studies were approved by the institutional ethics committee of the Montpellier University Hospitals (2008-EES5-V2 and 2009-04-BPCO-V2). All subjects had given informed written consent before starting the studies and agreed to the utilization of their muscle samples in future studies.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

FG received financial support for congress participation from SOS Oxygène, LVL Médical, Eole Santé, APARD, Agir à Dom' and Bastide Médical. FB received financial support for congress participation from SOS Oxygène, LVL Médical, Oxykin, Eole Santé, APARD and Agir à Dom'. All other authors declare that they have no competing interest.

Author details

¹Physiologie & médecine expérimentale du Cœur et des Muscles (PhyMedExp), INSERM - CNRS - Montpellier University, CHU Arnaud De Villeneuve, 371 avenue du Doyen Gaston Giraud, 34295 Montpellier cedex 5, France. ²Les Cliniques du Souffle, Groupe 5 Santé, Lodève, France. ³PhyMedExp, INSERM - CNRS, Montpellier University, CHU Montpellier, Montpellier, France. ⁴IMAG, CNRS, Montpellier University, CHU Montpellier, Montpellier, France. ⁵Vascular Medicine Department and Laboratory, CHU Nîmes and EA2992 Research Unit, Montpellier University, Nîmes, France.

Received: 9 August 2019 Accepted: 13 November 2019

Published online: 05 December 2019

References

- Vanilleteren LEGW, Spruit MA, Groenen M, Gaffron S, van Empel VPM, Bruijnzeel PLB, et al. Clusters of Comorbidities Based on Validated Objective Measurements and Systemic Inflammation in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;187(7):728–35.
- Marquis K, Debigaré R, Lacasse Y, LeBlanc P, Jobin J, Carrier G, et al. Mid-thigh muscle cross-sectional area is a better predictor of mortality than body mass index in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;166(6):809–13.
- Oga T, Nishimura K, Tsukino M, Sato S, Hagiuro T. Analysis of the factors related to mortality in chronic obstructive pulmonary disease: role of exercise capacity and health status. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;167(4):544–9.
- Swallow EB, Reyes D, Hopkinson NS, Man WD-C, Porcher R, Cetti EJ, et al. Quadriceps strength predicts mortality in patients with moderate to severe chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 2007;62(2):115–20.
- Maitais F, Decramer M, Casaburi R, Barreiro E, Burelle Y, Debigaré R, et al. An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: update on limb muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014;189(9):15–62.
- Gouzi F, Préfaut C, Abdellaoui A, Roudier E, de Riga P, Molinari N, et al. Blunted muscle angiogenic training response in COPD patients versus sedentary controls. *Eur Respir J* avr. 2013;41(4):806–14.
- Haas TL, Nwadozi E. Regulation of skeletal muscle capillary growth in exercise and disease. *Appl Physiol Nutr Metab* déc. 2015;40(12):1221–32.
- Egginton S, Zhou A-L, Brown MD, Hudlická O. Unorthodox angiogenesis in skeletal muscle. *Cardiovasc Res*. 2001;49(3):634–46.
- Egginton S, Hudlická O, Brown MD, Graciotti L, Granata AL. In Vivo Pericyte-endothelial cell interaction during angiogenesis in adult cardiac and skeletal muscle. *Microvasc Res* mars. 1996;51(2):213–28.
- Zhou A-L, Egginton S, Brown MD, Hudlická O. Capillary growth in overloaded, hypertrophic adult rat skeletal muscle: an ultrastructural study. *Anat Rec Off Publ Am Assoc Anat*. 1998;252(1):49–63.
- Caruso RA, Fedele F, Finocchiaro G, Pizzi G, Nunnari M, Gitto G, et al. Ultrastructural descriptions of pericyte/endothelium peg-socket interdigitations in the microvasculature of human gastric carcinomas. *Anticancer Res* janv. 2009;29(1):449–53.
- Baum O, Gübeli J, Frese S, Torchetti E, Malik C, Odriziozola A, et al. Angiogenesis-related ultrastructural changes of capillaries in human skeletal muscle in response to endurance exercise. *J Appl Physiol*. 2015;119(11):1118–1126. [doi:10.1152/jap.00594.2015](https://doi.org/10.1152/jap.00594.2015).
- Baum O, Bigler M. Pericapillary basement membrane thickening in human skeletal muscles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2016;311(3):H654–66.
- Wallberg-Henriksson H, Gunnarsson R, Henriksson J, Ostman J, Wahren J. Influence of Physical Training on Formation of Muscle Capillaries in Type I Diabetes. *Diabetes*. 1984;33(9):851–7.
- Raskin P, Pietri AO, Unger R, Shannon WA. The Effect of Diabetic Control on the Width of Skeletal-Muscle Capillary Basement Membrane in Patients with Type I Diabetes Mellitus. *N Engl J Med*. 1983;309(25):1546–50.
- Mason RM, Wahab NA. Extracellular Matrix Metabolism in Diabetic Nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14(5):1358–73.
- Hayden MR, Yang Y, Habibi J, Bagree SV, Sowers JR. Pericytopathy: oxidative stress and impaired cellular longevity in the pancreas and skeletal muscle in metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Oxidative Med Cell Longev*. 2010;3(5):290–303.
- Roberts LJ, Milne GL. Isoprostanes. *J Lipid Res* avr. 2009;50(Suppl):5219–23.
- Benddorf RA, Schwedhelm E, Grann A, Taheri R, Kom G, Dirlé M, et al. Isoprostanes inhibit vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration, tube formation, and cardiac vessel sprouting in vitro, as well as angiogenesis in vivo via activation of the thromboxane A2 receptor: a potential link between oxidative stress and impaired angiogenesis. *Circ Res*. 2008;103(9):1037–46.
- Tsai GY, Cui JZ, Syed H, Xia Z, Ozerdem U, McNeill JH, et al. Effect of N-acetylcysteine on the early expression of inflammatory markers in the retina and plasma of diabetic rats. *Clin Experiment Ophthalmol* mars. 2009;37(2):223–31.
- Couillard A, Préfaut C. From muscle disuse to myopathy in COPD: potential contribution of oxidative stress. *Eur Respir J* oct. 2005;26(4):703–19.
- Delamplé D, Durand F, Severac A, Belghith M, Mas E, Michel F, et al. Implication of xanthine oxidase in muscle oxidative stress in COPD patients. *Free Radic Res* janv. 2008;42(9):807–14.
- Vogelmeier CF, Criner GJ, Martinez FJ, Anzueto A, Barnes PJ, Bourbeau J, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive lung disease 2017 report. GOLD Executive Summary. *Am J Respir Crit Care Med* mars. 2017;195(5):557–82.
- Statement ATS. ATS statement: guidelines for the six-minute walk test. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;166(1):111–7.
- ATS/ACCP Statement. ATS/ACCP Statement on Cardiopulmonary Exercise Testing. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;167(2):211–77.
- Voorrips LE, Ravelli AC, Dongelmans PC, Deurenberg P, Van Staveren WA. A physical activity questionnaire for the elderly. *Med Sci Sports Exerc* août. 1991;23(8):974–9.
- Spruit MA, Singh SJ, Garvey C, ZuWallack R, Nicl L, Rochester C, et al. An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: key concepts and advances in pulmonary rehabilitation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;188(8):13–64.
- Vallet G, Ahmaidi S, Serres L, Fabre C, Bourgouin D, Desplan J, et al. Comparison of two training programmes in chronic airway limitation patients: standardized <math>\dot{V}</math> versus <math>\dot{V}</math>; individualized protocols. *Eur Respir J*. 1997;10(1):14–22.

29. Nelson ME, Rejeski WJ, Blair SN, Duncan PW, Judge JO, King AC, et al. Physical activity and public health in older adults: recommendation from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. *Med Sci Sports Exerc* août. 2007;39(8):1435–45.
30. Hayot M, Michaud A, Koehlin C, Caron M-A, LeBlanc P, Préfaut C, et al. Skeletal muscle microbiopsy: a validation study of a minimally invasive technique. *Eur Respir J*. 2005;25(3):431–40.
31. Lawrence I, Lin K. A concordance correlation coefficient to evaluate reproducibility. *Biometrics*. 1989;45:255–68.
32. Bigler M, Koutsantonis D, Odriozola A, Halm S, Tschanz SA, Zakrzewicz A, et al. Morphometry of skeletal muscle capillaries: the relationship between capillary ultrastructure and ageing in humans. *Acta Physiol (oct)*. 2016;218(2): 98–111.
33. Kadziska MB, Gladen BC, Baird DD, Germolec D, Graham LB, Parker CE, et al. Biomarkers of oxidative stress study II: are oxidation products of lipids, proteins, and DNA markers of CCl₄ poisoning? *Free Radic Biol Med* mars. 2005;38(6):698–710.
34. Brown MB, Forsythe AB. Robust tests for the equality of variances. *J Am Stat Assoc* juin. 1974;69(346):364–7.
35. Aarts E, Verhage M, Veenvliet JV, Dolan CV, van der Sluis S. A solution to dependency: using multilevel analysis to accommodate nested data. *Nat Neurosci* avr. 2014;17(4):491–6.
36. Pinheiro J, Bates D, DebRoy S, Sarkar D. R Core Team (2014) nlme: linear and nonlinear mixed effects models. R package version 3; 2014, p. 1–117. Available from: <http://cran.r-project.org/package=nlme>
37. Faraway JJ. Extending the linear model with R: generalized linear, mixed effects and nonparametric regression models, vol. 124; 2016. CRC press
38. Costes F, Gosker H, Feasson L, Desgeorges M, Kelders M, Castells J, et al. Impaired exercise training-induced muscle fiber hypertrophy and Akt/mTOR pathway activation in hypoxemic patients with COPD. *J Appl Physiol*. 2015; 118(8):1040–9.
39. Partik BL, Stadler A, Schamp S, Koller A, Voracek M, Heinz G, et al. 3D versus 2D ultrasound: accuracy of volume measurement in human cadaver kidneys. *Investig Radiol*. 2002;37(9):489–95.
40. Glemann L, Buess R, Nyberg M, Hoppeler H, Odriozola A, Thaning P, et al. Capillary growth, ultrastructure remodelling and exercise training in skeletal muscle of essential hypertensive patients. *Acta Physiol (juin)*. 2015;214(2):210–20.
41. Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* juin. 2003;9(6): 685–93.
42. Couillard A, Maltais F, Soey D, Debigaré R, Michaud A, Koehlin C, et al. Exercise-induced Quadriceps Oxidative Stress and Peripheral Muscle Dysfunction in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;167(12):1664–9.
43. Tilton RG, Kilo C, Williamson JR. Pericyte-endothelial relationships in cardiac and skeletal muscle capillaries. *Microvasc Res*. 1979;18(3):325–35.
44. Andersen P, Saltin B. Maximal perfusion of skeletal muscle in man. *J Physiol sept*. 1985;366:233–49.
45. Suri C, McClain J, Thurston G, McDonald DM, Zhou H, Oldmixon EH, et al. Increased Vascularization in Mice Overexpressing Angiopoietin-1. *Science*. 1998;282(5388):468–71.
46. Wakui S, Yokoo K, Muto T, Suzuki Y, Takahashi H, Furusato M, et al. Localization of Ang-1, -2, Tie-2, and VEGF expression at endothelial-pericyte interdigitation in rat angiogenesis. *Lab Invest*. 2006;86(11):1172.
47. Cacicedo JM, Benjacharewong S, Chou E, Ruderman NB, Ido Y. Palmitate-Induced Apoptosis in Cultured Bovine Retinal Pericytes: Roles of NAD(P)H Oxidase, Oxidant Stress, and Ceramide. *Diabetes*. 2005;54(6):1838–45.
48. Mofarrah M, Sigala I, Vasilokopoulos T, Harel S, Guo Y, Debigare R, et al. Angiogenesis-related factors in skeletal muscles of COPD patients: roles of angiopoietin-2. *J Appl Physiol*. 2013;114(9):1309–18.
49. Annunzi A. Endothelial/Pericyte Interactions. *Circ Res*. 2005;97(6):512–23.
50. Zeng H, He X, Tuo Q, Liao D, Zhang G, Chen J. LPS causes pericyte loss and microvascular dysfunction via disruption of Slit3/angiopoietins/Tie-2 and HIF-2α/Notch3 pathways. *Sci Rep*. [cité 12 déc 2018]; 2016;20931. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4751495/>.
51. Weibel ER. The Structural Conditions for Oxygen Supply to Muscle Cells: The Krogh Cylinder Model. *J Exp Biol*. 2013;216(22):4135–7.
52. Hall CN, Reynell C, Gesslein B, Hamilton NB, Mishra A, Sutherland BA, et al. Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease. *Nature* avr. 2014;508(7494):55–60.
53. Kisler K, Nelson AR, Rege SV, Ramanathan A, Wang Y, Ahuja A, et al. Pericyte degeneration leads to neurovascular uncoupling and limits oxygen supply to brain. *Nat Neurosci* mars. 2017;20(3):406–16.
54. Gianni-Bariera R, Burger M, Wolff T, Heberer M, Schaefer DJ, Gürke L, et al. Long-term safety and stability of angiogenesis induced by balanced single-vector co-expression of PDGF-BB and VEGF164 in skeletal muscle. *Sci Rep*. 2016; [cité 12 déc 2018];6. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4756385/>.
55. Erber R, Thumher A, Katsen AD, Groth G, Kerger H, Hammes H-P, et al. Combined inhibition of VEGF and PDGF signaling enforces tumor vessel regression by interfering with pericyte-mediated endothelial cell survival mechanisms. *FASEB J*. 2004;18(2):338–40.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

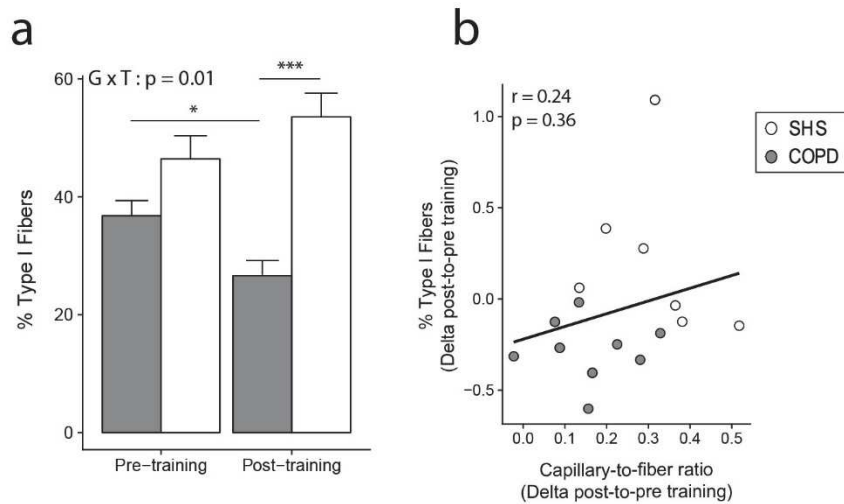
At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



Fichier additionnel

Supplementary figures



Supplementary Figure 1. Changes in skeletal muscle typology in response to exercise training in COPD patients and SHS and the relation to the angiogenic process. a) Effect of exercise training on the proportion of type I fibre in vastus lateralis cryosections of COPD patients (grey bars) and SHS (white bars). Linear mixed-effect model: GxT: Group x Time interaction. Post-hoc: * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$. Data are presented as mean \pm SE. b) Correlation between the post-to-pre training variations of type I proportion and the post-to-pre training variations of capillary-to-fiber ratio in COPD patients (grey circles) and SHS (white circles).

Etude 2

Article original

COPD is deleterious for pericytes: implications during training-induced angiogenesis in skeletal muscle

Léo Blervaque, Pascal Pomiès, Elisa Rossi, Matthias Catteau, Adeline Blandinières, Emilie Passerieux, Marine Blaquièrre, Bronia Ayoub, Nicolas Molinari, Jacques Mercier, Antonia Perez-Martin, Nicola Marchi, David M. Smadja, Maurice Hayot, Fares Gouzi

Article publié en Novembre 2020 dans la revue

American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology

Présentation de l'étude n°2

Nous avons pu mettre en lumière dans le chapitre 3 de la partie 1 le rôle clef occupé par les péricytes dans le processus d'angiogenèse musculaire. Ces derniers représentent ainsi une piste dans la compréhension des réponses angiogéniques altérées au réentraînement à l'effort (REE) chez les patients BPCO. Renforçant cette idée, les interactions entre péricytes et capillaires sanguins étaient perturbées chez les patients BPCO de l'étude n°1. De plus, cette perturbation était liée aux niveaux de stress oxydant circulants. Ainsi, l'étude n°2 s'est intéressée aux variations de couverture péricytaire capillaire chez des patients BPCO et les contrôles sédentaires sains (CSS). De plus, le rôle délétère des facteurs circulants de la BPCO sur les interactions péricyte/capillaire a été exploré *in vitro*. L'angiogenèse étant un processus dynamique et dépendant de l'intensité d'effort, nous avons fait le choix d'évaluer les sujets à deux reprises, après 5 et 10 semaines de REE et de tester 2 modalités de REE chez les patients BPCO. La moitié des sujets BPCO (n=7) était réentraînée à la même intensité absolue (en ml/min/kg de $V'O_2$) que les sujets sains alors que l'autre était réentraînée à la même intensité relative (en % de $V'O_{2max}$). Grâce à des techniques d'immunofluorescence sur cryosections de biopsies musculaires (fiche technique n°5 &6), nous avons pu évaluer la couverture péricytaire des capillaires musculaires et mettre en évidence une absence d'augmentation de cette couverture chez les patients BPCO des deux groupes sous l'effet du REE, contrairement aux sujets sains. Ce défaut d'adaptation de couverture péricytaire apparaissait dans un contexte d'augmentation normale du nombre de capillaires sanguin dans tous les groupes. Ainsi, nous avons ensuite, à l'aide de techniques de culture et de co-culture cellulaire (fiche technique n°12&13), exploré la contribution de facteurs circulants délétères de la BPCO dans les altérations de la couverture péricytaire visibles chez ces patients. Le sérum de patients BPCO induisait un remodelage pathologique des péricytes *in vitro*, ces derniers adoptant une forme allongée habituellement associée à leur détachement des capillaires sanguins *in vivo*. De plus, l'exposition à ce même sérum compromettait grandement les interactions entre précurseurs péricytaires et endothéliaux, perturbant le recrutement et la différenciation péricytaire. Au total, un rôle pour les facteurs circulants de la BPCO dans l'altération de la couverture péricytaire a été mis en évidence *in vitro* dans cette étude.

COPD is deleterious for pericytes: implications during training-induced angiogenesis in skeletal muscle

Léo Blervaque^{1*}, Pascal Pomiès¹, Elisa Rossi², Matthias Catteau¹, Adeline Blandinières³, Emilie Passerieux¹, Marine Blaquièrè⁷, Bronia Ayoub⁴, Nicolas Molinari⁵, Jacques Mercier⁴, Antonia Perez-Martin⁶, Nicola Marchi⁷, David M. Smadja³, Maurice Hayot⁴, Fares Gouzi⁴

¹. PhyMedExp, INSERM - CNRS - Montpellier University, Montpellier, France

². Université de Paris, Innovative Therapies in Haemostasis, INSERM, F-75006 Paris, France

³. Université de Paris, Innovative Therapies in Haemostasis, INSERM, F-75006 Paris, France, Service d'Hématologie et Laboratoire de Recherches Biochirurgicales (Fondation Carpentier), AH-HP, Georges Pompidou European Hospital, F-75015 Paris, France

⁴. PhyMedExp, INSERM - CNRS - Montpellier University, CHU Montpellier, Montpellier, France

⁵. IMAG, CNRS, Montpellier University, CHU Montpellier, Montpellier, France

⁶. Vascular Medicine Department and Laboratory, CHU Nîmes and EA2992 Research Unit, Montpellier University, Nimes, France

⁷. Cerebrovascular and Glia Research, Department of Neuroscience, Institute of Functional Genomics (UMR 5203 CNRS – U1191 INSERM, University of Montpellier), France

* **Corresponding author:** Léo Blervaque, Physiologie et Médecine Expérimentale Cœur Muscles (PhyMedExp)
CHU Arnaud De Villeneuve - 371 avenue du Doyen Gaston Giraud - 34295 MONTPELLIER cedex 5
Phone: +33 610 228 277E-mail: leo.blervaque@umontpellier.fr

Abstract

Rationale: Improvements in skeletal muscle endurance and oxygen uptake are blunted in COPD patients, possibly because of a limitation in the muscle capillary oxygen supply. Pericytes are critical for capillary blood flow adaptation during angiogenesis but may be impaired by COPD systemic effects, which are mediated by circulating factors. This study compared the pericyte coverage of muscle capillaries in response to 10 weeks of exercise training in COPD patients and sedentary healthy subjects (SHS).

Methods: Fourteen COPD patients were compared to seven matched SHS. SHS trained at moderate intensity corresponding to their first ventilatory threshold. COPD patients trained at the same relative ($\%V'O_2$: COPD-RI) or absolute (ml/min/kg: COPD-AI) intensity as SHS. Capillary-to-fiber ratio (C/F) and pericyte coverage were assessed from *vastus lateralis* muscle biopsies, before and after 5 and 10 weeks of training. We also tested *in vitro* the effect of COPD and SHS serum on pericyte morphology and mesenchymal stem cell (MSC) differentiation into pericytes.

Results: SHS showed greater improvement in aerobic capacity ($V'O_{2VT}$) than both COPD-RI and COPD-AI patients (Group \times Time: $p=0.004$). Despite a preserved increase in the C/F ratio, pericyte coverage did not increase in COPD patients in response to training, contrary to SHS (Group \times Time: $p=0.011$). Conversely to SHS serum, COPD serum altered pericyte morphology ($p<0.001$) and drastically reduced MSC differentiation into pericytes ($p<0.001$).

Conclusions: Both functional capacities and pericyte coverage responses to exercise training are blunted in COPD patients. We also provide direct evidence of the deleterious effect of COPD circulating factors on pericyte morphology and differentiation.

Key words: COPD, exercise training, angiogenesis, pericyte.

Introduction

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a respiratory disease with associated muscle and vascular comorbidities. Aerobic exercise capacity as assessed by maximal oxygen uptake during exercise ($V'O_{2max}$) is impaired in COPD patients¹, and the reduced $V'O_{2max}$ is the result of impairments in both muscle convective and diffusive O_2 transport². The altered diffusive component is due to muscle capillary rarefaction³⁻⁵. Improving $V'O_{2max}$ is critical in COPD because it is a determinant of patient quality of life and survival¹. However, we showed that COPD patients improve less than sedentary healthy subjects (SHS) in both muscle endurance

and $V'O_{2max}$ in response to exercise training and that these smaller improvements are related to a defect in muscle capillary creation⁶.

Interestingly, recent studies have also pointed to the role of capillaries in the regulation of the convective O_2 supply⁷, which relies on the vasoactive property of the cells that cover the capillaries: the pericytes⁸. Indeed, studies have demonstrated that the control of muscle blood flow at the capillary level depends on pericytes^{9–11}. Specifically, the deletion of pericyte coverage or contraction/relaxation abilities was found to suppress blood flow regulation by capillaries in skeletal muscle^{9–11}. Consistently, greater improvement in capillary blood flow was observed under pro-angiogenic intervention when capillary pericyte coverage increased, independently of capillary creation^{12–16}. Last, 8 weeks of exercise training increased both capillary creation and pericyte coverage of skeletal muscle capillaries¹⁷. Thus, the adaptation of pericyte coverage appears to be an important mechanism in the physiological muscle improvements due to exercise training.

In COPD patients, we and others have observed that muscle endurance, $V'O_{2max}$ and capillary creation show impaired responses to training^{6,18}. We also found ultrastructural impairments in the pericyte/endothelium interactions during training-induced angiogenesis in these patients¹⁹. It therefore may be that a defective increase in capillary pericyte coverage completes the picture of the blunted muscle angiogenesis in COPD patients. Pericyte dysfunction was also indirectly observed outside of muscle in these patients—in endoneural²⁰ and cerebral capillaries²¹—and pericyte impairment may therefore result principally from a systemic effect of the pathology. The serum of COPD patients contains numerous deleterious factors²² and impairs muscle-derived cells *in vitro*²³. It thus might mediate this systemic effect. However, direct experimental demonstration of a deleterious effect of COPD circulating factors on pericytes is still lacking.

Therefore, the aims of this study were the following: (1) to compare *in vivo* the capillary pericyte coverage and capillary creation in response to exercise training in the skeletal muscle of COPD patients and SHS and to assess their muscle endurance and $V'O_{2max}$, and (2) to provide *in vitro* experimental evidence of a deleterious effect of COPD circulating factors on pericyte morphology and mesenchymal stem cell (MSC) differentiation into pericytes. To control the effect of exercise intensity or duration on the blunted functional and angiogenic responses,

two groups of COPD patients were trained at either the same relative ($\%V'O_{2\max}$: RI group) or the same absolute ($\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$: AI group) intensity as SHS, in a randomized, controlled double-blind design, and all were evaluated before and after 5 and 10 weeks of exercise training.

Material and methods

Population

Between December 2013 and May 2015, 14 COPD patients and 7 SHS between 40 and 78 years old were included and provided informed consent to participate in the study (ethics committee number: 2013-A01199-36). The protocol was in line with the Declaration of Helsinki and the European guidelines for good clinical practice and was pre-registered in www.clinicaltrials.gov (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02040363). Inclusion criteria for the COPD patients were²⁴: association of dyspnea, chronic cough, or sputum and/or chronic history of exposure to disease risk factors, a post-bronchodilation Forced Expiratory Volume in one second (FEV_1)/Forced Vital Capacity (FVC) ratio <0.7 , and no exacerbation episodes in the previous 4 weeks. The patients also had to present an indication for pulmonary rehabilitation as defined in the official statement as those patients who present “persistent symptoms, limited activity, and/or are unable to adjust to illness despite otherwise optimal medical management”²⁵. Each control subject was matched for age (± 3 years) and sex with two COPD patients. They had to be pathology-free after medical examination, free from tobacco-smoking for >10 years with <10 pack-years, and practice <150 min/week of moderate-to-vigorous physical activity (Voorrips questionnaire score <9.4).

Pulmonary rehabilitation

After the cardiopulmonary exercise test (CPET), functional tests and *vastus lateralis* biopsies, two exercise training intensities (AI and RI) were determined for each pair of COPD patients according to the first ventilatory threshold intensity of the matched SHS. The patients were then randomized into the AI or RI group. Randomization was centralized in the statistics department of Montpellier University Hospital. Investigators, rehabilitation caregivers, the statistician and COPD patients were blinded to the training intensity. Then, the COPD patients

and SHS participated in 10 weeks (36 sessions) of exercise training, which combined endurance and resistance exercises according to international standards and as previously described⁶. Sessions of therapeutic education completed the program. Additional details on the exercise protocol can be found in the supplementary data section.

Functional evaluation and muscle biopsies

Resting lung function was assessed using a plethysmographic spirometer (Medisoft BodyBox 5500, Belgium). Body composition indices were determined using a segmental multifrequency bioelectronic impedance meter. CPET was conducted using a cyclo-ergometer (Ergometrics 900, Ergo-line, Germany) following international standards²⁶. Two investigators blindly determined the first ventilatory threshold in SHS following recommended methods²⁶. The 6-minute walking test (6MWT) was performed according to ATS guidelines²⁷ and the quadriceps endurance (qTlim) was assessed as previously described⁶. The *vastus lateralis* muscle was biopsied as previously described⁶. All evaluations and biopsies were performed at the beginning of exercise training and repeated after 5 weeks (22 sessions) and 10 weeks (14 additional sessions).

Muscle analysis

Muscle biopsies were stored at -80°C until analysis. Cryosections of muscle samples (14 µm thick) were performed for all subjects, for the three training times. Sections were stained using anti-CD31 antibodies (# 550389; BD Biosciences), which allowed us to calculate the capillary-to-fiber ratio (C/F), as previously described⁶, on 150 fibers. Pericyte coverage was calculated as described elsewhere²⁸⁻³¹. Briefly, neural/glial antigen 2 (NG2)-positive area (anti-NG2 antibodies; #ab83178, Abcam) and platelet endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM1/CD31)-positive area were separately subjected to a threshold process and the ratio of NG2-positive area to CD31-positive area was calculated. Pericyte coverage for each point analysis was calculated on a mean of 108±21 capillaries. The proportion of pericytes expressing α-smooth muscle actin (αSMA) (anti-αSMA antibodies; #ab7817, Abcam) was calculated as the ratio of the number of αSMA-positive/NG2-positive pericytes to the total number of NG2-positive pericytes established on an average of 175±31 pericytes. All analyses

were performed on three randomly chosen regions using ImageJ software under blinded conditions. Further details on muscle analysis are providing in the supplementary data section.

ECFC/MSC co-culture, pericyte culture and morphologic analysis

For the *in vitro* analysis, post-training serums from seven COPD (3 from IA and 4 from IR) and seven SHS were tested individually. Human brain vascular pericytes (ScienCell Research Laboratories, Inc) were exposed to 20% (v/v) of the SHS or COPD serums described above for 15 hr. Cells were fixed and stained with phalloidin (ab176756, Abcam) for elongation analysis, as previously described³². Images were analyzed with the Shape Descriptors ImageJ plug-in, under blinded conditions, on 40 pericytes/subject, from ≥ 10 randomly chosen fields. More detail about the cell culture and analysis are available in the supplementary data. Endothelial colony-forming cells (ECFCs) and MSCs were isolated as previously described³³ and seeded at a 1:1 ratio for 7 days in presence of 10% FSC or 20% (v/v) SHS or COPD serum. Then co-cultures were fixed and stained with von Willebrand factor (1:500, Dako) or rabbit anti-human calponin (1:100, Abcam) primary antibodies to assess the MSC differentiation into pericytes, as previously described^{33,34}. At least three randomly chosen fields per condition were analyzed with ImageJ.

Statistical analysis

Characteristics of the two COPD groups and SHS were compared at baseline by one-way analysis of variance or the Kruskal-Wallis test, depending on data normality. Response to exercise training for all variables was analyzed with a linear mixed effect (LME) model fit with the R package *nlme*, including Group effect (G), Time effect (T), the interaction between these factors (GxT) as the fixed effect, and the Subject effect as the random effect³⁵. Pearson or Spearman coefficients described the correlations. Data were analyzed with R-3.5.0 software (www.r-project.org) and plotted with GraphPad Prism 5 (GraphPad Software). A p-value <0.05 was considered significant. Details of statistical analysis and sample size calculation are provided in the supplementary data.

Results

Basal characteristics of COPD patients and SHS

Clinical and functional baseline characteristics of the COPD patients (AI and RI) and SHS are presented in Table 1. The COPD patients had mild-to-moderate airway obstruction and their BODE index was ≤ 4 . In addition, none of these patients presented a SpO₂ < 96% at rest, indicating the absence of hypoxemia at rest. We found no difference in sex ratio, age, body composition or physical activity level between the three groups. All subjects were sedentary as shown by a Voorrips score < 9.4 (Table 1). COPD-AI and COPD-RI showed significantly lower baseline values of symptom-limited oxygen uptake ($V'O_{2SL}$) than SHS (Group effect: $p=0.004$, Table 1).

Table 1. Baseline clinical and functional characteristics of chronic obstructive pulmonary disease patients in absolute intensity (COPD-AI) and relative intensity (COPD-RI) groups and sedentary healthy subjects (SHS).

	SHS	COPD AI	COPD RI	p-value
Subjects (n)	7	7	7	
Sex (male/female)	4/3	4/3	4/3	
Age (years)	63.3 ± 5.8	64.0 ± 4.3	67.0 ± 5.7	0.40
FEV ₁ (% pred.)	109.9 ± 16.9	70.7 ± 20.4 ***	78.6 ± 17.6 **	< 0.01
FEV ₁ /VC (% pred.)	74.1 ± 4.0	59.3 ± 13.5 *	57.6 ± 10.3 **	< 0.01
BMI (kg.m ⁻²)	26.4 ± 3.2	24.9 ± 3.6	27.5 ± 4.0	0.40
FFMI (kg.m ⁻²)	18.6 ± 2.1	17.7 ± 3.2	19.4 ± 3.4	0.59
PA level	2.9 (2.1-9.2)	4.8 (2.8-10.7)	5.7 (2.9-9.9)	0.51
qMVC (kg)	45.8 ± 10.9	41.0 ± 15.4	37.7 ± 13.8	0.54
6MWD (% pred.)	109.0 ± 8.2	95.6 ± 13.5	99.4 ± 10.6	0.09
$V'O_{2SL}$ (% pred.)	111.9 ± 15.6	83.4 ± 15.8 **	84.3 ± 14.7 **	< 0.01
$V'O_{2VT}$ (% $V'O_{2max}$ pred.)	57.1 ± 8.7	51.6 ± 8.8	49.3 ± 6.2	0.22
Tlim (s)	599 ± 268	434 ± 207	484 ± 257	0.45

Data are presented as mean±SD or median (Q1-Q3). FEV1: forced expiratory volume in 1 s; VC: slow vital capacity; % pred.: % predicted; BMI: body mass index; FFMI: fat-free mass index; PA: physical activity; qMVC: quadriceps maximal voluntary contraction; 6MWD: 6-min walking distance; $V'O_{2SL}$: symptom-limited oxygen uptake; $V'O_{2VT}$: oxygen uptake at ventilatory threshold; Tlim: endurance time of quadriceps. Post-hoc test: *, **, ***: $p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.001$.

Functional adaptation in response to exercise training

Exercise training was performed at the first ventilatory threshold in seven SHS ($50.9 \pm 2.7\%V'O_{2SL}$; $13.4 \pm 2.7 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ of $V'O_2$). COPD-AI ($n=7$) were trained at the same absolute intensity as SHS ($66.1 \pm 9.8\%V'O_{2SL}$; $13.4 \pm 2.7 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ of $V'O_2$). COPD-RI ($n=7$) were trained at the same relative intensity as SHS ($50.9 \pm 2.7\%V'O_{2SL}$; $9.8 \pm 1.9 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ of $V'O_2$). Training intensity was significantly higher in COPD-AI than COPD-RI ($p=0.002$).

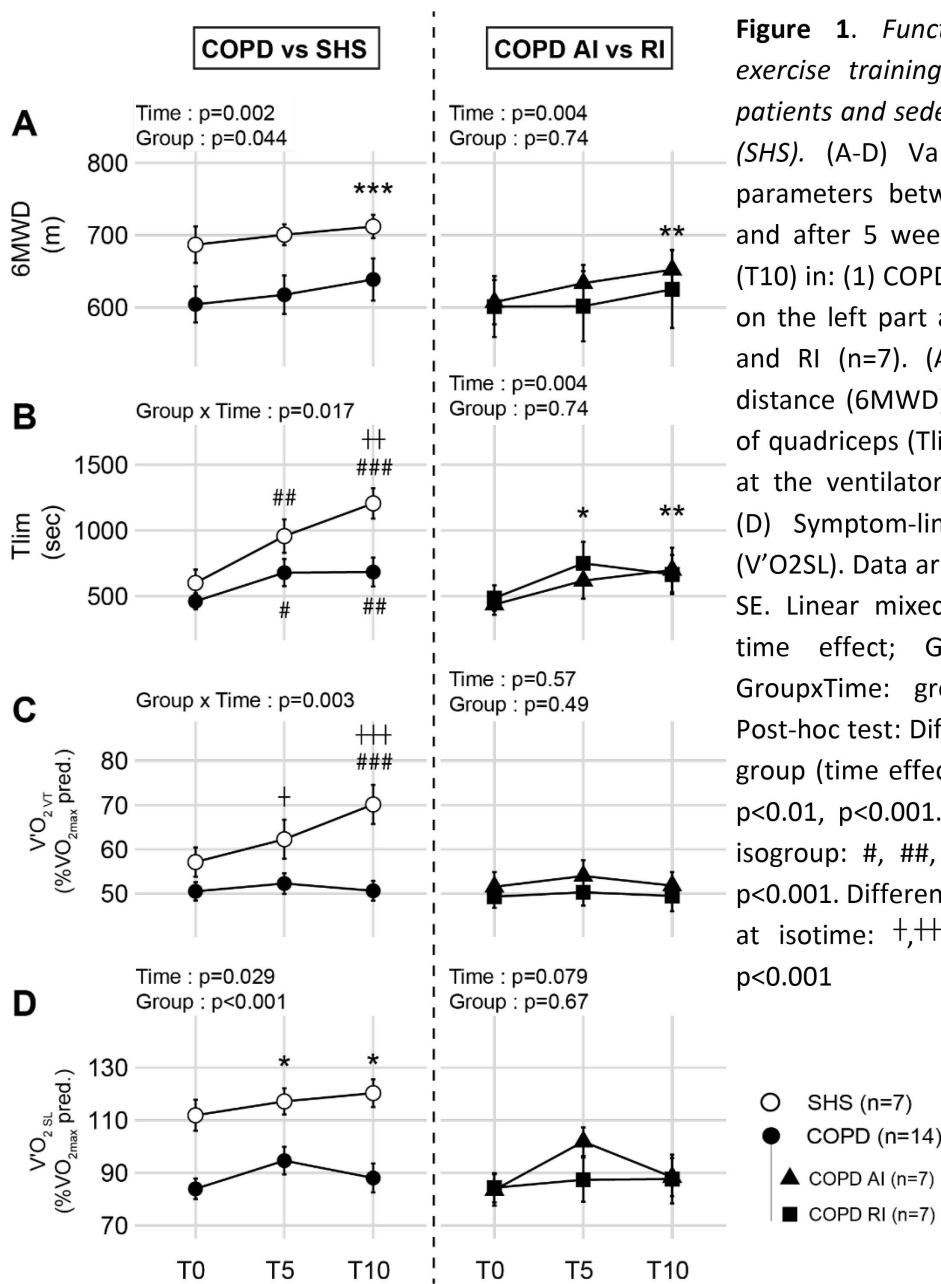


Figure 1. Functional adaptation to exercise training in COPD-AI and -RI patients and sedentary healthy subjects (SHS). (A-D) Variations in functional parameters between pre-training (T0) and after 5 weeks (T5) and 10 weeks (T10) in: (1) COPD ($n=14$) and SHS ($n=7$) on the left part and (2) COPD AI ($n=7$) and RI ($n=7$). (A) Six-minute walking distance (6MWD). (B) Endurance time of quadriceps (Tlim). (C) Oxygen uptake at the ventilatory threshold ($V'O_{2VT}$). (D) Symptom-limited oxygen uptake ($V'O_{2SL}$). Data are presented as mean \pm SE. Linear mixed effect model: Time: time effect; Group: group effect; GroupxTime: group/time interaction. Post-hoc test: Different from T0 in both group (time effect): *, **, ***: $p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.001$. Different from T0 in isogroup: #, ##, ###: $p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.001$. Different from the other group at isotime: †, ††, †††: $p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.001$

Functional improvements in response to 5 and 10 weeks of exercise training in the two patient groups and SHS are presented in Fig. 1. The six-minute walking distance (6MWD) and Tlim were significantly increased in both COPD and SHS after 5 and 10 weeks of exercise training (Fig. 1A & B) and were not different between the COPD AI and RI groups (Fig. 1A & B). The Tlim response to exercise training was lower in the COPD patients compared to SHS (GxT: $p=0.017$). Oxygen uptake at the ventilatory threshold ($V'O_{2VT}$) was increased only in SHS, with lower values in the COPD patients after 5 and 10 weeks of training (Fig. 1C). $V'O_{2SL}$ was lower in COPD patients compared to SHS (G: $p<0.001$; Fig. 1D) but increased under exercise training in both COPD and SHS (T: $p=0.029$) with no difference between the groups (GxT: $p=0.50$). Both $V'O_{2SL}$ and $V'O_{2VT}$ changes and values were similar between COPD AI and RI (Fig. 1C & D).

Skeletal muscle capillarization and pericyte coverage during training-related angiogenesis

The C/F ratio increased under exercise training in both the COPD and SHS groups after 10 weeks of training (T: $p<0.001$; Fig. 2A) with no difference between SHS and COPD (GxT: $p=0.81$) or COPD AI and RI (GxT: $p=0.82$). Double CD31/NG2 staining of *vastus lateralis* cryosections from the COPD patients and SHS at each time of training are presented in Fig. 2B. As shown in Fig. 2C, training induced a significantly different response of pericyte coverage in patients compared with SHS (GxT: $p=0.011$). We observed a significant increase in pericyte coverage in SHS ($+46.9\pm 64.2\%$, $p=0.013$) but not COPD patients ($+1.38\pm 57.4\%$, $p=0.26$) from the pre-training (T0) to post-training (T10) biopsies. This difference meant significantly lower pericyte coverage in the COPD patients than SHS at 5 and 10 weeks of exercise training ($p=0.004$ and $p<0.001$, respectively). This result did not differ between the COPD AI or RI groups (Fig. 2C). The proportion of α SMA+ pericytes increased over time in both groups (Suppl. Fig.1; Time effect: $p=0.002$), without difference between groups.

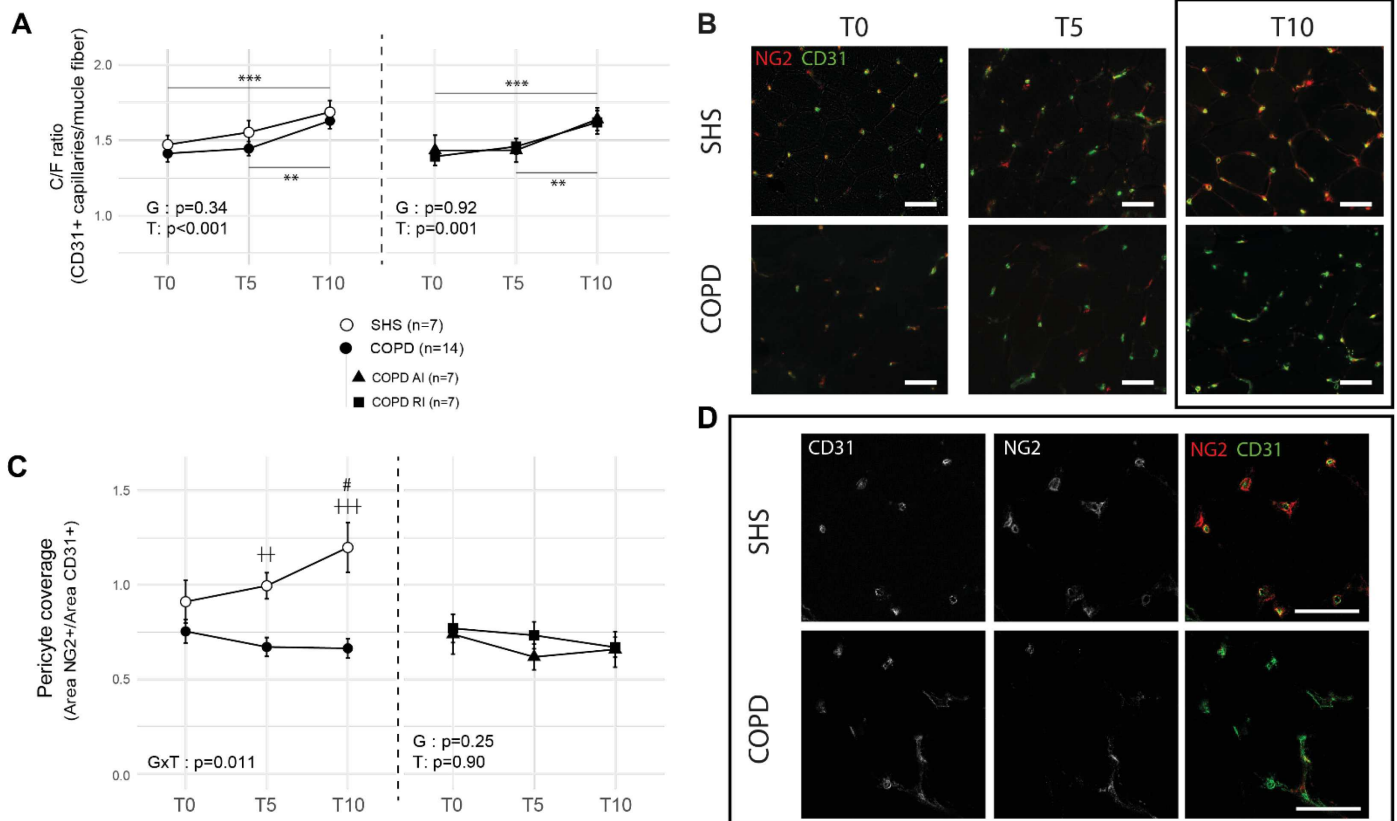


Figure 2. Capillary and pericyte coverage changes in COPD patients and sedentary healthy subjects (SHS) in response to exercise training. (A & C) Pre-training (T0) and 5-week (T5) and 10-week (T10) exercise training values of vastus lateralis skeletal muscle capillarization (A) and pericyte coverage (C) for both SHS and COPD AI and RI. (A) Capillary-to-fiber (C/F) ratio. (B) CD31/NG2 immunofluorescent double-staining images of vastus lateralis cryosection of COPD patients and SHS at baseline (T0) and after 5 weeks (T5) and 10 weeks (T10) of exercise training. (D) Post-training (T10) higher magnification and channels splitted micrographs for CD31/NG2 immunofluorescent double-staining. Data are presented as mean \pm SE. Post-hoc test: Different from T0 in both groups (time effect): *, **, ***: $p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.001$. Different from T0 in isogroup: #, ##, ###: $p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.001$. Different from the other group at isotime: †, ††, †††: $p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.001$. Scale bar: 50 μ m.

In vitro effect of serums on pericyte morphology and MSC differentiation

The effect of COPD and SHS serum on pericyte cytoskeleton morphology was assessed first (Fig. 3). COPD serum induced significantly greater pericyte elongation than SHS serum (Fig. 3A & B; $p<0.001$), without pericyte area alteration (Fig. 3C; $p=0.55$).

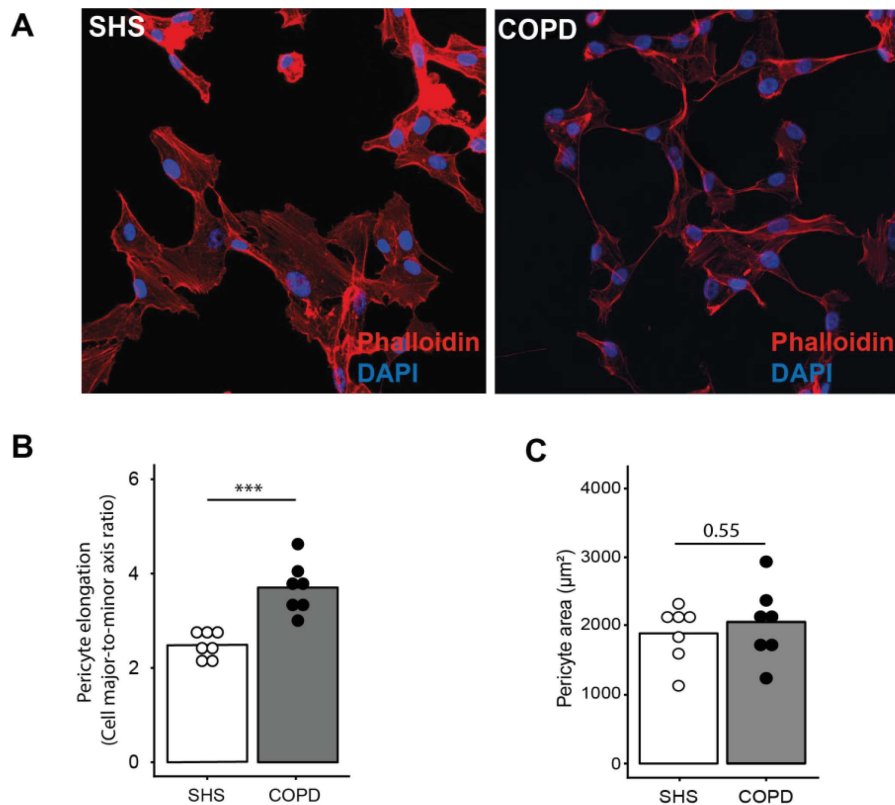


Figure 3. Effect of post-training serum from COPD patients and SHS on pericyte morphology. (A) Representative image of pericytes exposed to COPD patient or SHS serum. F-actin was stained with phalloidin and nucleus with DAPI. (B) Pericyte elongation and area (C) after exposure to 20% (v/v) serum from COPD patients or SHS post-training for 15 hr. Data are presented as means and individual points. Linear mixed effect model: *** $p < 0.001$.

We and others have demonstrated that MSCs can differentiate into pericytes in contact with ECFCs *in vitro* and *in vivo*³³. We tested the *in vitro* effect of COPD and SHS serum on ECFC/MSC co-cultures. The co-cultures were exposed to human serum for 1 week, and fetal calf serum (FCS) was used as positive control. In the co-cultures exposed to both FCS and SHS serum, we observed a broad expression of calponin, a valid marker of pericytes³⁴, in MSCs after 1 week (Suppl. Fig. 2; Fig. 4A, first line). Conversely, calponin expression in MSCs was significantly reduced in the COPD serum compared with SHS serum after 1 week of co-culture ($p < 0.001$; Fig. 4B). The positive stain for von Willebrand factor on the ECFCs in co-cultures treated with COPD serum confirmed that this result was not due to the loss of ECFCs but was serum-dependent (Fig. 4A). We found a significant positive correlation between calponin expression

in MSCs and the pericyte coverage of muscle capillaries in the subjects from whom the serum originated ($r=0.74$, $p=0.003$; Fig. 4C).

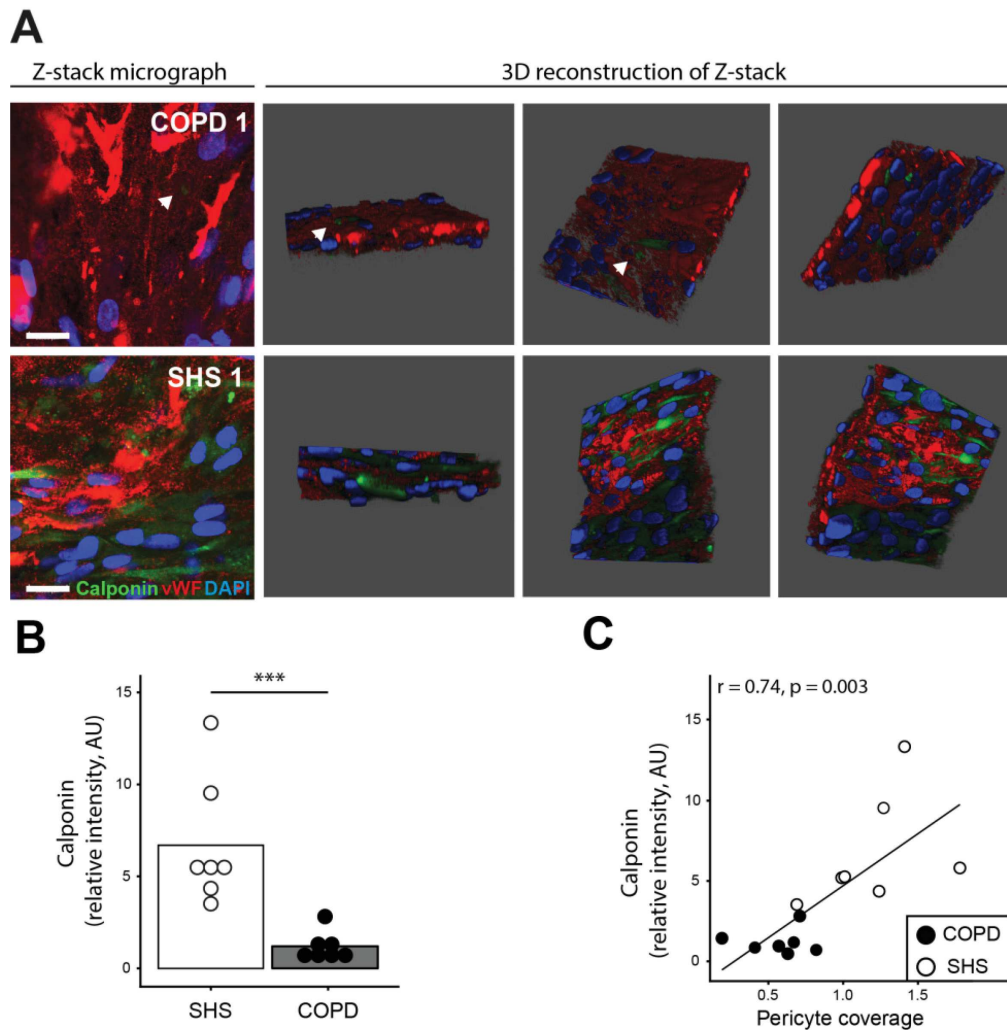


Figure 4. Calponin expression in MSCs from MSC/ECFC co-culture exposed to post-training serum from COPD patients and SHS. (A) Representative image of MSC/ECFC co-culture exposed to COPD or SHS serum. (B) Quantification of calponin fluorescence intensity in co-culture images after exposure to 20% (v/v) COPD or SHS post-training serum for 5 days. (C) Relation between in vitro calponin fluorescence intensity in response to post-training serum and in vivo post-training pericyte coverage of skeletal muscle capillaries. Data are presented as mean and individual points. Linear mixed effect model: *** $p < 0.001$.

Discussion

In a context of altered improvements in muscle endurance and $\dot{V}O_{2SL}$, we observed that the pericyte coverage of muscle capillaries was blunted in the COPD patients. This pericyte defect

occurred regardless of training intensity or duration and may have been consecutive to the deleterious effects of COPD circulating factors.

After 10 weeks of exercise training, both COPD patients and SHS showed improved functional capacities, with significantly increased 6MWD, Tlim and $V'O_{2SL}$ (Fig. 1). The training response of $V'O_{2SL}$ did not differ between the COPD patients and SHS but this may have resulted from a ceiling effect in our SHS (with a baseline $V'O_{2SL}>100\%$ pred. and a $V'O_{2SL}$ gain less than in the previous study⁶). Indeed, even after 10 weeks of training at the same absolute intensity as SHS, the COPD patients failed to display benefits in the local endurance capacity of muscle (Tlim) equal to those in SHS (Fig. 1B). Endurance is determined by both diffusive and convective O_2 transport³⁶. Similarly, submaximal $V'O_{2VT}$ improved less in the COPD patients than in SHS (Fig. 1C). Compared to $V'O_{2SL}$, $V'O_{2VT}$ is more closely related to the muscle oxygen uptake capacities³⁷. Lower responses to training were observed in both the COPD IA and RI groups and at both T5 and T10, suggesting that the increase in training intensity (from 51% to 66% of $V'O_{2SL}$) or duration (from 5 to 10 weeks) did not restore a physiologic response in the patients. The randomized, controlled double-blind design to assign the COPD patients to exercise intensity groups (AI or RI) increased the validity of these results. Thus, the blunted functional response to exercise training in the COPD patients may be more related to an intrinsic muscle impairment than to an inappropriate training modality.

In previous studies, the impaired functional adaptations to exercise training in COPD patients were associated with blunted capillary creation⁶. Conversely to this finding, we observed no blunted creation of new vessels in these patients compared with SHS, possibly because the patients in the present study differed in disease severity from those of the earlier study ($FEV_1: 75\pm 19$ vs $45.6\pm 17.5\%$ pred.)⁶. Hypoxemia might explain this result, as Costes et al.³⁸ reported an increase in the C/F ratio in response to exercise training only in non-hypoxemic patients. Given that none of our COPD patients presented $SpO_2<92\%$ at rest (whereas 50% of the patients in the previous study⁶ had $SpO_2<92\%$ at rest), it may be that capillary creation is preserved in less severe and normoxic COPD patients. This preserved capillary creation is not discrepant with impaired pericyte coverage. Indeed, capillary regression was shown to occur later than pericyte loss during disease progression¹². Thus, in our mild-to-moderate COPD patients, the impaired pericyte coverage might have been associated with preserved

capillarization, whereas impaired capillary creation and coverage would have occurred in more severe patients.

To assess the pericyte coverage of skeletal muscle capillaries from muscle samples, most studies have used NG2/CD31 double-staining on transversal sections of muscle and calculated the ratio for the two areas of staining^{12,28-31}. Using this methodology, we found that exercise training increased the pericyte coverage after 10 weeks in the SHS group but not in the COPD patients (Fig. 2B & C). The increase that we found in SHS was consistent with the study of Baum *et al.*¹⁷, which showed an increase in pericyte coverage of skeletal muscle capillaries after 8 weeks of exercise training in healthy humans. Conversely, Egginton *et al.*³⁹ found reduced pericyte coverage of muscle capillaries after muscle stimulation. However, this study was conducted only through electrical stimulation in mice, which does not fully represent exercise training, and for only 3 to 7 days. The angiogenic process was found to begin with a destabilization phase with pericyte detachment, followed by a maturation phase with pericyte recruitment⁴⁰. The first phase occurred during the first weeks of training, and the second appeared later, at around 4 to 6 weeks⁴¹. Thus, we expected an increase in pericyte coverage in our subjects, as the study of Baum *et al.*¹⁷ used actual exercise training in humans with a timing that was closer to ours. The finding that pericyte coverage failed to increase in our COPD patients thus appears to be a novel pathological feature of the misadaptation to training in their skeletal muscle circulation and may have clinical repercussions.

During pro-angiogenic interventions, an increase in pericyte coverage together with an increased number of skeletal muscle capillaries have been associated with a greater increase in muscle perfusion¹³⁻¹⁶, which is a major determinant of oxygen uptake capacity⁴². The convective supply of O₂ is determinant in muscle V'O₂ and depends in part on blood flow regulation at the capillary level⁷. Evidence is accumulating that pericyte coverage is involved in the regulation of local capillary blood flow^{8,43}, especially in skeletal muscle⁹⁻¹¹. This vasoactive role is mainly dependent on α SMA expression⁴⁴ and we consistently found a high proportion of pericytes that were α SMA+ in both the COPD patients and SHS (Suppl. Fig. 2). Interestingly, the proportion of α SMA+/ α SMA- was preserved in the COPD patients, suggesting that the pericyte loss in these patients affected both contractile and non-contractile pericytes (Suppl. Fig. 2). Although we found that the adaptations in capillary

number was not impaired in our COPD patients (Fig. 2A), we hypothesize that the blunted pericyte coverage in capillaries has a role in the defective adaptation of muscle endurance and submaximal $\dot{V}O_2$ in these patients. Future studies with local muscle blood flow assessment and/or pericyte loss in animal models during training-induced angiogenesis will address this hypothesis of a causal relationship between pericyte coverage and muscle convective O_2 supply.

A body of evidence now points to the deleterious effect of COPD on pericytes. Indeed, pericyte debris has been found in the endoneural capillaries of COPD patients²⁰. Moreover, pericytes are major actors in vascular impermeability⁴⁵, and microalbuminuria and cerebral microbleeds have been found in these patients^{21,46}. Last, during training-induced angiogenesis, we found ultrastructural evidence of disturbed endothelium/pericyte interactions in COPD patients in an earlier study¹⁹, as well as a smaller increase in pericyte coverage in the present study (Fig. 2C). On the other hand, we observed a pro-atrophic effect of COPD patient serum in human myotubes *in vitro*²³, which argues for a role of the COPD circulating microenvironment in muscle impairment. Nevertheless, the current study is the first to provide experimental evidence of a direct effect of COPD serum on pericytes, suggesting a systemic effect of deleterious circulating factors, possibly consecutive of inflammation. Indeed, lipopolysaccharides injection, a trigger of systemic inflammation, is known to induce pericyte loss⁴⁷, and basal levels of inflammation are increased in COPD patient serum²². In the present study, isolating the culprit(s) would have required wide cytokine screening plus other experiments (testing cytokine agonists/antagonists on pericytes) necessitating a large quantity of serum that we unfortunately did not have access to. Thus, addressing this question will require a specifically designed study. We did, however, focus on the mechanisms that might explain the lack of pericyte coverage, such as the migration of pericytes away from capillaries, which would lead to pericyte loss⁴⁸. We tested the hypothesis that circulatory factors of COPD can induce pericyte elongation, which is known to be associated with pericyte migration in the pericyte loss process^{48,49}. We observed that, compared to post-training SHS serum, post-training COPD serum induced greater pericyte elongation (Fig. 4), which was assessed by shape description based on phalloidin staining, as previously described^{32,49}. We then tested whether the effect of COPD serum would also disturb the *de novo* recruitment of

pericytes during the angiogenic process. This recruitment is dependent on MSC differentiation into pericytes^{50,51}, which requires endothelial/MSc heterotypic cell contacts⁵². MSC differentiation into pericytes is usually tested by assessing the calponin expression in the MSCs of MSC/endothelial cells or endothelial colony-forming cell co-cultures^{33,53}, and we found that it was dramatically reduced in the COPD serum condition (Fig. 3B). With these experiments, we provide evidence of the deleterious effect of COPD circulating factors on pericyte morphology and differentiation. Nevertheless, the COPD mechanisms suggested by our *in vitro* analysis should be verified *in vivo* in future studies during training-induced angiogenesis. As a perspective for future research, the involvement of inflammation-dependent impairment in Cx43-dependent gap junctions and/or Notch3/Jagged-1 interactions might be investigated, as previously shown^{47,52,54,55}. This mechanistic exploration must be associated with inflammatory cytokine screening to identify future therapeutic targets that would prevent pericyte impairment in COPD patients.

Conclusion

In response to exercise training, COPD patients showed blunted muscle endurance and $V'O_2$ improvements compared with age- and sex-matched SHS. Moreover, despite preserved capillary creation, the COPD patients showed an impaired increase in pericyte coverage. These impairments constitute an early event in the disease time course. This study also presents the first evidence of a causal deleterious effect of COPD on pericytes through serum circulating factors. We hypothesize that a misadaptation of pericyte coverage potentially impacts the muscle oxygen supply, which along with circulating therapeutic targets, should be considered as a clinically relevant issue to be specifically addressed in future studies.

References

- 1 Maltais F, Decramer M, Casaburi R et al. An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: update on limb muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2014;189(9):e15-62.
- 2 Broxterman RM, Hoff J, Wagner PD, Richardson RS. Determinants of the diminished exercise capacity in patients with chronic obstructive pulmonary disease: looking beyond the lungs. *J Physiol.* 2020;598(3):599–610.
- 3 Poole DC, Copp SW, Hirai DM, Musch TI. Dynamics of muscle microcirculatory and blood-myocyte O₂ flux during contractions: Dynamics of muscle microcirculatory O₂ flux. *Acta Physiol.* 2011;202(3):293–310.

- 4 Vogiatzis I, Terzis G, Nanas S et al. Skeletal Muscle Adaptations to Interval Training in Patients With Advanced COPD. *Chest*. 2005;128(6):3838–3845.
- 5 Richardson RS, Leek BT, Gavin TP et al. Reduced Mechanical Efficiency in Chronic Obstructive Pulmonary Disease but Normal Peak $\dot{V}O_2$ with Small Muscle Mass Exercise. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;169(1):89–96.
- 6 Gouzi F, Préfaut C, Abdellaoui A et al. Blunted muscle angiogenic training-response in COPD patients versus sedentary controls. *Eur Respir J*. 2013;41(4):806–814.
- 7 Schmid F, Reichold J, Weber B, Jenny P. The impact of capillary dilation on the distribution of red blood cells in artificial networks. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol*. 2015;308(7):H733–H742.
- 8 Hall CN, Reynell C, Gesslein B et al. Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease. *Nature*. 2014;508(7494):55–60.
- 9 Špiranec K, Chen W, Werner F et al. Endothelial C-Type Natriuretic Peptide Acts on Pericytes to Regulate Microcirculatory Flow and Blood Pressure. *Circulation*. 2018;138(5):494–508.
- 10 Heinze C, Seniuk A, Sokolov MV et al. Disruption of vascular Ca^{2+} -activated chloride currents lowers blood pressure. *J Clin Invest*. 2014;124(2):675–686.
- 11 Methner C, Mishra A, Golgotiu K et al. Pericyte constriction underlies capillary derecruitment during hyperemia in the setting of arterial stenosis. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol*. 2019;317(2):H255–H263.
- 12 Caporali A, Meloni M, Nailor A et al. p75NTR-dependent activation of NF- κ B regulates microRNA-503 transcription and pericyte–endothelial crosstalk in diabetes after limb ischaemia. *Nat Commun*. 2015;6(1):8024.
- 13 Chen F, Liu Q, Zhang ZD, Zhu XH. Co-Delivery of G-CSF and EPO Released From Fibrin Gel for Therapeutic Neovascularization in Rat Hindlimb Ischemia Model. *Microcirculation*. 2013;20(5):416–424.
- 14 Chen L, Wang L, Li Y et al. Transplantation of Normal Adipose Tissue Improves Blood Flow and Reduces Inflammation in High Fat Fed Mice With Hindlimb Ischemia. *Front Physiol*. 2018;9:197.
- 15 Liu X, Terry T, Pan S et al. Targeted Delivery of Carbaprostacyclin to Ischemic Hindlimbs Enhances Adaptive Remodeling of the Microvascular Network. *Hypertension*. 2013;61(5):1036–1043.
- 16 Qin D, Trenkwalder T, Lee S et al. Early Vessel Destabilization Mediated by Angiopoietin-2 and Subsequent Vessel Maturation via Angiopoietin-1 Induce Functional Neovasculature after Ischemia. *PLoS ONE*. 2013;8(4):e61831.
- 17 Baum O, Gübeli J, Frese S et al. Angiogenesis-related ultrastructural changes to capillaries in human skeletal muscle in response to endurance exercise. *J Appl Physiol*. 2015;119(10):1118–1126.
- 18 Iepsen UW, Munch GDW, Rugbjerg M et al. Effect of endurance versus resistance training on quadriceps muscle dysfunction in COPD: a pilot study. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2016;Volume 11:2659–2669.
- 19 Blervaque L, Passerieux E, Pomiès P et al. Impaired training-induced angiogenesis process with loss of pericyte-endothelium interactions is associated with an abnormal capillary remodelling in the skeletal muscle of COPD patients. *Respir Res*. 2019;20(1):278.
- 20 Stoebner P, Mezin P, Vila A, Grosse R, Kopp N, Paramelle B. Microangiopathy of endoneurial vessels in hypoxemic chronic obstructive pulmonary disease (COPD): A quantitative ultrastructural study. *Acta Neuropathol (Berl)*. 1989;78(4):388–395.
- 21 Lahousse L, Tiemeier H, Ikram MA, Brusselle GG. Chronic obstructive pulmonary disease and cerebrovascular disease: A comprehensive review. *Respir Med*. 2015;109(11):1371–1380.
- 22 Pinto-Plata V, Casanova C, Müllerova H et al. Inflammatory and repair serum biomarker pattern. Association to clinical outcomes in COPD. *Respir Res*. 2012;13(1):71.
- 23 Catteau M, Gouzi F, Blervaque L et al. Effects of a human microenvironment on the differentiation of human myoblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 2020;525(4):968–973.

- 24 Vogelmeier CF, Criner GJ, Martinez FJ et al. Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Lung Disease 2017 Report. GOLD Executive Summary. *Am J Respir Crit Care Med*. 2017;195(5):557–582.
- 25 Spruit MA, Singh SJ, Garvey C et al. An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: key concepts and advances in pulmonary rehabilitation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;188(8):e13–64.
- 26 ATS/ACCP Statement. ATS/ACCP Statement on Cardiopulmonary Exercise Testing. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;167(2):211–277.
- 27 ATS Statement. ATS statement: guidelines for the six-minute walk test. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;166(1):111–117.
- 28 Gianni-Barrera R, Butschkau A, Uccelli A et al. PDGF-BB regulates splitting angiogenesis in skeletal muscle by limiting VEGF-induced endothelial proliferation. *Angiogenesis*. 2018;21(4):883–900.
- 29 Fukada K, Kajiya K. Age-related structural alterations of skeletal muscles and associated capillaries. *Angiogenesis*. 2020. doi:10.1007/s10456-020-09705-1.
- 30 Vono R, Fuoco C, Testa S et al. Activation of the Pro-Oxidant PKC β II-p66Shc Signaling Pathway Contributes to Pericyte Dysfunction in Skeletal Muscles of Patients With Diabetes With Critical Limb Ischemia. *Diabetes*. 2016;65(12):3691–3704.
- 31 Chintalgattu V, Rees ML, Culver JC et al. Coronary Microvascular Pericytes Are the Cellular Target of Sunitinib Malate-Induced Cardiotoxicity. *Sci Transl Med*. 2013;5(187):187ra69–187ra69.
- 32 Klement W, Garbelli R, Zub E et al. Seizure progression and inflammatory mediators promote pericytosis and pericyte-microglia clustering at the cerebrovasculature. *Neurobiol Dis*. 2018;113:70–81.
- 33 Rossi E, Goyard C, Cras A et al. Co-injection of mesenchymal stem cells with endothelial progenitor cells accelerates muscle recovery in hind limb ischemia through an endoglin-dependent mechanism. *Thromb Haemost*. 2017;117(10):1908–1918.
- 34 Boscolo E, Stewart CL, Greenberger S et al. JAGGED1 Signaling Regulates Hemangioma Stem Cell-to-Pericyte/Vascular Smooth Muscle Cell Differentiation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31(10):2181–2192.
- 35 Pinheiro J, Bates D, DebRoy S, Sarkar D. R Core Team (2014) nlme: linear and nonlinear mixed effects models. R package version 3.1-117. Available [H TtpCRAN R-Proj Orgpackage Nlme](https://cran.r-project.org/package=nlme). 2014.
- 36 Esposito F, Mathieu-Costello O, Shabetai R, Wagner PD, Richardson RS. Limited Maximal Exercise Capacity in Patients With Chronic Heart Failure. *J Am Coll Cardiol*. 2010;55(18):1945–1954.
- 37 Ivy JL, Withers RT, Van Handel PJ, Elger DH, Costill DL. Muscle respiratory capacity and fiber type as determinants of the lactate threshold. *J Appl Physiol*. 1980;48(3):523–527.
- 38 Costes F, Gosker H, Feasson L et al. Impaired exercise training-induced muscle fiber hypertrophy and Akt/mTOR pathway activation in hypoxemic patients with COPD. *J Appl Physiol*. 2015;118(8):1040–1049.
- 39 Egginton S, Hudlicka O, Brown MD, Graciotti L, Granata AL. In Vivo Pericyte-Endothelial Cell Interaction during Angiogenesis in Adult Cardiac and Skeletal Muscle. *Microvasc Res*. 1996;51(2):213–228.
- 40 Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*. 2011;473(7347):298–307.
- 41 Haas TL, Nwadozi E. Regulation of skeletal muscle capillary growth in exercise and disease. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2015;40(12):1221–1232.
- 42 Poole DC, Richardson RS. Determinants of Oxygen Uptake: Implications for Exercise Testing. *Sports Med*. 1997;24(5):308–320.

- 43 Kisler K, Nelson AR, Rege SV et al. Pericyte degeneration leads to neurovascular uncoupling and limits oxygen supply to brain. *Nat Neurosci*. 2017;20(3):406–416.
- 44 Alarcon-Martinez L, Yilmaz-Ozcan S, Yemisci M et al. Capillary pericytes express α -smooth muscle actin, which requires prevention of filamentous-actin depolymerization for detection. *eLife*. 2018;7:e34861.
- 45 Hellström M, Gerhardt H, Kalén M et al. Lack of Pericytes Leads to Endothelial Hyperplasia and Abnormal Vascular Morphogenesis. *J Cell Biol*. 2001;153(3):543–554.
- 46 Casanova C, de Torres JP, Navarro J et al. Microalbuminuria and hypoxemia in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;182(8):1004–1010.
- 47 Fernandez-Cobo M, Gingalewski C, Drujan D, De Maio A. DOWNREGULATION OF CONNEXIN 43 GENE EXPRESSION IN RAT HEART DURING INFLAMMATION. THE ROLE OF TUMOUR NECROSIS FACTOR. *Cytokine*. 1999;11(3):216–224.
- 48 Pfister F, Feng Y, vom Hagen F et al. Pericyte Migration: A Novel Mechanism of Pericyte Loss in Experimental Diabetic Retinopathy. *Diabetes*. 2008;57(9):2495–2502.
- 49 Persidsky Y, Hill J, Zhang M et al. Dysfunction of brain pericytes in chronic neuroinflammation. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2016;36(4):794–807.
- 50 Dhar K, Dhar G, Majumder M et al. Tumor cell-derived PDGF-B potentiates mouse mesenchymal stem cells-pericytes transition and recruitment through an interaction with NRP-1. *Mol Cancer*. 2010;9(1):209.
- 51 Hirschi Karen K., Rohovsky Stephanie A., Beck Laurence H., Smith Sandra R., D'Amore Patricia A. Endothelial Cells Modulate the Proliferation of Mural Cell Precursors via Platelet-Derived Growth Factor-BB and Heterotypic Cell Contact. *Circ Res*. 1999;84(3):298–305.
- 52 Hirschi KK, Burt JM, Hirschi KD, Dai C. Gap Junction Communication Mediates Transforming Growth Factor- β Activation and Endothelial-Induced Mural Cell Differentiation. *Circ Res*. 2003;93(5):429–437.
- 53 Rossi E, Smadja DM, Boscolo E et al. Endoglin regulates mural cell adhesion in the circulatory system. *Cell Mol Life Sci*. 2016;73(8):1715–1739.
- 54 Sato T, Haimovici R, Kao R, Li A-F, Roy S. Downregulation of Connexin 43 Expression by High Glucose Reduces Gap Junction Activity in Microvascular Endothelial Cells. *Diabetes*. 2002;51(5):1565–1571.
- 55 Kofler NM, Cuervo H, Uh MK, Murtomäki A, Kitajewski J. Combined deficiency of Notch1 and Notch3 causes pericyte dysfunction, models CADASIL, and results in arteriovenous malformations. *Sci Rep*. 2015;5:16449.

Fichier additionnel

Supplementary materials et methods

Population

Between December 2013 and May 2015, 14 COPD subjects and 7 SHS between 40 and 78 years old were included and informed consent was obtained from all of them (Committee for the Protection of Persons No. CPP 2013-A01199-36). The study protocol agreed with the Helsinki Declaration and the European guidelines for good clinical practice and was registered on clinicaltrials.gov (NCT02040363). COPD patients were expected to have GOLD-confirmed disease(1): association of dyspnea, chronic cough or sputum and/or chronic history of exposure to the factors risk of disease, and a post-bronchodilation ($FEV_1/FVC < 70\%$), symptomatic GOLD I to IV, at least 4 weeks apart from an exacerbation episode. Control subjects were matched for age (± 3 years) and sex. They had to be free from pathology after a medical examination, practice less than 150 min/week of moderate to vigorous physical activity (Voorrips questionnaire score < 9.4), and to have never smoked or not for at least 10 years, with fewer than 10 pack-years.

Exercise training protocol

After several clinical and functional evaluations and a muscle biopsy, the COPD patients and the control subjects performed 10 weeks (36 sessions) of exercise training. The evaluations were repeated after 5 weeks (22 sessions) and 10 weeks (14 more sessions) of exercise training. The training took place in the cardiac reeducation unit of CHU Arnaud de Villeneuve (34090 Montpellier). The subjects had to perform 3 sessions per week, consisting of 45 minutes of aerobic exercise on a cycloergometer. For the healthy control subjects, the work intensity corresponded to the first ventilatory threshold (2), determined by the mean of the cardiopulmonary exercise test (CPET) by 2 physiologists, independently and blindly. COPD patients were randomized into the absolute intensity (AI) or relative intensity (RI) groups: for the AI group at the same VO_2 in $ml \cdot min^{-1} \cdot kg^{-1}$ as matched SHS and for the RI group at the same VO_2 in percentage of the actual VO_{2si} . For healthy subjects and COPD patients, the heart rate

corresponding to the targeted VO_2 was identified in the CPET and allowed training intensity to be monitored during the training sessions. Muscle strengthening exercises completed these sessions, in accordance with ATS recommendations (3). Outdoor walking and balneotherapy sessions completed the exercise training program for a total of 36 sessions. The training was conducted by adapted physical activity (APA) teachers who had to ensure the gradual increase of working power in order to maintain a constant target heart rate during the program.

Functional evaluation

The exploration of resting lung function was assessed in all subjects using a plethysmographic spirometer (Medisoft Bodybox 5500, Belgium). Body composition indices were determined using a segmental multifrequency bioelectronic impedancemeter.

The CPET was conducted using a cyclo-ergometer (Ergometrics 900, Ergo-line, Germany), according to international standards(4). A 3-minute warm-up was performed at 20% of the estimated maximum aerobic power (MAP), followed by incremental steps of 1 minute each (increment: 10% of the remaining load). The VO_{2SL} was calculated as the mean of the VO_2 values during the last 20 s of the test. During the exercise, heart rate (electrocardiogram), arterial saturation in O_2 (pulse oximeter), gas exchange (cycle-to-cycle measurement) and dyspnea (every minute with a visual analogue scale) were recorded. A medical doctor was present throughout the CPET and controlled its progress.

6-minutes walking test (6MWT) was performed according to the ATS guidelines(5) in a 30-meter indoor corridor and repeated at 30-minute intervals to overcome a learning effect. The subjects were previously informed of the instructions. No encouragement was provided and only the remaining time was communicated neutrally to the subject. Dyspnea (EVA scale) and blood pressure were assessed before and after the test. Heart rate and O_2 arterial saturation (SpO_2) values were recorded every minute.

The quadriceps maximum voluntary contraction (qMVC) was assessed by means of a maximum isometric contraction. This test was performed on an evaluation bench. Standardized encouragement was given during the 3 contractions, each lasting about 4 seconds with 1 minute of rest between them. A contraction was retained if the force plateaued for at least 1 second. The best of the 3 contractions was kept as the maximum

voluntary strength value if the 3 conditions were reproducible (if 2 more contractions could not be achieved). The values recorded in Newton-meters were converted to kilograms.

The evaluation of quadriceps endurance systematically followed the measurement of maximum voluntary force on the leg presenting the highest values of qMVC. A load corresponding to 30% of the qMVC was attached to the arm of the same evaluation bench, unlocked to be mobile. The subjects had to perform knee extension cycles of 10 beats, 1 second each (3 rise times, 3 down times, 4 rest times), synchronized with a metronome (at 60 bpm), continuously until exhaustion(6). Exhaustion was assumed when the subject could no longer hold the contraction for 1 second, or blatantly compensated with other muscle groups for 3 consecutive cycles, despite standardized encouragement. The exercise time was then recorded and used as limit time for muscular endurance (Tlim).

Muscle biopsy

The muscle sample was taken from the vastus lateralis (junction of the middle-lower third of the thigh) of the leg that did not perform the muscle endurance evaluation, after local anesthesia of the dermis (2 mL, 2% Lidocaine). After incision, approximately 300 mg of tissue was taken with a Bergström needle, packed in subsample and frozen with isopentane cooled in liquid nitrogen. The samples were then stored at -80°C until further analysis. The biopsies (at 0, 5 and 10 weeks of training) were performed on the same leg, 1 cm from the other.

Muscle immunofluorescence

Cryosection sections of muscle samples (14 µm thick) were performed for all subjects, for the 3 training times. Then, single or double immunofluorescent staining was performed on 3 series of cryosections.

The first series was stained to visualize capillaries, using anti-CD31 antibodies (# 550389; BD Biosciences) and muscle fiber with white light. This allowed us to calculate the capillary-to-fiber ratio (C/F), as previously described(6), on a 150 fiber-area. In the second series, capillaries and pericytes were visualized using anti-CD31 and anti-NG2 antibodies (# ab83178, Abcam). Pericyte coverage was calculated as the ratio of the NG2positive area to CD31positive area. The both areas were obtained with a semi-quantitative process after individual thresholding.

The intra- and inter-operator reproducibility as well as external validity of this technic were controlled before analysis. This ratio was established for each analysis point on an average of 108 ± 21 capillaries, on 3 zones per section. The third series was labeled with anti-NG2 and anti- α SMA antibodies (# ab7817, ABcam). The proportion of pericytes expressing α SMA was calculated as the ratio of the number of pericytes α SMApositive/NG2positive to the total of pericytes NG2positive. This number was established using semi-automatic analysis with individual thresholding and masking process to obtain α SMA in each individual pericyte. This ratio was established on an average of 175 ± 31 pericytes for each analysis point, on 3 zones per section. All analyses were performed using the ImageJ software, under blinded condition.

Pericyte culture and morphologic analysis

Human brain vascular pericytes (ScienCell Research Laboratories, Inc.) were cultivated for 24 hr in Pericyte Medium PM (ScienCell Research Laboratories, Inc), supplemented with 2% FBS, 1% of Pericyte Growth Supplement and 1% of penicillin/streptomycin solution, in a poly-L-lysine coated dish. Then, 20% (v/v) of SHS or COPD serum was added for 15 hr. Fresh medium was added for 24h and cells were then fixed with 3.2% PFA for 10 min and permeabilized with 0.1% Triton X100 for 5 min at room temperature and incubated with Phalloidin (ab176756, ABcam) and DAPI for 1 hour 15 min at room temperature. The cell area and the minor-to-major axis ratio were determined with the Shape Descriptors ImageJ plug-in under blinded conditions on 40 pericytes/subject, from at least 10 randomly chosen fields.

ECFC/MSC co-culture

Endothelial colony-forming cells (ECFCs) and mesenchymal stem cells (MSCs) were isolated, as previously described(11). Culture chamber slides (8-well, duplicates) were coated with gelatin 0.2% and seeded with ECFCs + MSCs at a 1:1 ratio with EGM2 medium 10% FSC, or SHS serum or COPD serum from day 0 to day 7. Post-training serum from 7 COPD patients (3 from IA group and 4 from IR group) and 7 SHS was tested. The medium was changed every 2 days. After co-culture for 1 week, the MSCs differentiated into perivascular cells (11). Once differentiated, the cells were fixed with PFA% for 10 min at RT. For ECFC immunostaining, samples were incubated with 1%TRITON/PBS for 5 min and then with the primary antibody

mouse anti-human von Willebrand factor (1:500, Dako) for 1 hr at room temperature, followed by the secondary antibody Texas Red anti-mouse IgG (1:200, Vector) for 1 hr at RT. Differentiated MSCs were incubated with primary antibody rabbit anti-human calponin (1:100, Abcam)(12). After washing, samples were incubated with the appropriate FITC-labeled secondary antibody (1:200, Vector), and nuclei were counterstained with DAPI mounting medium (Vectashield, VECTOR). Images were taken with a Leica SP-5 confocal microscope. Fluorescence density was analyzed with ImageJ software. At least 5 randomly chosen fields per condition were analyzed.

Statistical analysis

Characteristics of both COPD patient groups and SHS at baseline were compared by one-way analysis of variance or the Kruskal-Wallis test, depending on the normality of the data. The study design included 3 groups of subjects evaluated longitudinally 3 times. Thus, to analyze the data we used a linear mixed effect (LME) model with Group effect (G), Time effect (T) and the interaction between these factors (GxT) as fixed effects. We also added the Subject effect as a random effect to take into account the dependency of the longitudinal data(13). The lme function from the nlme R package was used to fit the LME (14). When GxT was significant, we used a Fisher's LSD post-hoc test to complete the analysis. For each LME test, the assumption of the normality of the residual was checked with the Q-Q plot approach(15). The sample size calculation was made expecting a two times lower improvement of C/F ratio in COPD patients compared to SHS (16% versus 32%), as found in our previous study (6). There was no previous data on pericyte coverage in COPD patients but we expected the same impairment than the C/F ratio. Given the design of our study, a power of 0.8, an alpha risk of 5% and a standard deviation of 40, the minimum sample size was 5 subjects in each group. To take into account potential missing values we decided to include 7 subjects per group. Data were analyzed with R 3.5.0 software (www.r-project.org) and plotted with GraphPad Prism 5 (GraphPad Software). A p-value <0.05 was considered significant.

Reference

1. Vogelmeier CF, Criner GJ, Martinez FJ, Anzueto A, Barnes PJ, Bourbeau J, Celli BR, Chen R, Decramer M, Fabbri LM, Frith P, Halpin DMG, López Varela MV, Nishimura M, Roche N, Rodriguez-Roisin R, Sin DD, Singh D, Stockley R, Vestbo J, Wedzicha JA, Agustí A. Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Lung Disease 2017 Report. GOLD Executive Summary. *Am J Respir Crit Care Med* 2017;195:557–582.
2. Vallet G, Ahmaïdi S, Serres I, Fabre C, Bourgoïn D, Desplan J, Varray A, Préfaut Ch. Comparison of two training programmes in chronic airway limitation patients: standardized <l>versus</l> individualized protocols. *Eur Respir J* 1997;10:114–122.
3. Spruit MA, Singh SJ, Garvey C, ZuWallack R, Nici L, Rochester C, Hill K, Holland AE, Lareau SC, Man WD-C, Pitta F, Sewell L, Raskin J, Bourbeau J, Crouch R, Franssen FME, Casaburi R, Vercoulen JH, Vogiatzis I, Gosselink R, Clini EM, Effing TW, Maltais F, van der Palen J, Troosters T, Janssen DJA, Collins E, Garcia-Aymerich J, Brooks D, et al. An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: key concepts and advances in pulmonary rehabilitation. *Am J Respir Crit Care Med* 2013;188:e13-64.
4. ATS/ACCP Statement. ATS/ACCP Statement on Cardiopulmonary Exercise Testing. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167:211–277.
5. ATS Statement. ATS statement: guidelines for the six-minute walk test. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:111–117.
6. Gouzi F, Préfaut C, Abdellaoui A, Roudier E, de Rigal P, Molinari N, Laoudj-Chenivresse D, Mercier J, Birot O, Hayot M. Blunted muscle angiogenic training-response in COPD patients versus sedentary controls. *Eur Respir J* 2013;41:806–814.
7. Andersen P, Henriksson J. Capillary supply of the quadriceps femoris muscle of man: adaptive response to exercise. *J Physiol* 1977;270:677-690.1.
8. Hepple RT. A new measurement of tissue capillarity: the capillary-to-fibre perimeter exchange index. *Can J Appl Physiol Rev Can Physiol Appl* 1997;22:11–22.
9. Teichert M, Milde L, Holm A, Stanicek L, Gengenbacher N, Savant S, Ruckdeschel T, Hasanov Z, Srivastava K, Hu J, Hertel S, Bartol A, Schlereth K, Augustin HG. Pericyte-expressed Tie2 controls angiogenesis and vessel maturation. *Nat Commun* 2017;8:.
10. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 2008;3:1101–1108.
11. Rossi E, Smadja DM, Boscolo E, Langa C, Arevalo MA, Pericacho M, Gamella-Pozuelo L, Kauskot A, Botella LM, Gaussem P, Bischoff J, Lopez-Novoa JM, Bernabeu C. Endoglin regulates mural cell adhesion in the circulatory system. *Cell Mol Life Sci* 2016;73:1715–1739.
12. Boscolo E, Stewart CL, Greenberger S, Wu JK, Durham JT, Herman IM, Mulliken JB, Kitajewski J, Bischoff J. JAGGED1 Signaling Regulates Hemangioma Stem Cell-to-Pericyte/Vascular Smooth Muscle Cell Differentiation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011;31:2181–2192.
13. Aarts E, Verhage M, Veenvliet JV, Dolan CV, Sluis S van der. A solution to dependency: using multilevel analysis to accommodate nested data. *Nat Neurosci* 2014;17:491–496.
14. Pinheiro J, Bates D, DebRoy S, Sarkar D. R Core Team (2014) nlme: linear and nonlinear mixed effects models. R package version 3.1-117. Available H TtpCRAN R-Proj Orgpackage Nlme 2014;
15. Faraway JJ. Extending the linear model with R: generalized linear, mixed effects and nonparametric regression models. CRC press; 2016.

Supplementary figures

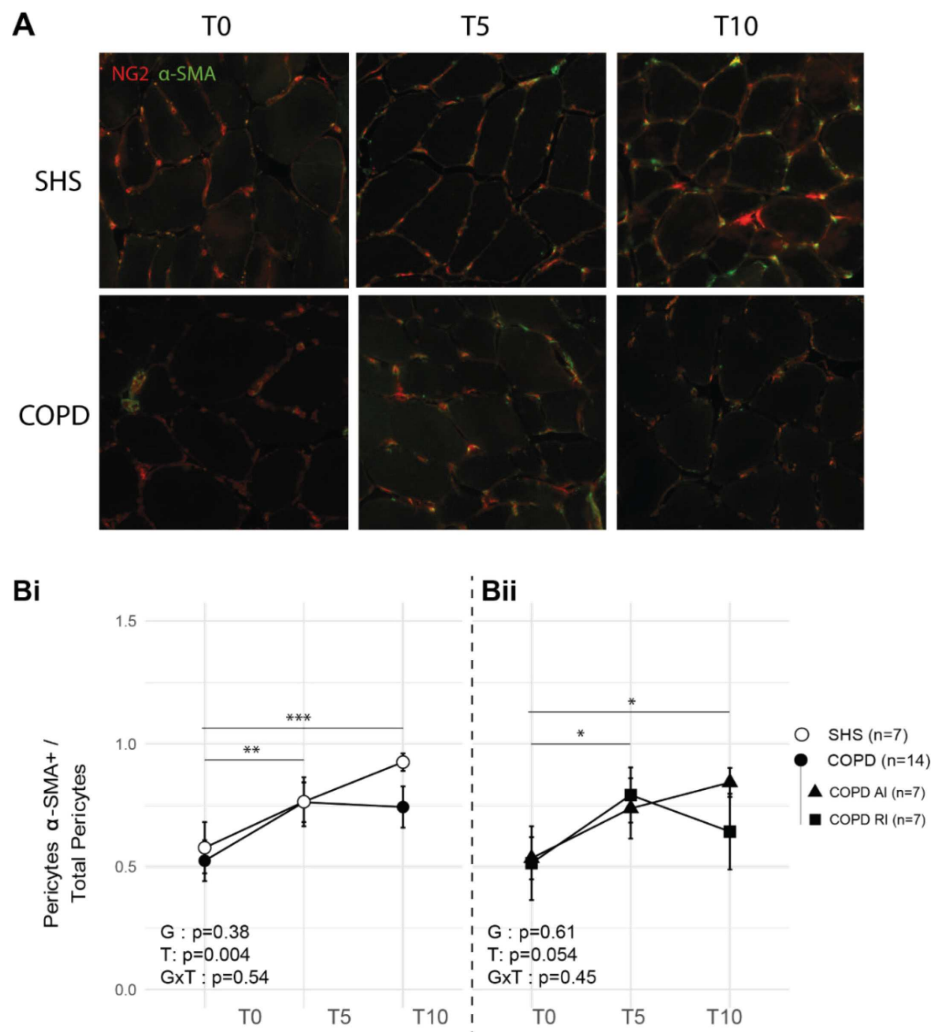


Figure supplemental 1. Effect of exercise training in α SMA+ pericyte proportion in skeletal muscle of COPD patients and SHS. (A) Images of NG2/ α SMA double-staining of COPD patients and SHS vastus lateralis cryosections at T0, T5 and T10. (B) Variations in the proportion of pericytes expressing α SMA protein in response to exercise training. Data are presented as mean \pm SD. Linear mixed effect model: T: Time effect. Time effect post-hoc test: **, ***: $p < 0.01$, $p < 0.001$. Scale-bar = 50 μ m.

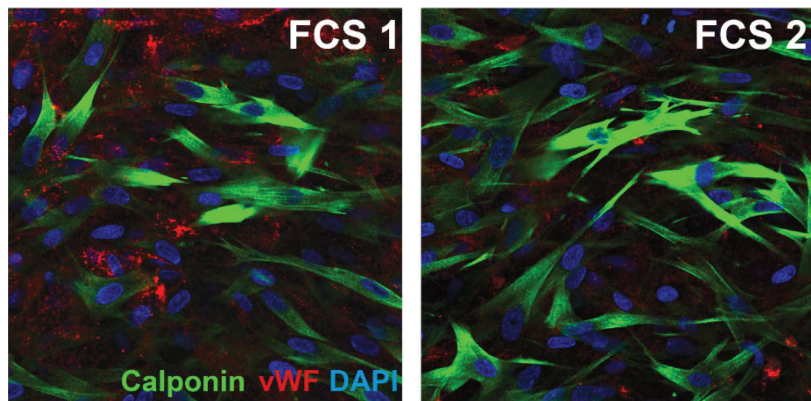


Figure supplemental 2. *Calponin expression in MSCs from MSC/ECFC co-culture exposed to fetal calf serum (FCS). Representative image of MSC/ECFC co-culture exposed to FCS.*

Etude 3

Article original

Is the skeletal muscle cells angiogenic potential impaired in COPD patients?

Léo Blervaque, Matthias Catteau, Marine Blaquière, Emilie Passerieux, Jacques Mercier, Maurice Hayot, Fares Gouzi*, Pascal Pomiès*

Article en cours de préparation

Version non définitive rédigée en Français

Présentation de l'étude n°3

Les études n° 1 & 2 ont permis d'identifier une perturbation des relations péricytes/capillaires lors de l'angiogenèse induite par le réentrainement à l'effort (REE) chez les patients BPCO, et proposent l'hypothèse de l'effet de facteurs systémiques. Cependant, nous avons vu lors du chapitre 2 de la partie 1 que l'angiogenèse musculaire est également sous contrôle de la cellule musculaire et en particulier de la voie dépendante du PGC1- α musculaire. En effet, *via* cette voie PGC1- α , la cellule musculaire est capable de produire les facteurs pro-angiogéniques VEGF-A et SPP1 qui vont stimuler, respectivement, la croissance et la maturation capillaire. Or, la BPCO se caractérise par une dysfonction du muscle strié squelettique. Cette comorbidité fréquente est spécifique de la maladie car non liée à un simple déconditionnement. Dans le cadre de cette dysfonction musculaire, il a été montré une réduction de l'expression de PGC1- α dans le muscle de patients BPCO. Ainsi, nous faisons l'hypothèse qu'une altération de cette voie PGC1- α pourrait limiter la réponse angiogénique musculaire en réponse au REE. L'objectif de cette étude est ainsi d'explorer la présence d'une altération du potentiel pro-angiogénique de la cellule musculaire de patients BPCO en réponse à une stimulation mimant l'exercice en endurance, en utilisant la comparaison avec les myotubes issus de muscles de contrôles sains sédentaires (CSS). A partir de biopsies musculaires prélevées au niveau du vaste latéral chez des sujets BPCO et de CSS (fiche technique n°5), avant et après un REE de 5-6 semaines, nous avons réalisé un isolement et une purification de myoblastes humains (fiche technique n°10). Nous avons ensuite différencié ces cellules en myotubes et nous leur avons appliqué une stimulation électrique par impulsion (SEI) (fiche technique n°11), stimulus reproduisant *in vitro* l'exercice en endurance. Par qPCR (fiches techniques 8 & 9), nous avons mis en évidence une altération de la régulation transcriptionnelle de PGC1- α en réponse à la SEI dans les myotubes de patients BPCO comparé aux CSS. Cette altération est survenue chez des patients BPCO qui n'ont pas augmenté leur capillarisation musculaire sous l'effet du REE. En revanche, ERR- α et VEGF-A - sous-effecteurs de l'axe pro-angiogénique de la voie PGC1- α - n'ont pas présenté de changements d'expression sous l'effet de la stimulation, quel que soit le groupe. La sécrétion de VEGF-A par les myocytes n'a pas non plus été modifiée par la SEI. Finalement, en parallèle d'une réduction de la couverture péricytaire dans le muscle de patients BPCO, le facteur SPP1 tendait aussi à être sous-exprimé dans les myotubes des patients BPCO, stimulés ou non.

Introduction

La Broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) est une maladie chronique d'origine pulmonaire (1), qui se caractérise par des comorbidités extra-pulmonaires, en particulier vasculaires. Une raréfaction du lit capillaire musculaire a notamment été montrée chez les patients BPCO (2–5). Cette raréfaction capillaire constitue un facteur d'intolérance à l'effort (en réduisant l'apport et la capacité de consommation d'oxygène musculaire) et d'hypertension artérielle (6-8). Le réentraînement à l'effort (REE) est une thérapie faisant part intégrante de la prise en charge de la BPCO (9). Bien qu'il soit à l'origine de nombreux effets bénéfiques chez les patients BPCO, ce REE ne permet pas d'induire une réponse angiogénique physiologique. En effet, l'augmentation du nombre de capillaires sanguins au niveau musculaire squelettique est apparue significativement inférieure à celle observée chez des sujets sains appariés (7). Malheureusement, les causes de ces perturbations chez les patients BPCO restent actuellement inconnues.

Au niveau musculaire, la réponse angiogénique à l'entraînement est en partie orchestrée par la cellule musculaire, le myocyte, qui joue un rôle déterminant dans l'intégration des stimuli induits par l'exercice et dans leur traduction en signaux pro-angiogéniques (10–12). La voie de signalisation intramyocytaire impliquant le PGC1- α est notamment apparue déterminante dans la production de VEGF-A myocytaire en réponse à l'exercice ou à des stimuli s'en rapprochant (13,14). Les inhibitions spécifiques du PGC1- α ou du VEGF-A myocytaire ont été associées à une abolition de la réponse angiogénique au REE (12,15). Au-delà du VEGF-A, la voie du PGC1- α myocytaire joue un rôle dans le recrutement des péricytes au niveau des vaisseaux néoformés, *via* la production du facteur SPP1 (10). En réponse au REE, la voie PGC1- α /SPP1 est donc cruciale dans l'angiogenèse musculaire, afin d'obtenir un réseau capillaire mature, et donc viable et fonctionnel (10). Par ailleurs, le PGC1- α musculaire est apparu réduit dans le muscle de patient BPCO (16). Ainsi, une perturbation des voies PGC1- α /VEGF-A et PGC1- α /SPP1 pourrait être à l'origine de l'émoussement de la réponse angiogénique musculaire chez ces patients.

A partir de prélèvements musculaires, des cellules souches musculaires humaines – les cellules satellites – peuvent être cultivées *in vitro*, puis secondairement différenciées en myotubes. Cette approche de culture primaire est validée pour l'étude des voies de signalisation musculaire *in vitro* (17–19). De plus, sous l'effet d'une stimulation électrique par impulsion (SEI) *in vitro*, les myotubes présentent des adaptations de la signalisation intra-cellulaire mimant celles induites en réponse à un exercice en endurance par des cellules musculaires *in vivo*. En particulier, le PGC1- α apparaît surexprimé (20). Dans la BPCO, la culture primaire de cellules souches musculaires permet d'obtenir des myotubes reproduisant les caractéristiques du phénotype musculaire pathologique du patient BPCO, notamment l'atrophie et la dysrégulation des voies de signalisation intra-cellulaire qui contrôlent le diamètre et la fonction des cellules musculaires (17–19). Couplée à la SEI, la culture primaire de cellules souches musculaires issues de patients BPCO permet donc une exploration des voies de signalisation musculaire impliquées dans un défaut de réponse angiogénique à l'entraînement, en particulier celles dépendantes de la voie PGC1- α .

Ainsi, l'objectif de notre étude était de comparer les réponses pro-angiogéniques à un stimulus mimant l'exercice en endurance - la SEI *in vitro* – entre des cultures de myotubes issus de patients BPCO et de contrôles sédentaires sains (CSS).

Matériel & méthodes

Population de l'étude

Nous avons analysé les données de patients BPCO et de sujets contrôles sains issues de précédents essais cliniques conduits par notre groupe (7,21) (clinical trial : NCT01183039, NCT01183052 & NCT02040363). Les patients BPCO ont été initialement intégrés dans les essais cliniques en suivant les critères d'inclusions suivants : âgés de 35 à 85 ans, présence d'une dyspnée et/ou d'une toux chronique et/ou d'une histoire d'exposition aux facteurs de risque de la maladie, avec un diagnostic confirmé par spirométrie (VEMS/CV <0.7) (1). Les CSS devaient être âgés de 35 à 85 ans, ne pas présenter de pathologie ou de traitements et pratiquer moins de 150 minutes d'activité physique régulière par semaine. Les CSS devaient être appariés aux patients BPCO sur l'âge (+/-4 ans) et le sexe.

Réentraînement à l'effort

Il était demandé aux CSS et aux patients BPCO de suivre un entraînement comportant 3 séances par semaine de réentraînement en endurance sur cycloergomètre comportant 45-60 min. d'effort à une intensité ciblant le premier seuil ventilatoire. Deux séances par semaine de renforcement musculaire ciblé, sur 8-10 groupes musculaires à une intensité de 60% de 1RM complétaient le programme. L'ensemble du réentraînement à l'effort était en accord avec les standards actuellement recommandés pour la réhabilitation respiratoire (22).

Prélèvement et traitement des biopsies musculaires

Les biopsies musculaires ont été réalisées au niveau du vaste latéral du quadriceps en utilisant une méthodologie précédemment publiée (23). La biopsie était ensuite séparée en plusieurs parties. Une partie était congelée dans de l'isopentane préalablement refroidi puis stockée à -80°C . Cette partie était ensuite utilisée pour réaliser des cryosections musculaires permettant l'analyse de la capillarisation et de la couverture péricytaire. Une autre partie était congelée progressivement ($-1^{\circ}\text{C}/\text{minute}$) durant 24 heures puis stockée dans l'azote liquide en attendant son utilisation pour la purification des myoblastes.

Immunofluorescence

La capillarisation musculaire et la couverture péricytaire ont été mesurées à l'aide de cryosections de biopsies musculaires transversales de $14\mu\text{m}$ d'épaisseur. La capillarisation a été évaluée *via* le nombre de capillaires par fibre musculaire (7,24). Les capillaires ont été marqués à l'aide d'un anticorps anti-CD31 (1 :100, #550389 ; BD biosciences) et les fibres musculaires apparaissaient en lumière blanche. La couverture péricytaire a été évaluée par le rapport de l'aire de la coupe positive au NG2, marquée à l'aide d'un anticorps anti-NG2 (1 :100, ab83178 ; Abcam), rapportée à l'aire positive au CD31 (25).

Isolement et purification des myoblastes

Le processus complet, du prélèvement de la biopsie musculaire à l'analyse expérimentale est schématisé dans la figure 1. Les myoblastes ont été isolés et purifiés en suivant une méthode précédemment publiée (19,26). Brièvement, la partie de la biopsie conservée à l'azote a été

redécoupée en petites sections (explants) puis répartie de manière homogène sur une boîte de culture 35mm coatée au Collagène I (Corning, NY, USA). Les explants ont ensuite été recouverts par une couche de Matrigel à 6mg/mL (Corning, NY, USA) puis par du milieu complet (DMEM, 20%SVF, 0.5% Ultrosér G). Après 6 à 14 jours de culture à 37°C, les cellules sortant des explants ont été récupérées à l'aide de dispase (Sigma-Aldrich), cultivées en boîte de culture 100mm coatées au collagène I puis purifiées à l'aide d'un anticorps primaire anti-CD56 (1 :1000, BD Bioscience) et d'un système MACS (Miltenyi Biotec), en suivant les recommandations du fournisseur. Les myoblastes CD56+ purifiés ont ensuite été cultivés jusqu'à 80% de confluence puis différenciés en myotubes suite au remplacement du milieu complet par du milieu de différenciation (DMEM/2% SVF) durant 5 jours.

Stimulation électrique par impulsion (SEI) & obtention des ARN totaux et milieux conditionnés

La SEI des myotubes a été réalisée durant 24h à partir du 4ème jour de différenciation des myotubes, après changement du milieu de culture, à l'aide de l'appareil C-Pace (Ionoptix). Les cellules ont été stimulées à une fréquence de 1 Hz, une durée de pulsation de 4 ms et un voltage de 11,5 V, des modalités validées comme mimant l'exercice en endurance (20). Pour chaque puits électrostimulé, un puits non-stimulé durant 24h était utilisé comme contrôle. Directement à la fin des 24h de stimulation, les cellules étaient récupérées et les ARN totaux purifiés à l'aide du kit NucleoSpin (#740933 ; Macherey-Nagel), en suivant les recommandations du fournisseur. Les milieux conditionnés par la stimulation (ou contrôles) étaient récupérés en parallèle des cellules et stockés à -80°C en attendant les analyses.

RT-qPCR

Des ADN_c étaient synthétisés à l'aide des ARN totaux purifiés, à l'aide du kit de transcription inverse *Transcriptor Universal cDNA Master* (#5893151001 ; Roche), en suivant les recommandations du fabricant. L'expression des ARNm était ensuite analysée à l'aide d'un protocole de qPCR, et le mélange *SyBR Green I Master* (#04707516001 ; Roche). L'expression des ARNm cibles était rapportée à l'expression du gène de ménage RPLPO.

Analyses ELISA

Directement à la suite du programme de SEI, le surnageant de culture était récupéré, centrifugé puis directement congelé et stocké à -80°C . Le surnageant était ensuite utilisé pour doser la quantité de VEGF-A à l'aide d'un kit ELISA (#RAB0507, Sigma-Aldrich), en suivant le protocole fourni par le fabricant, en utilisant $100\mu\text{L}$ de surnageant par puits, en triplicata.

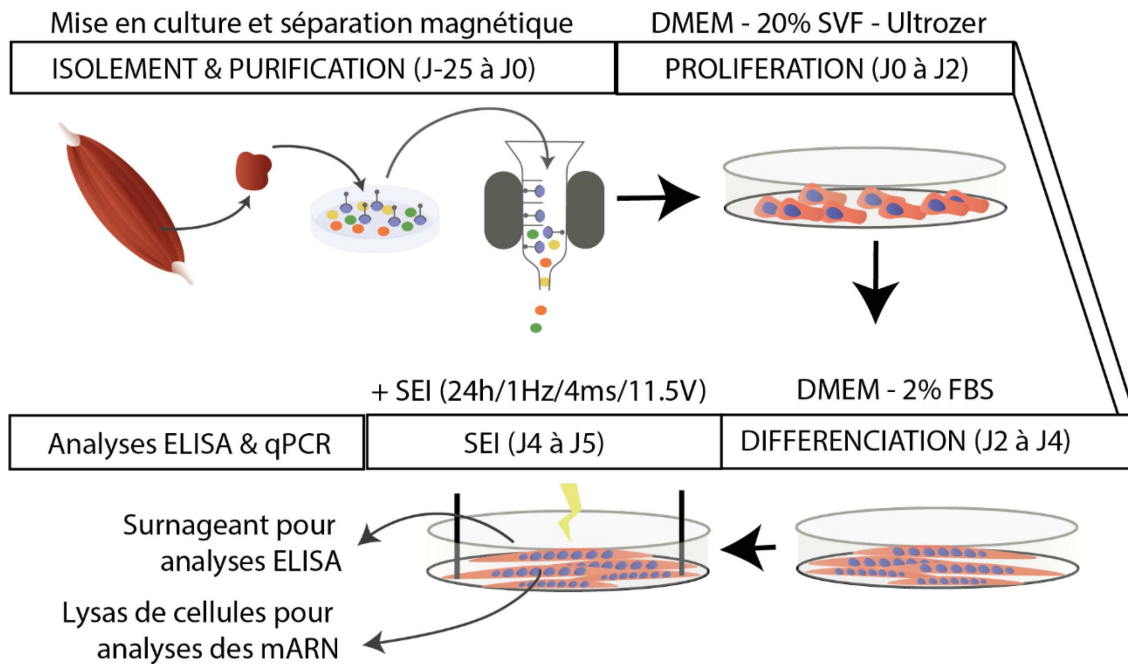


Figure 1. Présentation de la démarche expérimentale de l'étude. DMEM: Dulbecco/Vogt modified Eagle's minimal essential medium. SVF : Sérum de veau fetal. J : Jours. SEI : stimulation électrique par impulsions.

Analyses statistiques

Les caractéristiques cliniques et fonctionnelles à l'état de base ont été analysées à l'aide de tests T de Student ou U de Mann-Whitney en fonction de la distribution des données. L'analyse des réponses des différentes variables à l'effet de l'entraînement a été réalisée à l'aide de modèles linéaires à effets mixtes (27) avec comme facteurs fixes le *Temps*, le *Groupe* et l'interaction de ces 2 facteurs et comme effet aléatoire le facteur *Sujet*. L'analyse des réponses des différentes variables à l'effet de la SEI a été réalisée à l'aide des mêmes modèles en remplaçant l'effet *Temps* par un effet *Condition*. Toutes les analyses ont été réalisées à l'aide du logiciel R-3.5.0 www.r-project.org. Une p-value inférieure à 0.05 était considérée significative.

Résultats

Caractéristiques à l'état de base

Les données cliniques et fonctionnelles des patients BPCO et des CSS sont présentées dans le Tableau 1. Les sujets des deux groupes ne présentaient pas de différences de sexe, d'âge ou d'indice de masse corporelle. A l'inverse, contrairement aux CSS, les patients BPCO présentaient une réduction des débits ventilatoires visible *via* la réduction de VEMS ainsi qu'une réduction du rapport VEMS/CV. Au niveau des caractéristiques fonctionnelles, les patients BPCO présentaient une réduction marquée des paramètres de tolérance à l'effort (TDM6) et de consommation pic d'oxygène (VO_{2pic}).

TABEAU 1. CARACTERISTIQUES BASALES DES CONTROLES SEDENTAIRES SAINS ET DES PATIENTS BPCO.			
	BPCO (N=6)	CSS (N=6)	p-value
SEXE (FEMMES)	66.7%	66.7%	1.000
AGE (ANNEES)	63.17 (5.49)	63.50 (7.12)	0.929
IMC (KG/TAILLE²)	25.43 (4.38)	26.98 (3.04)	0.494
VEMS/CV (%)	45.50 (13.05)	74.00 (5.87)	0.002
VEMS (L)	1.47 (0.75)	3.13 (0.89)	0.006
VEMS (% THEO.)	52.00 (18.83)	103.17 (18.07)	0.001
INDICE BODE	3.00 (1.55)	NA	
TDM6 (M)	557.50 (66.67)	647.33 (28.58)	0.013
TDM6 (% THEO.)	87.17 (16.24)	99.17 (9.20)	0.146
V'O_{2PIC} (ML/MIN/KG)	17.65 (3.62)	25.90 (6.01)	0.016
V'O_{2PIC} (% THEO.)	70.50 (11.84)	107.50 (20.34)	0.003
SV (ML/MIN/KG)	11.92 (2.11)	13.95 (3.55)	0.256

Les données sont présentées sous la forme Moyenne (écart-type). BPCO : Broncho-pneumopathie Chronique Obstructive. CSS : Contrôle sédentaire sains. IMC : Indice de masse corporelle. VEMS : Volume maximal expiratoire à la première seconde. CV : Capacité vital. TDM6 : Distance au test de marche de 6-minutes. V'O_{2pic} : Consommation pic d'oxygène. SV : Seuil ventilatoire.

La réponse musculaire pro-angiogénique

Au niveau du vaste latéral, un REE de 5 semaines a induit une augmentation de la capillarisation musculaire chez les CSS (+24% ; $p=0.011$), mais pas chez les patients BPCO (-2% ; $p=0.82$), traduisant une angiogenèse significativement différente entre les deux groupes (Interaction Groupe x Temps : $p=0.037$; Fig.2 a & b).

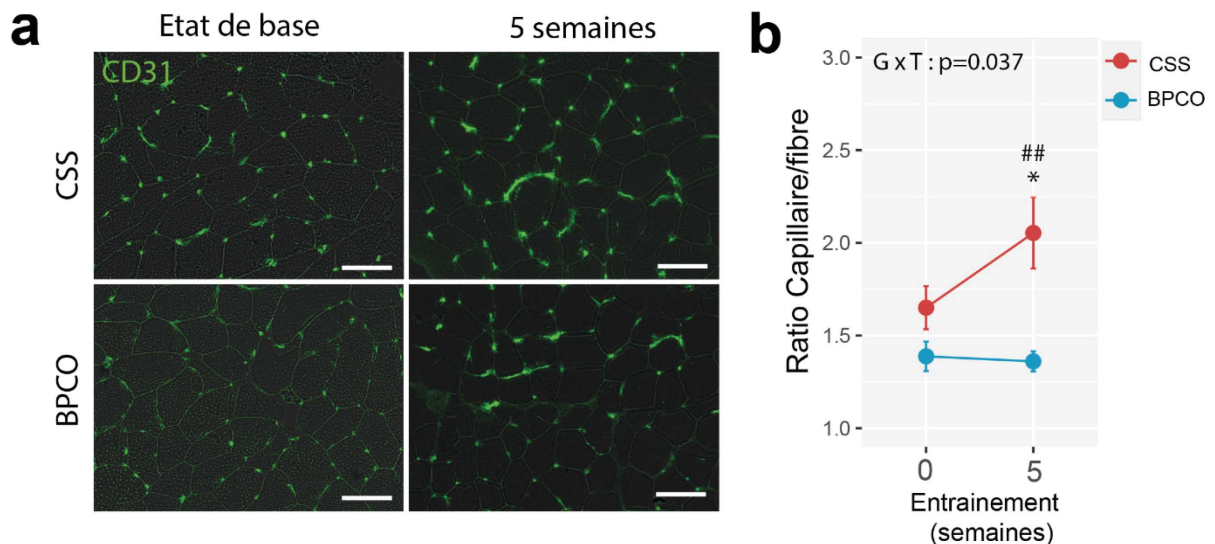


Figure 2. Adaptation musculaire *in vivo* de la capillarisation au réentraînement à l'effort. a) Image représentative d'analyses immunohistochimiques des capillaires sanguins musculaires à l'aide d'anticorps anti-CD31 sur des cryosections transverses de vaste latéral. b) Quantification du ratio capillaire/fibre à partir des analyses immunohistochimiques des capillaires sanguins musculaires. GxT : Interaction des effets Groupe et Temps, modèles linéaires à effet mixtes. Analyses post-hoc : * $p<0.05$ CSS versus BPCO. ## $p<0.01$ Temps 0 versus Temps 5. Les données sont présentées en tant que moyenne \pm Erreur standard à la moyenne. Echelle : 50 μ m

In vitro, l'expression des ARNm pour PGC1- α , ERR- α et VEGF-A ne présentait pas de différences à l'état de base au sein des myotubes isolés à partir des biopsies des CSS et des patients BPCO (Fig.3a). La réponse des myotubes BPCO et CSS à une SEI de 24 heures était au contraire différente (Interaction Groupe x Condition : $p=0.009$; Fig. 3a), avec une augmentation de l'expression des ARNm pour PGC1- α dans les myotubes CSS (+85% ; $p=0.005$) mais pas dans les myotubes BPCO (-8% ; $p=0.72$). Post-SEI, l'expression de PGC1- α était significativement plus importante dans les myotubes CSS que dans ceux BPCO ($p=0.010$; Fig. 3a). A l'inverse du PGC1- α , l'expression des ARNm pour ERR- α et VEGF-A dans les myotubes BPCO et CSS ne

présentait pas de variations significatives, ni entre l'état de base et l'état post-SEI ni entre les groupes post-SEI (Fig. 3b & c).

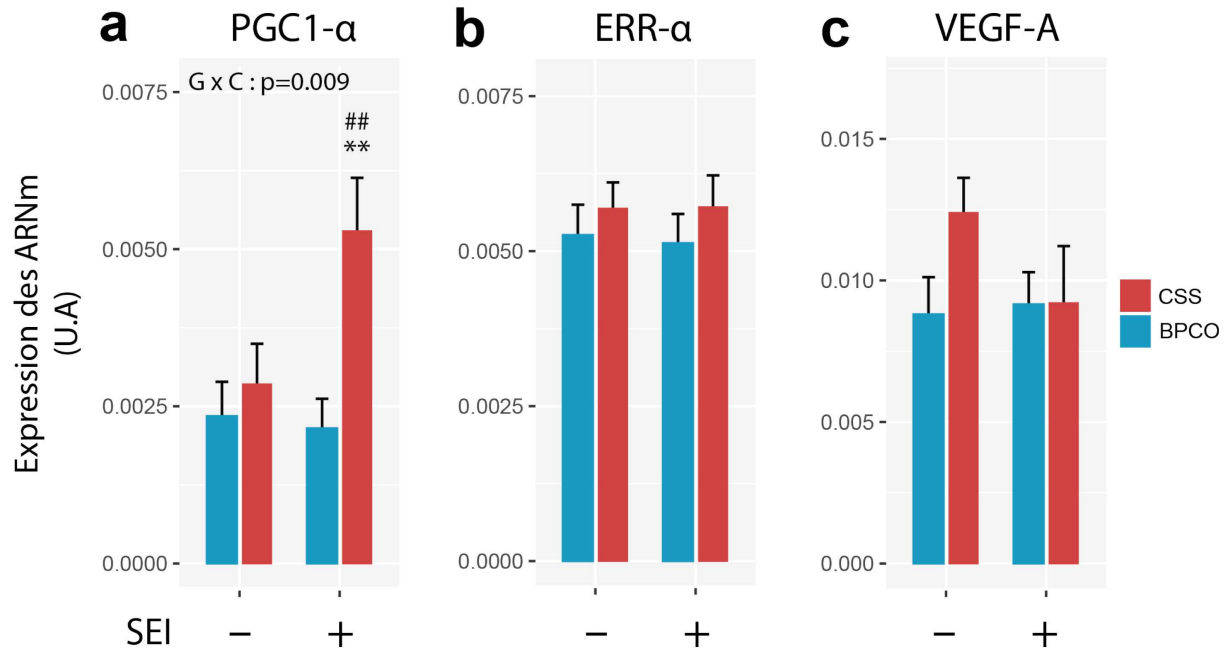


Figure 3. Variations de l'expression des ARNm au sein des cultures primaires de myotubes humains, sous l'effet de la stimulation électrique par impulsion (SEI). Quantification par analyses qPCR du niveau d'expression des ARN messagers (ARNm) à l'aide de lysats de myotubes humains isolés à partir de biopsies musculaires CSS ou BPCO et soumis ou non à 24h de SEI. GxC : Interaction des effets Groupe et Condition. Analyses post-hoc : ** p<0.01 CSS versus BPCO. ## p<0.01 Condition SEI+ versus Condition SEI-. Les données sont présentées en tant que moyenne ± Erreur standard à la moyenne.

La sécrétion de VEGF-A par les myotubes

Après 24h de SEI, le surnageant de culture était récupéré pour un dosage de la quantité de la protéine VEGF-A. Nous n'avons pas observé de différences significatives de sécrétion de VEGF-A dans le milieu de culture entre les myotubes issus de patients BPCO et ceux issus de CSS (Fig. 4). Nous n'avons également pas observé de variations significatives de ces niveaux de VEGF-A sous l'effet de la SEI (Fig. 4).

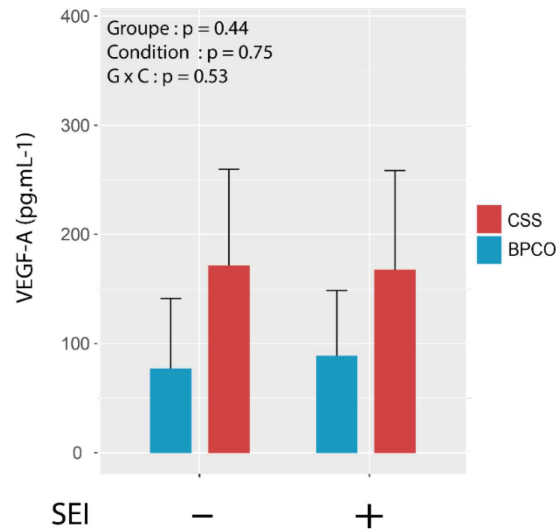


Figure 4. Variations de la sécrétion de VEGF-A par des cultures primaires de myotubes humains soumises à une stimulation électrique par impulsion (SEI). Dosage par ELISA des quantités de protéine VEGF-A dans le surnageant de cultures primaires de myotubes humains isolés à partir de biopsies musculaires CSS ou BPCO et soumis ou non à 24h de SEI. GxC : Interaction des effets Groupe et Condition, modèles linéaires à effets mixtes. Les données sont présentées en tant que moyenne \pm Erreur standard à la moyenne.

Production de SSP1 musculaire et maturation capillaire

Nous avons pu voir que la couverture péricytaire des capillaires sanguins musculaires tendait à être réduite chez les patients BPCO par rapport aux sujets sains quel que soit le temps d'entraînement (Effet groupe : $p = 0.0562$; Fig. 5a). En nous intéressant à l'expression des ARNm pour SPP1 dans les myotubes issus des biopsies musculaires CSS et BPCO, nous avons également pu observer une tendance à la sous-expression de ces ARNm au sein des myotubes BPCO, tendance présente indépendamment de la SEI (Effet groupe : $p = 0.065$; Fig. 5b). Post-SEI, l'expression des ARNm pour SPP1 était 3.1 fois plus importante dans les myotubes CSS que dans ceux BPCO.

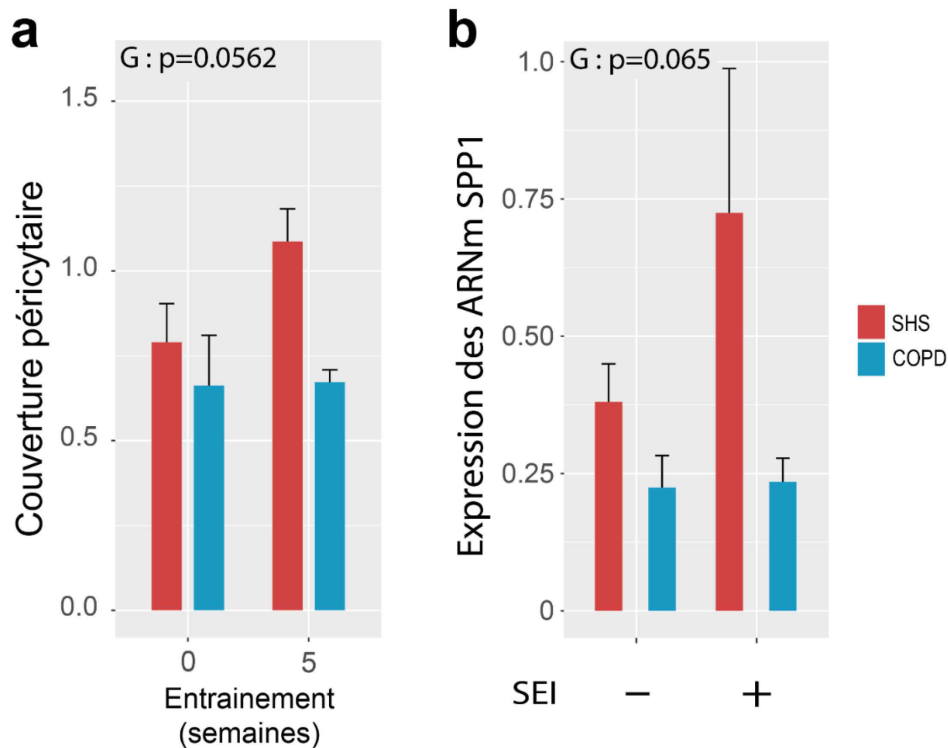


Figure 5. Maturation capillaire musculaire et modulation de l'expression de SPP1 en réponse à une stimulation électrique par impulsion (SEI) dans les myotubes. a) Quantification de la couverture péricytaire à partir d'analyses immunohistochimiques des capillaires sanguins musculaires via le ratio de l'aire positive au NG2 sur celle positive au CD31. b) Quantification par analyses qPCR du niveau d'expression de SPP1 à partir de lysas de myotubes humains isolés à partir de biopsies musculaires CSS ou BPCO et soumis ou non à 24h de SEI. Modèle linéaire à effets mixtes. Les données sont présentées en tant que moyenne \pm Erreur standard à la moyenne.

Discussion

Cette étude est la première à explorer les voies de signalisation pro-angiogéniques au sein de cellules musculaires de patients BPCO à l'état de base mais également en réponse à un stimulus mimant l'exercice en endurance. A l'aide de cette approche nous avons pu montrer que la capacité de régulation transcriptionnelle des niveaux de PGC1- α était altérée chez les patients BPCO. Sur un nombre limité de patients dont l'angiogenèse était altérée, la sécrétion de VEGF-A par les myotubes restait toutefois normale.

Nous avons intégré dans cette étude des patients BPCO et des CSS correctement appariés sur l'âge et le sexe (Tableau 1). Cela nous a permis de nous affranchir des effets de genre et d'âge

qui sont connus pour avoir un effet sur la régulation de l'angiogenèse musculaire (28,29). Les patients BPCO, recrutés dans le cadre de deux précédentes études (7,21) présentaient bien un émoussement de la réponse angiogénique au niveau immunohistologique (Fig. 2). La capacité de réponse des cellules musculaires à l'exercice a été explorée à partir de cellules souches différenciées *in vitro* en myotubes. Cette méthode a été préalablement validée chez le patient BPCO, permettant d'obtenir des cellules musculaires conservant *in vitro* les caractéristiques pathologiques que l'on retrouve dans la cellule musculaire *in vivo* (18,19,26). Cette méthode a permis la mise en évidence d'anomalies de signalisation musculaire spécifique de la dysfonction musculaire de la maladie (18,19,26), et apparaît donc adaptée à la mise en évidence des mécanismes pro-angiogéniques aigus de réponse à un stimulus, indépendamment de son environnement cellulaire. De plus, les mécanismes étant dynamiques, la réponse cellulaire peut être transitoire (30) et donc difficile à mettre en évidence *in vivo* par le biais d'une seule biopsie musculaire. La réponse à l'exercice en endurance a été explorée *via* une stimulation électrique par impulsion (SEI) répétée pendant 24h. Cette SEI a été précédemment validée comme représentative d'un exercice en endurance (20), modalité d'exercice privilégiée chez les patients BPCO (22).

Au sein des myotubes BPCO non-exposés à un stress tel que la SEI, nous n'avons pas trouvé d'anomalies transcriptionnelles sur les marqueurs PGC1- α , ERR- α ou VEGF-A (Fig. 2). De même, dans les cultures de myotubes sans stimulation, nous n'avons pas pu mettre en évidence de différences significatives de sécrétion de la protéine VEGF-A entre les conditions BPCO et CSS. Au niveau musculaire, une altération des niveaux de VEGF-A à l'état de base n'est pas systématique chez les patients BPCO, l'expression du VEGF-A ayant été trouvée réduite dans certaines études mais préservée dans d'autres (7,31,32). Chez les sujets inclus dans l'étude, nous avons pu voir que les sujets BPCO ne présentaient pas de réduction du ratio capillaire/fibre à l'état de base (Fig. 2), comme déjà observé chez les patients les moins sévères (2,5). Ainsi, l'absence de différence de niveaux basaux d'expression et de sécrétion des marqueurs pro-angiogéniques musculaires pourrait s'expliquer par une régulation du réseau capillaire à l'état de base préservée chez les patients BPCO considérés dans l'étude.

La réponse angiogénique à l'entraînement, évaluée par le ratio capillaire/fibre, a été effective chez les sujets sains et témoigne de la pertinence de notre modèle de réentraînement à

l'effort dans l'induction de l'angiogenèse musculaire. Cette réponse angiogénique a été appréciée sur le long terme (5 semaines) et dépend de réponses répétées des cellules musculaires qui libèrent des stimuli pro-angiogéniques lors de l'exercice aigu (30,33). Ainsi, l'étude de la réponse de myotubes à la SEI *in vitro* apparaît adaptée à la problématique. De plus, la SEI permet de s'affranchir des facteurs confondants *in vivo* que sont l'augmentation du flux sanguin et l'hypoxie locale, en particulier pour le PGC1- α (13,34). Chez les CSS, nous avons trouvé une augmentation de l'expression de PGC1- α en réponse à la SEI (Fig. 2). Cette réponse a été retrouvée de manière constante dans différentes études utilisant des cultures primaires de myotubes humains (35–37). Ce résultat confirme ainsi la pertinence et la faisabilité de notre modèle de culture et de stimulation *in vitro*.

Etant donné que la voie de régulation PGC1- α musculaire constitue un médiateur de premier plan de l'effet pro-angiogénique de l'exercice (10,11,14), l'activation de cette voie pourrait être impliquée dans l'angiogenèse observée chez ces CSS. Toutefois, malgré l'augmentation du PGC1- α chez les CSS en réponse à la SEI, cette dernière n'a pas induit d'augmentation de sécrétion de VEGF-A par les myotubes chez ces sujets (Fig. 4). Nous n'avons pas non plus observé de variations transcriptionnelles des voies ERR- α et VEGF-A sous l'effet de la SEI (Fig. 3), alors que ces variations sont normalement observées dans des myotubes issus de sujet sains après 24h de SEI (37). Ce résultat pourrait être expliqué par une différence d'âge entre les sujets sains de notre étude et ceux de Lambernd *et al.* (64 ± 7 ans vs. 31 ± 12 ans en moyenne) (37). En effet, il a été montré que l'expression du VEGF-A en réponse à un exercice aigu était réduite chez des sujets âgés comparé à des sujets jeunes (38). Chez ces sujets âgés, la SEI pourrait avoir été insuffisante pour induire l'expression du VEGF-A dans les myotubes des CSS. La production conjointe de VEGF-A et de PGC1- α dans des myotubes étant également induite par d'autres stimuli mimant le stress musculaire à l'exercice (stimulation β -adrénergique, hypoxie et/ou a stress métabolique (10,11,13,14)), il est probable que seul le couplage de la SEI à d'autres stimuli *in vitro* puisse induire une élévation de la sécrétion du VEGF-A chez ces sujets plus âgés.

Au vu de la réponse observée chez les CSS, il apparaît que la BPCO altère la réponse du PGC1- α à la SEI dans les myotubes en culture. Notre observation complète ainsi les différents travaux montrant les défauts des mécanismes musculaires chez les patients BPCO *in vitro* (17,18,19).

De plus, cette observation rejoint les défauts d'expression de PGC1- α retrouvés *in vivo* chez les patients BPCO (16). L'augmentation du PGC1- α est impliquée dans l'adaptation de la biogenèse mitochondriale, de la répartition typologique des fibres musculaires et de l'angiogenèse à un stimulus (11,14,39), notre résultat présente donc un intérêt dans la compréhension de la dysfonction musculaire du patient BPCO. De plus, nous avons recherché les conséquences sur la stimulation de l'angiogenèse par le muscle de ce défaut de PGC1- α . Malheureusement, la stimulation de cette voie par la SEI n'ayant pas été effective chez les CSS, les analyses des ARNm ERR- α et VEGF-A, et de la sécrétion de VEGF-A ne nous permettent donc pas de conclure sur la présence d'anomalies chez les patients BPCO. Le test de modalités de stimulation des cellules complémentaires est donc l'étape suivante dans l'exploration de cette voie.

D'autre part, il a été montré que le PGC1- α musculaire est à l'origine de la régulation de l'expression de SPP1 dans la cellule musculaire. SPP1 est impliqué dans le recrutement des péricytes, indispensables à l'acquisition de vaisseaux matures, viables et fonctionnels, et son inhibition mène à l'acquisition de vaisseaux immatures au terme de l'angiogenèse (10). De manière cohérente, nous avons observé une sous-expression des ARNm codant pour SPP1 dans les myotubes des sujets BPCO. Cette sous expression n'était pas affectée par la SEI et était associée à une réduction de la couverture péricytaire chez ces patients (Fig. 5). Ainsi, l'émoussement de la réponse angiogénique musculaire chez les patients BPCO pourrait être liée à une vulnérabilité des capillaires immatures et non couverts par des péricytes, et consécutive d'une sous-expression conjointe de PGC1- α et SPP1 dans les cellules musculaires des patients. Cette hypothèse nécessite toutefois d'être explorée spécifiquement. De plus, les observations *in vitro* devraient être complétées par des analyses cliniques *in vivo*, notamment par des mesures de la sécrétion de SSP1 dans le milieu musculaire interstitiel au cours d'un exercice aigu (40).

Limites de l'étude

Concernant cette étude, un certain nombre de limites peuvent être évoquées. Premièrement, il est nécessaire de mettre en perspective nos résultats vis-à-vis du nombre réduit de sujets inclus dans l'étude. Cette limite est inhérente au design de l'étude qui implique des

interventions invasives (biopsies musculaires) et l'isolement de myoblastes, un processus long et difficile à mettre en place sur un grand nombre de sujets. Une seconde limite est l'absence de confirmation des variations musculaires des niveaux d'expression des acteurs considérés (PGC1- α ...) *in vivo*, pré- et post-exercice aigu, la prise de biopsies musculaires dans ces conditions étant discutable d'un point de vue éthique. Enfin, nous n'avons pas intégré dans cette étude l'analyse de l'effet de la SEI sur des myotubes issus de biopsies musculaires prélevées à la suite du REE, analyse qui sera effectuée dans le cadre de prochains travaux.

Conclusion

Nous avons pu dans cette étude explorer la contribution de la signalisation pro-angiogénique intramyocytaire chez des patients BPCO présentant une altération de l'angiogenèse musculaire induite par le REE. Bien que la régulation cellulaire du PGC1- α soit altérée chez les patients BPCO, nous n'avons pas pu conclure sur l'effet de cette altération sur la voie pro-angiogénique sous-jacente, du fait d'absence de stimulation de cette voie par la SEI chez les CSS. Cependant, la voie alternative impliquant SPP1 et régulant la maturation capillaire durant l'angiogenèse pourrait être altérée dans la BPCO. Cette nouvelle piste mécanistique ouvre la voie à l'étude du rôle de la cellule musculaire dans le défaut de maturation capillaire au cours de l'angiogenèse musculaire des patients BPCO.

Références

1. Singh D, Agusti A, Anzueto A, et al. Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Lung Disease: the GOLD science committee report 2019. *Eur Respir J* 2019;53(5).
2. Jatta K, Eliason G, Portela-Gomes GM, et al. Overexpression of von Hippel-Lindau protein in skeletal muscles of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Pathol* [Internet] 2009 [cited 2016 Mar 9];62(1):70–76. Available from: <http://jcp.bmj.com/cgi/doi/10.1136/jcp.2008.057190>
3. Jobin J, Maltais F, Doyon JF, et al. Chronic obstructive pulmonary disease: Capillarity and fiber-type characteristics of skeletal muscle. *J Cardiopulm Rehabil* [Internet] 1998 [cited 2016 Mar 9];18(6):432–437. Available from: http://journals.lww.com/jcrjournal/Abstract/1998/11000/Chronic_Obstructive_Pulmonary_Disease__Capillarity.5.aspx
4. Whittom F, Jobin J, Simard PM, et al. Histochemical and morphological characteristics of the vastus lateralis muscle in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Med Sci Sports Exerc* [Internet] 1998 [cited 2016 Mar 9];30(10):1467–1474. Available from: <http://europepmc.org/abstract/med/9789845>

5. Eliason G, Abdel-Halim SM, Piehl-Aulin K, Kadi F. Alterations in the muscle-to-capillary interface in patients with different degrees of chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res* [Internet] 2010 [cited 2018 Feb 5];11(1):97. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2912824/>
6. Gouzi F, Maury J, Bughin F, et al. Impaired training-induced adaptation of blood pressure in COPD patients: Implication of the muscle capillary bed. *Int J COPD* 2016;11(1):2349–2357.
7. Gouzi F, Préfaut C, Abdellaoui A, et al. Blunted muscle angiogenic training response in COPD patients versus sedentary controls. *Eur Respir J* 2013
8. Richardson RS, Leek BT, Gavin TP, et al. Reduced mechanical efficiency in chronic obstructive pulmonary disease but normal peak VO₂ with small muscle mass exercise. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet] 2004 [cited 2018 Feb 5];169(1):89–96. Available from: <https://www.atsjournals.org/doi/full/10.1164/rccm.200305-627OC>
9. Spruit MA, Singh SJ, Garvey C, et al. An Official American Thoracic Society/European Respiratory Society Statement: Key Concepts and Advances in Pulmonary Rehabilitation. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet] 2013 [cited 2020 Jun 2];188(8):e13–e64. Available from: <http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/rccm.201309-1634ST>
10. Rowe GC, Raghuram S, Jang C, et al. PGC-1 α induces SPP1 to activate macrophages and orchestrate functional angiogenesis in skeletal muscle. *Circ Res* 2014;115(5):504–517.
11. Arany Z, Foo SY, Ma Y, et al. HIF-independent regulation of VEGF and angiogenesis by the transcriptional coactivator PGC-1 α . *Nature* [Internet] 2008 [cited 2019 Mar 21];451(7181):1008–1012. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature06613>
12. Olfert IM, Howlett RA, Wagner PD, Breen EC. Myocyte vascular endothelial growth factor is required for exercise-induced skeletal muscle angiogenesis. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol* 2010;299(4).
13. Thom R, Rowe GC, Jang C, Safdar A, Arany Z. Hypoxic induction of vascular endothelial growth factor (VEGF) and angiogenesis in muscle by truncated peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator (PGC)-1 α . *J Biol Chem* 2014;289(13):8810–8817.
14. Chinsomboon J, Ruas J, Gupta RK, et al. The transcriptional coactivator PGC-1 α mediates exercise-induced angiogenesis in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci* [Internet] 2009 [cited 2017 Oct 18];106(50):21401–21406. Available from: [http://files/2706/Chinsomboon et al. - The transcriptional coactivator PGC-1 \$\alpha\$ mediates ex.pdf](http://files/2706/Chinsomboon et al. - The transcriptional coactivator PGC-1α mediates ex.pdf)
15. Leick L, Hellsten Y, Fentz J, et al. PGC-1 α mediates exercise-induced skeletal muscle VEGF expression in mice. *Am J Physiol - Endocrinol Metab* 2009;297(1):92–103.
16. Remels AH, Schrauwen P, Broekhuizen R, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor expression is reduced in skeletal muscle in COPD. *Eur Respir J* 2007;30(2):245–252.
17. Pomiès P, Blaquièrre M, Maury J, Mercier J, Gouzi F, Hayot M. Involvement of the FoxO1/MuRF1/Atrogin-1 signaling pathway in the oxidative stress-induced atrophy of cultured chronic obstructive pulmonary disease myotubes. *PLoS One* 2016;11(8):1–21.
18. Pomiès P, Rodriguez J, Blaquièrre M, et al. Reduced myotube diameter, atrophic signalling and elevated oxidative stress in cultured satellite cells from COPD patients. *J Cell Mol Med* [Internet] 2015 [cited 2020 Jun 22];19(1):175–186. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/jcmm.12390>
19. Gouzi F, Blaquièrre M, Catteau M, et al. Oxidative stress regulates autophagy in cultured muscle cells of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Cell Physiol* 2018;233(12):9629–9639.
20. Nikolić N, Görgens SW, Thoresen GH, Aas V, Eckel J, Eckardt K. Electrical pulse stimulation of cultured skeletal muscle cells as a model for in vitro exercise – possibilities and limitations. *Acta Physiol* [Internet] 2017 [cited 2019 Mar 27];220(3):310–331. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/apha.12830>

21. Blervaque L, Pomiès P, Rossi E, Catteau M, Blandinières A. COPD is deleterious for pericytes : implications during training- induced angiogenesis in skeletal muscle. Under Rev
22. Spruit MA, Singh SJ, Garvey C, et al. An official American thoracic society/European respiratory society statement: Key concepts and advances in pulmonary rehabilitation. *Am J Respir Crit Care Med* 2013;188(8):e13-64.
23. Hayot M, Michaud A, Koechlin C, et al. Skeletal muscle microbiopsy: A validation study of a minimally invasive technique. *Eur Respir J [Internet]* 2005 [cited 2018 Aug 2];25(3):431–440. Available from: <http://erj.ersjournals.com/content/25/3/431>
24. Hepple RT, Hogan MC, Stary C, Bebout DE, Mathieu-Costello O, Wagner PD. Structural basis of muscle O₂ diffusing capacity: Evidence from muscle function in situ. *J Appl Physiol [Internet]* 2017;88(2):560–566. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10658023>
25. Caporali A, Meloni M, Nailor A, et al. p75NTR-dependent activation of NF-κB regulates microRNA-503 transcription and pericyte–endothelial crosstalk in diabetes after limb ischaemia. *Nat Commun [Internet]* 2015;6(1):8024. Available from: <http://www.nature.com/articles/ncomms9024>
26. Pomiès P, Blaquièrre M, Maury J, Mercier J, Gouzi F, Hayot M. Involvement of the FoxO1/MuRF1/Atrogin-1 Signaling Pathway in the Oxidative Stress-Induced Atrophy of Cultured Chronic Obstructive Pulmonary Disease Myotubes. *PLoS One [Internet]* 2016 [cited 2020 Jun 22];11(8):e0160092. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0160092>
27. Pinheiro J, Bates D, DebRoy S, Sarkar D. R Development Core Team. 2014. nlme: linear and nonlinear mixed effects models. R package version 3.1-117. R Found Stat Comput Vienna, Austria [Internet] 2014; Available from: <http://cran.r-project.org/package=nlme>
28. Fadini GP, Kreutzenberg S De, Albiero M, et al. Gender differences in endothelial progenitor cells and cardiovascular risk profile: The role of female estrogens. *Arterioscler Thromb Vasc Biol [Internet]* 2008 [cited 2020 Jun 23];28(5):997–1004. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/ATVBAHA.107.159558>
29. Rivard A, Fabre J-E, Silver M, et al. Age-Dependent Impairment of Angiogenesis. *Circulation [Internet]* 1999 [cited 2020 Jun 23];99(1):111–120. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.CIR.99.1.111>
30. Haas TL, Nwadozi E. Regulation of skeletal muscle capillary growth in exercise and disease. *Appl Physiol Nutr Metab [Internet]* 2015 [cited 2018 Jun 28];40(12):1221–1232. Available from: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/apnm-2015-0336>
31. Gagnon P, Lemire BB, Dubé A, Saey D, Porlier A, Croteau M, Provencher S, Debigaré R, Maltais F, P G, BB L, A D, D S, A P, M C, S P, R D, F M, Gagnon P, Lemire BB, Dubé A, Saey D, Porlier A, Croteau M, Provencher S, Debigaré R, Maltais F, P G, BB L, et al. Preserved function and reduced angiogenesis potential of the quadriceps in patients with mild COPD. *Respir Res* 2014;15:1465–9921.
32. Mofarrahi M, Sigala I, Vassilokopoulos T, Harel S, Guo Y, Debigare R, Maltais F, Hussain SNA. Angiogenesis-related factors in skeletal muscles of COPD patients: roles of angiopoietin-2. *J Appl Physiol* 2013;114:1309–1318.
33. Hoier B, Hellsten Y. Exercise-induced capillary growth in human skeletal muscle and the dynamics of VEGF. *Microcirculation [Internet]* 2014 [cited 2017 Jan 17];21(4):301–314. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/www.ezp.biu-montpellier.fr/doi/10.1111/micc.12117/abstract>
34. Egginton S, Zhou AL, Brown MD, Hudlická O. Unorthodox angiogenesis in skeletal muscle. *Cardiovasc Res [Internet]* 2001 [cited 2017 Oct 16];49(3):634–646. Available from: <https://academic.oup.com/circovasces/article/49/3/634/309757/Unorthodox-angiogenesis-in-skeletal-muscle>

35. Hjorth M, Norheim F, Meen AJ, et al. The effect of acute and long-term physical activity on extracellular matrix and serglycin in human skeletal muscle. *Physiol Rep* 2015;3(8):1–19.
36. Raschke S, Eckardt K, Bjørklund Holven K, Jensen J, Eckel J. Identification and Validation of Novel Contraction-Regulated Myokines Released from Primary Human Skeletal Muscle Cells. *PLoS One* [Internet] 2013 [cited 2020 Jun 23];8(4):e62008. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0062008>
37. Lambernd S, Taube A, Schober A, et al. Contractile activity of human skeletal muscle cells prevents insulin resistance by inhibiting pro-inflammatory signalling pathways. *Diabetologia* [Internet] 2012 [cited 2019 Apr 4];55(4):1128–1139. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00125-012-2454-z>
38. Croley AN, Zwetsloot KA, Westerkamp LM, et al. Lower capillarization, VEGF protein, and VEGF mRNA response to acute exercise in the vastus lateralis muscle of aged vs. young women. *J Appl Physiol* [Internet] 2005 [cited 2020 Jun 22];99(5):1872–1879. Available from: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/japplphysiol.00498.2005>
39. Zechner C, Lai L, Zechner JF, et al. Total skeletal muscle PGC-1 deficiency uncouples mitochondrial derangements from fiber type determination and insulin sensitivity. *Cell Metab* [Internet] 2010;12(6):633–642. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2010.11.008>
40. Hoier B, Nordsborg N, Andersen S, et al. Pro- and anti-angiogenic factors in human skeletal muscle in response to acute exercise and training. *J Physiol* [Internet] 2012 [cited 2019 Nov 28];590(3):595–606. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1113/jphysiol.2011.216135>

Etude 4

Protocole d'étude

Understanding the determinants of the impaired response of endothelial function to exercise training in COPD patients.

Léo Blervaque, Amir Benmira, Anne Virsolvy, Gudrun Boge, Gabriela Condurache, Yves Dauvilliers, Nathalie Plouvier, Christophe Hédon, Alain Proust, Magalie Taulan-Cadars, David M Smadja, Nelly Héraud, Jacques Mercier, Olivier Cazorla, Maurice Hayot, Antonia Perez-Martin, Fares Gouzi.

Etude clinique en cours

Etude cDysEndoBPCO - ClinicalTrials.gov : NCT03774238

Présentation de l'étude n°4

Au terme du chapitre 4 de la partie 1, il apparaît que l'altération de la vasoréactivité artérielle (VRA) est une atteinte vasculaire spécifique de la BPCO. Pourtant les facteurs impliqués dans son adaptation au réentraînement à l'effort (REE) restent inconnus chez les patients. Sur un plan cellulaire, différents déterminants et facteurs de réponse à l'entraînement peuvent être évoqués (inflammation, voie de la eNOS, ECFC ...). Ainsi, l'objectif de l'étude sera d'évaluer le rôle de facteurs cliniques, fonctionnels et cellulaires dans la réponse de VRA au REE en comparant les valeurs à l'état de base ainsi que les réponses au REE de ces facteurs entre les patients BPCO répondeurs et non-répondeurs. La mise en place de cette étude et l'inclusion des premiers patients ont été effectuées dans le cadre de cette thèse. Cependant, la pandémie de Covid-19 et les mesures de confinement ont impacté fortement le déroulement de l'étude (sortie d'étude, arrêt des inclusions, ...). Les données recueillies sont donc trop préliminaires pour faire l'objet d'un rapport. Toutefois, comme les travaux liés à cette étude ont monopolisé une part importante de la thèse, nous présentons donc cette étude sous la forme d'un protocole intégrant les problématiques scientifiques, organisationnelles et méthodologiques, selon les standards internationaux en vigueur pour la publication de ce type d'étude. De plus, ce protocole permet de présenter des éléments de faisabilité de cette étude (recrutement, parcours patient, standardisation de l'intervention). En particulier, sur le plan cellulaire, nous présentons des données de faisabilité originales en rapport avec l'utilisation de cellules souches progénitrices endothéliales (cellules endothéliales formant des colonies ou ECFCs) à partir de prélèvements de sang veineux périphérique (fiche technique n°14), pour l'étude des mécanismes cellulaires impliqués dans l'altération de la VRA et sa réponse au REE.

Introduction

La broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) est la 3^{ème} cause de mortalité mondiale. Bien qu'à point de départ pulmonaire, cette pathologie est caractérisée par un risque accru de comorbidités extra-pulmonaires, notamment cardiovasculaires (1). Ces répercussions cardiovasculaires aggravent fortement la sévérité de la maladie et sont responsables d'une proportion importante (~25%) du total des décès de patients BPCO (2). La prise en charge de ces comorbidités passe par un dépistage précoce d'altérations cardiovasculaires pré-cliniques, plus aisément réversibles que les pathologies cardiovasculaires cliniquement identifiées (3). Parmi ces atteintes pré-cliniques, la dysfonction de vasoréactivité artérielle (VRA) est apparue comme particulièrement intéressante. Cet intérêt est notamment lié au fait que la VRA peut être évaluée de manière non invasive et présente un fort pouvoir prédictif d'évènements cardiovasculaires futurs (4).

Physiologiquement, le réentraînement à l'effort (REE) a montré un effet bénéfique sur la VRA. (5) avec des gains maximaux après 4 semaines de REE (6). A l'inverse, après 8 semaines de réentraînement, les changements de VRA n'apparaissent plus significatifs par rapport à la VRA initiale, en raison de l'apparition d'autres adaptations structurelles et biomécaniques de la paroi vasculaire (6). Des gains de VRA de faibles magnitudes (1%) ont été associés à des réductions conséquentes du risque cardiovasculaire (~17%) (5), faisant du REE une stratégie thérapeutique non-médicamenteuse efficace dans la prévention des atteintes cardiovasculaires. Chez les patients BPCO, une dysfonction de VRA est présente et pourrait ainsi constituer une cible de prévention des atteintes cardiovasculaires (7). En particulier, le REE fait partie intégrante du parcours de soins des patients BPCO, intégré dans un programme multidisciplinaire appelé réhabilitation respiratoire (8). En effet, son efficacité sur les différents *outcomes* cliniques et sur la tolérance à l'effort est établie par de nombreuses études (8). Toutefois, l'effet de la réhabilitation respiratoire sur la prévention cardiovasculaire des patients BPCO n'a jamais été étudié. De plus, les études portant sur l'évaluation du REE sur la fonction vasculaire dans la BPCO n'ont pas montré d'effets de ce dernier sur la VRA (9–11). Cependant, cette absence d'effets a été constatée toujours après 8 et non 4 semaines de

REE, sans groupe de sujets sains contrôles ou constatant également une absence d'effets dans ce dernier (10). L'hypothèse d'une évaluation trop tardive pourrait ainsi être avancée. Toutefois, la thèse d'un réel défaut d'adaptation au REE de la VRA n'est pas écartée pour autant, les caractéristiques physiopathologiques de la BPCO pouvant également compromettre la VRA et ses adaptations. Une augmentation de la quantité de cytokines inflammatoires circulantes a été démontrée dans le cadre de la BPCO (12). Or, ces mêmes cytokines ont été impliquées dans des altérations de la VRA sur des anneaux d'artères de rats *ex vivo*, en perturbant, entre autres, la voie de synthèse du monoxyde d'azote (NO) (13–16). D'autre part, le rôle important de cellules souches progénitrices endothéliales circulantes, en particulier des cellules endothéliales formant des colonies (ECFC) dans l'adaptation de la VRA en réponse à un REE a été démontré (17). Or, chez les patients BPCO, ces ECFC sont dysfonctionnelles et sénescents (18). Enfin, certains petits ARNs non-codant et simple brin, nommés micro-ARNs (miARNs), sont sensibles au flux sanguin et jouent un rôle dans la régulation de la VRA, notamment de la production de NO en réponse à un stimulus mécanique (e.g. augmentation des forces de cisaillement) (19) et pourrait médier une partie des relations BPCO/dysfonction de VRA.

Ainsi, nous faisons l'hypothèse que la réponse de la VRA au REE est hétérogène chez les patients BPCO et soumise à de nombreux facteurs de régulation. Dans le cadre d'un REE de 4 semaines, notre objectif sera de comparer différents facteurs cliniques, fonctionnels et cellulaires potentiellement impliqués dans la fonction endothéliale, entre des patients BPCO ayant présenté une réponse préservée de la VRA au REE ($\Delta VRA < \text{médiane de la population incluse dans l'étude}$) et ceux dont la réponse VRA a été altérée ($\Delta VRA > \text{médiane de la population incluse dans l'étude}$).

Matériels et méthodes

Population de l'étude

La population de l'étude sera constituée de patients BPCO répondant aux critères d'inclusion suivants : i/un âge compris entre 35 et 85 ans ; ii/un diagnostic confirmé par spirométrie (rapport VEMS/CV < 0.7) ; iii/une indication de réhabilitation respiratoire. Un consentement

libre et éclairé écrit sera recueilli pour chaque patient et toutes les procédures proposées aux patients seront en accord avec les principes éthiques de la déclaration d'Helsinki applicables à la recherche médicale impliquant des êtres humains ainsi qu'avec les recommandations européennes de bonnes pratiques cliniques. Cette étude a par ailleurs déjà reçu un avis positif du comité de protection des personnes (CPP) Sud Méditerranée IV (2018-A02886-49). Les principaux critères d'exclusion pour cette étude seront : i/ la présence de comorbidités instables ii/ un sujet en période d'exclusion vis-à-vis d'un autre protocole iii/ un majeur protégé par la loi iv/ un sujet participant à un autre protocole de recherche v/ un sujet non-affilié à un régime de sécurité sociale vi/ une femme enceinte ou allaitante vii/ un sujet privé de liberté par décision de justice.

Evaluation des patients

Pour chaque centre, les patients éligibles seront identifiés lors de consultations auprès de leur pneumologue ou lors de screening des bases de données des centres de réhabilitation respiratoire. Les patients éligibles seront contactés par téléphone et, en cas d'accord au terme d'une information orale synthétique, se verront envoyer par courrier la lettre d'information relative à l'étude. Pour chaque patient ayant accepté l'étude lors de ce premier contact, les rendez-vous pour les différents examens médicaux relatifs à l'étude seront réservés et le patient recevra par courrier une convocation officielle aux différents examens. Les examens comprendront 3 visites pré-REE et 3 visites post-REE (Figure 1).

La première visite sera dédiée à l'information du patient et à la signature du consentement, auprès d'investigateurs désignés sur chaque centre. Ces derniers profiteront de cette visite pour vérifier les critères d'inclusion du patient, en réalisant notamment une spirométrie pour confirmer le diagnostic BPCO. Lors de cette première visite comme lors de la quatrième visite, un prélèvement de 86mL de sang veineux périphérique sera effectué puis, après un temps de repos de 30 minutes, une épreuve d'effort maximale incrémentale sera réalisée comme décrit précédemment (8), sur cycloergomètre en respectant une incrémentation de la charge progressive et une durée de 8 à 12 minutes. Seront relevés entre autres les paramètres de tension artérielle au repos et à l'effort, la consommation d'oxygène, la saturation en oxygène, les éventuels événements cardiaques remarquables ainsi que la dyspnée.

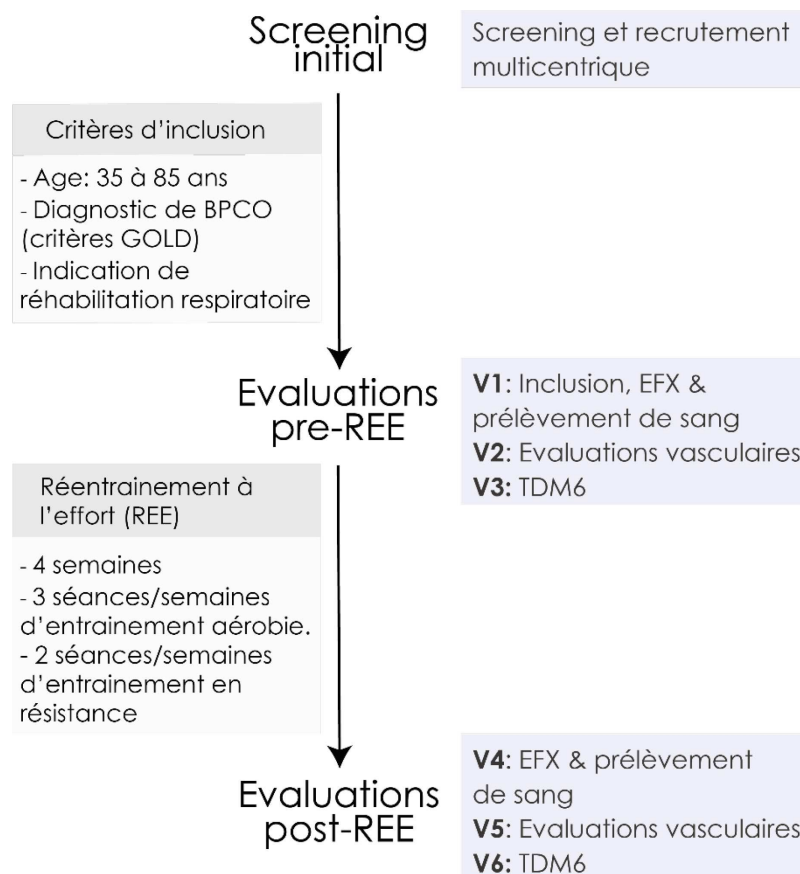


Figure 1. *Design de l'étude.* Répartition des visites (V1 à V6), critères d'inclusion et modalités de l'intervention. REE : Réentraînement à l'effort. EFX : Epreuve d'effort maximale incrémentale. TDM6 : Test de marche de 6 minutes.

La seconde et la cinquième visite seront réalisées par un médecin vasculaire et comporteront une évaluation des pressions artérielles brachiales et à l'orteil (appareil SysToe ; Atys Médical) et une mesure de la vitesse d'onde de pouls (appareil Complior; Alam Medical). Sera également évaluée la VRA par mesure de l'indice d'hyperémie réactive (RHI) digital, mesuré à l'aide de l'appareil EndoPAT2000 (Itamar Medical). Enfin, seulement durant la deuxième visite, des modifications structurales et/ou des flux artériels seront recherchées par échographie/Doppler pour les artères : Iliaque commune, Iliaque externe, Fémorale Commune, Fémorale Superficielle (tiers supérieur), Fémorale Superficielle (tiers inférieur), Poplitée retro-articulaire, Tibiale Postérieure, Tibiale Antérieur-pédieuse, Fibulaire, Carotide commune, Carotide interne et Carotide externe. Seront également relevés l'épaisseur intima-média et le diamètre de l'aorte abdominale. Toutes les évaluations vasculaires seront réalisées chez des patients en position semi-allongée, au repos depuis au moins 30 minutes, à jeun et

n'ayant pas fumé depuis au moins 2 heures. Enfin, une attention sera portée à réaliser les évaluations pré- et post-REE d'un même patient aux mêmes heures de la journée et dans des conditions de médication similaires.

Enfin, les visites 3 et 6 seront dédiées à l'évaluation de la distance au test de marche de 6 minutes, réalisée par un enseignant en activités physiques adaptées, dans un couloir de 30 mètres sans encouragements, en suivant les recommandations (20). Notamment, deux tests seront réalisés pour chaque visite pour limiter au maximum l'effet d'apprentissage.

Les évaluations 1,2 et 3 seront réalisées dans la semaine précédant l'entrée en réhabilitation respiratoire et les visites 4, 5 et 6 dans la semaine suivant les 4 semaines de réhabilitation, à distance d'au moins 48 heures de la dernière séance de REE.

Réentraînement à l'effort (REE)

Dans la semaine suivant les 3 premières visites d'évaluation, les patients BPCO intégreront un centre de réhabilitation respiratoire comprenant, entre autres, un programme de REE de 4 semaines. Pour les besoins de l'étude, ce programme a été harmonisé entre les centres. Le programme de REE comportera 3 séances par semaines d'entraînement en endurance sur cycloergomètre. Ces séances dureront 50 minutes et se baseront, à la suite d'un échauffement, sur la réalisation de 3 blocs d'exercices de 10 minutes ciblant l'intensité du premier seuil ventilatoire, entrecoupés de phases moins intenses de 5 minutes ciblant une intensité de 30% de la puissance maximale aérobie. Les séances seront supervisées par un enseignant en activités physiques adaptées contrôlant le respect de l'intensité d'effort et le bon déroulement de la séance. La charge sera augmentée de manière hebdomadaire, de manière à respecter l'intensité d'effort au regard des progrès accomplis. Deux séances par semaine d'entraînement en résistance viendront compléter ce programme. Ces séances cibleront le travail de 8 à 10 groupes musculaires, et comprendront des séries de 8 répétitions sur 2 séries en début de programme, à 30% de la 1-RM prédite, à l'aide de la méthode de Brzyski (21) (réalisation de 5 à 10 répétitions avec une charge optimale pour le patient puis calcul à l'aide d'équations). L'objectif sera d'augmenter progressivement la charge de travail pour atteindre 12 à 14 répétitions par série à une intensité de 60-70% de la 1-RM lors des dernières séances.

Le REE étant inclus dans un programme de réhabilitation respiratoire, des interventions hebdomadaires d'éducation thérapeutique, de kinésithérapie respiratoire, de soutien psychologique et de sevrage tabagique (si requis) viendront compléter le programme.

Traitement des échantillons sanguins

Un prélèvement de 86 mL de sang veineux périphérique sera réalisé pour chaque patient inclus, avant et après les 4 semaines de REE, lors des visites 1 et 4. Le prélèvement sera collecté dans plusieurs tubes de diverses catégories : des tubes secs (bouchon rouge), héparinés (bouchon vert) ou EDTA (bouchon violet), puis traité de manière spécifique en fonction des analyses prévues (Figure 2). Les tubes héparinés et EDTA seront traités dans les 30 minutes suivant le prélèvement (2 heures pour ceux destinés à l'isolement des ECFC) alors que les tubes secs seront traités dans l'heure suivant le prélèvement, après le respect des 30 minutes de coagulation. Dans l'attente des analyses, tous les échantillons sanguins seront stockés à -80°C et conservés pour une durée de 20 ans maximum, dans le cadre d'une collection de tissus biologiques déclarée (n°DC-2008-594).

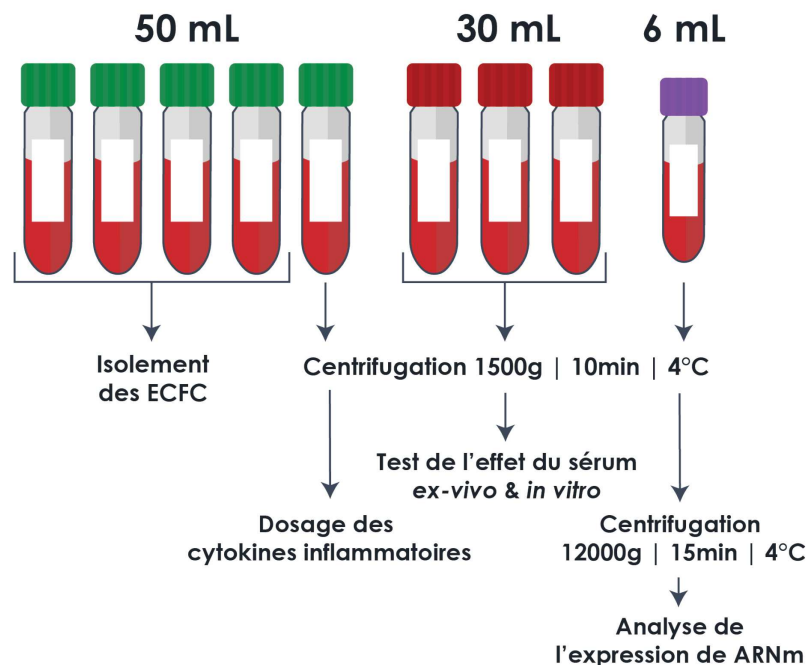


Figure 2. Répartition et traitements des échantillons sanguins.

Isolement et culture des ECFC

L'isolement des ECFC sera effectué à partir de 40mL de sang veineux périphérique total, collecté dans des tubes héparinés, dans les 2 heures suivant le prélèvement. Les cellules mononuclées du sang seront isolées à l'aide d'un gradient de Pancoll puis mises en culture à une densité de 5×10^5 cellules /cm² dans des plaques 6 puits coatées fibronectine, dans du milieu complet EGM2-MV 10%SVF (C-3202 ; Lonza). Les cellules seront cultivées jusqu'à l'apparition de colonies d'ECFC typiques de plus de 50 cellules, dans du milieu EGM2-MV 10%SVF changé tous les 2 jours. Les cellules seront ensuite récupérées, cultivées et utilisées pour des essais de tubulogenèse en Matrigel et de prolifération. L'essai en Matrigel sera conduit dans des plaques 96 puits comprenant 50µL de Matrigel à une concentration de 10mg/mL et 7×10^4 cellules par cm². La formation de tubes sera évaluée en microscopie en contraste de phases après 4h, 6h et 24h de culture. La prolifération sera évaluée par l'intermédiaire du temps de doublement cellulaire, évalué par comptage des cellules sur un intervalle de 72h. Les ARNm et les protéines seront également purifiés à l'aide du kit NucleoSpin RNA/Protein (740933, Machery-Nagel), en suivant les recommandations du fabricant.

Culture et traitement des cellules endothéliales aortiques

Les cellules humaines aortiques issues de sujets sains seront achetées dans le commerce (C-12271 ; PromoCell) et cultivées en suivant les recommandations du fournisseur. Après culture dans du milieu complet EGM2-MV (C-3202 ; Lonza), 5% SVF, jusqu'à 80% de confluence, les cellules seront exposées à 20% de sérum humain BPCO pour 24h, comme décrit précédemment (14). Après 24h de culture, les protéines et ARNm des cellules seront purifiées à l'aide du kit NucleoSpin RNA/Protein (740933, Machery-Nagel), en suivant les recommandations du fabricant.

Analyse de l'expression de la eNOS

La quantité relative de protéines totales isolées à partir des cellules endothéliales aortiques et des ECFC sera dosée après séparation par SDS-PAGE et coloration à l'aide de bleu de Coomassie. Un immunoblotting pour les protéines eNOS (BD biosciences, #61029 ; 1:1000) et

phospho-eNOS Serine 1177 (BD biosciences, #612392 ; 1:1000) sera ensuite réalisé après séparation des protéines par SDS-PAGE et transfert sur des membranes PVDF, en prenant soin de déposer une quantité équivalente de protéines dans chaque puits. L'expression des protéines cibles sera rapportée à l'expression d'une protéine contrôle.

Analyse de l'expression des miARNs

Après collection du sang total dans un tube EDTA, 2 centrifugations successives seront réalisées (Figure 2). 0.75mL de solution dénaturante (TRIzol LS; Invitrogen) sera ajoutée pour chaque 0.25mL de surnageant puis incubée durant 5 minutes. 0.2mL/mL de chloroforme sera ajouté puis incubé 3 minutes avant une centrifugation de 15min, à 12 000g à 4°C. La phase aqueuse contenant les ARN sera récupérée puis mélangée à 0.42 mL d'isopropanol/mL de solution mère. Après une incubation de 10 minutes, une centrifugation de 10 min, à 12 000g et 4°C sera réalisée et le surnageant jeté. Le culot sera de nouveau resuspendu dans 1mL d'éthanol 75%, mélangé puis centrifugé à nouveau 5 minutes à 7500g à 4°C. Le surnageant sera éliminé et le culot dilué dans de l'eau. Enfin, la quantité d'ARN_{totaux} sera dosé à l'aide d'un appareil NanoDrop (Ozyme). La solution d'ARN ainsi obtenue sera traitée au sein de la plateforme Montpellier Genomix (Biocampus Montpellier) où un séquençage des miARNs sera réalisé. Ce dernier permettra d'établir un catalogue des miARNs circulants et de leur variation (en fold-change) en réponse au REE pour chaque groupe (22). Les miARNs présentant des variations importantes sous l'effet de l'entraînement ou entre les groupes seront ensuite analysés par qPCR.

Evaluation de la vasoréactivité ex-vivo

Les analyses de vasoréactivité *ex-vivo* seront conduites sur des segments d'aorte thoracique de rat Wistar mâles de 22 à 25 semaines et anesthésiés à l'aide d'une injection intrapéritonéale de pentobarbital (60mg/kg). Toutes les expériences sur l'animal se feront en accord avec les recommandations concernant l'utilisation et l'éthique relative aux expérimentations animales (NIH, N°.85–23, révisé 1996) et les directives Européennes (2010/63/EU), le tout après approbation par le comité d'éthique en expérimentation animale de Montpellier-Occitanie. Une fois prélevés, les segments artériels seront plongés dans une

solution physiologique saline (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 0.5 mM KH₂PO₄, 0.5 mM Na₂HPO₄, 2.5 mM CaCl₂, 10 mM HEPES and 10 mM glucose, pH : 7.4) puis les parties grasses seront retirées délicatement. Les segments artériels seront recoupés en anneaux de 2 à 3 mm d'épaisseur puis transférés dans un puits (1 anneau par puits de plaque de culture 24 puits) rempli à l'aide de milieu de culture RPMI 1640 supplémenté à 10% avec du sérum de patients BPCO, avant et après REE. Après 6 heures d'incubation, les anneaux seront montés sur un système de crochet en acier et plongés dans une cuve à organe rempli avec 5mL de solution physiologique saline. Une température de 37°C ainsi qu'une constante oxygénation (95% O₂ /5% CO₂) de la solution seront maintenues. Les variations de tensions isométriques développées par l'anneau artériel seront évaluées à l'aide d'un transducteur de force et d'un système IOX (EMKA Technologies). A la suite du montage, un temps d'équilibrage de 60 min sera respecté avant le début de chaque expérience. La contraction des segments artériels sera évaluée à l'aide d'une échelle de concentration de phényléphrine et de chlorure de potassium alors que la capacité de relaxation sera appréciée grâce à l'ajout progressif d'acétylcholine.

Analyse des données

Une fois le recrutement, l'évaluation et le REE de tous les patients effectués, les données des patients BPCO seront réparties en deux groupes, avec comme facteur clivant la médiane de réponse de RHI au REE (Figure 3). Les caractéristiques à l'état de base entre ces deux groupes de patients seront comparées à l'aide de tests T de Student ou U de Mann-Whitney en fonction de l'homoscédasticité et de la normalité des distributions. Les variables catégorielles seront comparées à l'aide de tests Chi². Les différences de variation pré/post REE des différents paramètres recueillis entre les 2 groupes de patients seront comparées à l'aide de modèles linéaires à effets mixtes (23) comprenant comme effets fixes un effet *REE*, un effet *Groupe* et l'interaction de ces 2 facteurs et comme effet aléatoire l'effet *Individu*. Dans l'idée de comprendre les déterminants de la réponse de RHI au REE chez des patients BPCO, cette réponse sera analysée à l'aide d'une analyse corrélacionnelle multivariée comprenant l'ensemble des facteurs identifiés comme potentiellement influents sur cette réponse.

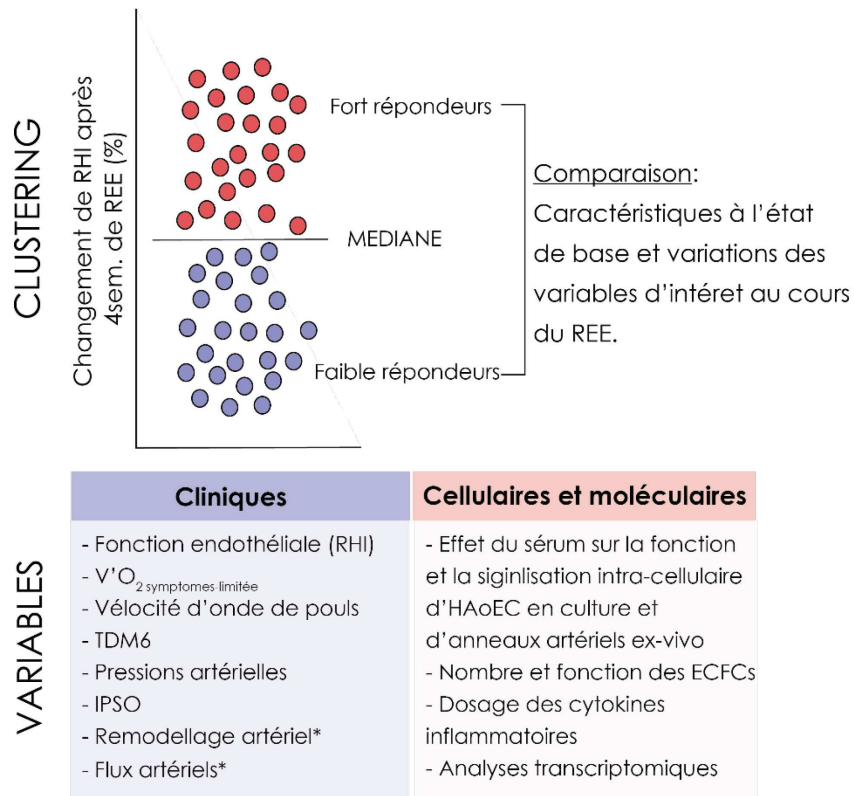


Figure 3. Nature et plan d'analyse des données recueillies. RHI : Indice d'hyperémie réactive. REE : Réentraînement à l'effort. HAoEC : Cellules endothéliales aortiques humaines. TDM6 : Test de marche de 6 minutes. IPSO : Indice de pression systolique à l'orteil. ECFC : Cellules endothéliales formant des colonies. *Variables évaluées uniquement en pré-REE.

Considérations méthodologiques

Design de l'étude

Cette étude clinique a été conçue pour évaluer les déterminants de la réponse de la VRA au REE chez des patients BPCO. Ainsi, nous avons fait le choix de ne pas intégrer de groupe de sujets sains contrôles réentraînés. Ce choix a été fait dans l'idée d'accroître la faisabilité de l'étude tout en ne limitant pas son objectif principal. En effet, si le REE fait partie du parcours de soins des patients BPCO, il requière une organisation importante pour être réalisé chez des sujets sains. Un groupe de sujets sains, réentraîné ou non, pourra être ajouté pour répondre à des questions spécifiques lors d'études ancillaires. Les déterminants de la réponse de VRA

au REE étant multiples et tous d'implication inconnue chez les patients BPCO, nous avons fait le choix d'une étude exploratoire à large spectre qui pourra servir de support à de futures études adressant des contributions de facteurs spécifiques d'une manière plus poussée.

Concernant la constitution des groupes, l'absence de seuil cliniquement significatif connu de changement de RHI ne permet pas de constituer des groupes définis *a priori* sur la base d'un seuil de réponse validé. Nous avons donc choisi une stratégie de constitution de groupe *a posteriori*, sur la base de la médiane de réponse de RHI au REE. Cette stratégie est une approche méthodologique valide dans un contexte d'association entre VRA et ses déterminants ou conséquences (24–26). Elle présente comme avantage l'obtention de deux groupes d'effectifs égaux et permet de réduire le nombre de sujets à inclure dans notre cas, où la proportion de patients BPCO non-répondeurs au REE sur le plan de la VRA est très peu documentée.

Nous avons choisi dans cette étude d'évaluer les sujets après 4 semaines de REE, car il a été montré que cette modalité permettait de détecter les effets les plus importants de changement de VRA. En effet, un REE plus long est connu pour engendrer des bénéfices vasculaires biomécaniques et structurels atténuant les contraintes vasculaires lors de la reperfusion induite durant la mesure du RHI. Le temps de 4 semaines n'étant que le délai de réponse moyen chez le sujet sain, nous avons également intégré la mesure d'un indicateur d'adaptation biomécanique vasculaire : la rigidité artérielle, mesurable *via* la vitesse d'onde de pouls (VOP), pour contrôler les cinétiques individuelles d'adaptation vasculaire. Cela permettra d'orienter nos conclusions, en cas d'effet limité du REE sur la VRA, vers une évaluation trop tardive ou vers une altération réelle de l'adaptation de la VRA.

Concernant le nombre de sujets à inclure dans cette étude, nous avons défini un nombre de sujets *a priori* afin d'identifier une différence significative ($p < 0.05$) de RHI baseline entre nos deux groupes, avec une puissance de 80% et une hypothèse bilatérale. Nous avons fait l'hypothèse d'une taille d'effet de différence entre nos deux groupes répondeurs et non-répondeurs proche de celle que l'on retrouve entre un groupe de sujets sains (en moyenne répondeur) et un groupe de patients BPCO (en moyenne non-répondeur). Une précédente étude présente cette taille d'effet avec une valeur de d de Cohen = 0.84 (27). Considérant

cette taille d'effet, un effectif de 19 sujets par groupe, soit 38 sujets au total est requis. Considérant les perdus de vue, nous avons choisi d'inclure 50 sujets au total.

Evaluation de la VRA

L'évaluation du RHI constitue le critère de jugement principal de notre étude. Plusieurs méthodologies de mesure de la VRA existent, présentant chacune avantages et inconvénients. Notre choix s'est porté sur l'évaluation de la VRA *via* la mesure du RHI à l'aide de l'appareil EndoPAT2000 (28). Cette méthode valide présente le grand avantage d'être très peu-opérateur dépendant et facile à réaliser, à l'inverse de la mesure de vasodilatation médiée par le flux (FMD) par échographie/Doppler. Dans le cadre d'une étude multicentrique à mesures répétées, la comparabilité entre les centres est un élément déterminant et une méthode supportant une réalisation par des opérateurs différents est nécessaire. Notre étude s'attachera à un respect strict de la méthodologie de mesure du RHI utilisée dans l'étude « Framingham Heart Study » (4, 29) qui montre l'association entre le RHI et l'évolution du risque cardiovasculaire et s'assurera de conditions similaires d'évaluations avant et après REE (température, prise médicamenteuse, heure de la journée, etc.).

Le RHI a été montré lors de précédentes études comme une mesure dépendante de l'endothélium (30) et n'apparaissait pas impacté par une contre-mesure à la nitroglycérine (31). De plus, la mesure de RHI présente également l'avantage d'inclure une mesure contrôle du bras-controlatéral permettant de s'affranchir de l'effet de facteurs systémiques indépendants de l'endothélium sur le tonus vasculaire (4, 29). La prise sublinguale de nitroglycérine étant un élément restreignant la faisabilité de l'étude, nous n'avons donc pas intégré cette contre-épreuve dans le protocole. Cependant, chez les patients ayant une réponse de RHI au REE émoussée, un certain nombre de critères secondaires pourront nous aiguiller sur la contribution des altérations de l'endothélium à l'absence de réponse en termes de RHI. Si les altérations de la voie de la eNOS apparaissent comme prédominantes, des investigations plus poussées lors d'études ancillaires seront alors réalisées. Ces investigations pourront intégrer des interventions pharmacologiques à base de nitroglycérine mais également de *N omega-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride* (L-NAME) pour isoler les contributions de l'endothélium et de la voie de la eNOS.

Evaluation de la contribution des ECFC

Dans le cadre de la BPCO, l'exploration des voies de signalisation intra-cellulaires endothéliales systémiques et notamment la voie de la eNOS n'ont, à notre connaissance, jamais été explorées. Le prélèvement de cellules endothéliales artérielles sur des artères humaines est un acte très invasif et difficile à mettre en place dans le cadre d'une étude exploratoire multicentrique. Cependant, comme alternative, le prélèvement d'un sous-type particulier de progéniteurs endothéliaux circulants, les ECFC, permet d'obtenir *in vitro* des colonies de cellules endothéliales matures reproduisant le phénotype physiologique ou pathologique des cellules endothéliales artérielles systémiques. Cette « biopsie liquide » de cellules endothéliales s'effectue à partir de cellules mononuclées obtenues sur un prélèvement de sang veineux périphérique, en suivant une procédure particulière ayant fait l'objet de récentes recommandations d'un comité d'experts (32).

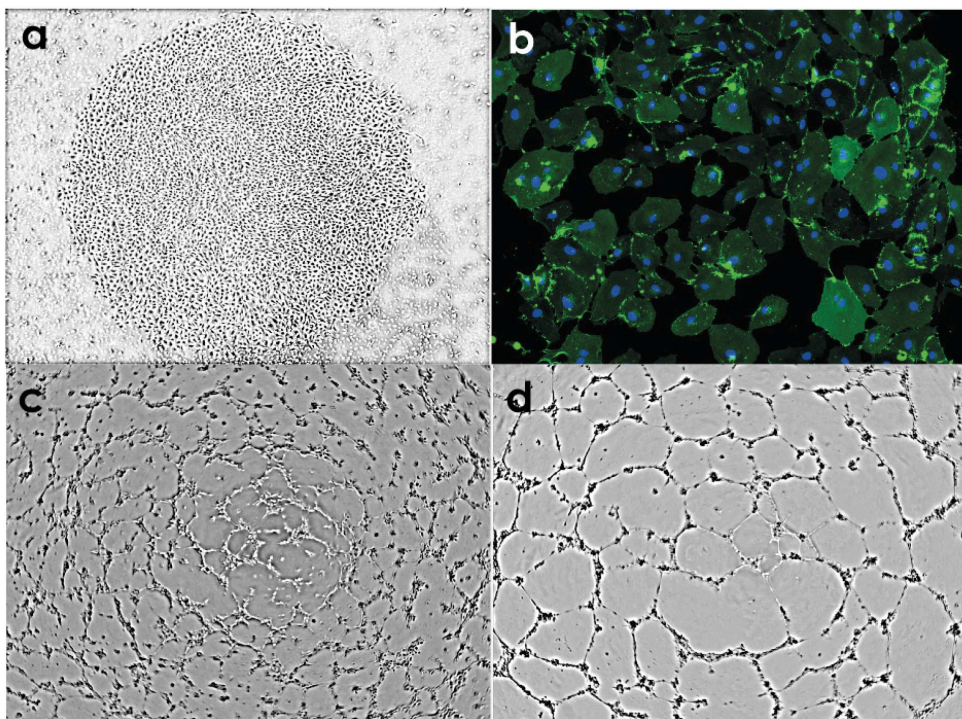


Figure 4. *Expériences préliminaires d'isolement d'ECFC.* a) Colonie d'ECFC typique apparaissant au sein de la culture de cellules mononuclées du sang. b) Marquage immunofluorescent du CD31 d'ECFC en culture. c) d) Essai de tubulogenèse en Matrigel 4 heures (c) et 24 heures (d) après l'initiation de l'expérience.

En suivant cette procédure, nous avons réussi, lors d'expériences préliminaires, à isoler des colonies typiques d'ECFC (Fig4. A) à partir de sang veineux périphérique de patient BPCO et présentant le phénotype endothélial mature (marquage CD31 positif ; Fig4. B) ainsi qu'une fonction cellulaire endothéliale (formation de tubes lors d'essai de tubulogénèse ; Fig4. C & D). Cette technique nous permettra d'explorer l'implication d'éventuelles dysfonctions cellulaires endothéliales dans le défaut de réponse de VRA au REE chez les patients BPCO.

Exploration de la contribution de la voie de la eNOS

L'altération de la voie de la eNOS a été associée à une altération du RHI dans différentes conditions, mais aussi à des défauts de réponse à l'entraînement. Ainsi, la voie de la eNOS constitue une hypothèse mécanistique pour expliquer l'hétérogénéité de la réponse de la VRA au REE dans la BPCO. Pour explorer les altérations possibles de la eNOS nous avons prévu de combiner différentes approches expérimentales.

D'une part, notre approche sera basée sur un dosage de l'expression et de la phosphorylation de la eNOS au sein des ECFC de patients BPCO répondeurs et non-répondeurs au REE. Les ECFC présentent l'avantage d'être représentatifs des altérations endothéliales et constituent une voie peu invasive d'exploration de la fonction et des voies de signalisation de ces cellules (32).

D'autre part, nous exposerons des anneaux artériels aortiques de rats Wistar à du sérum de patients BPCO répondeurs et non répondeurs au REE, afin de tester l'effet des facteurs systémiques sur la vasoréactivité artérielle. Nous rechercherons un effet sur la tension artérielle et sa réponse à des substances vasoactives. L'isolement des réponses NO-dépendantes sera effectué par perfusion conjointe de L-NAME. Cette approche permet de mettre en évidence l'effet du sérum de patients BPCO sur les composantes de la vasoréactivité artérielle et la eNOS en particulier (33, 34). Ces sérums de patients BPCO répondeurs et non répondeurs au REE seront aussi testés sur des cellules endothéliales aortiques humaines saines. En effet, l'utilisation de sérums humains pathologiques permet d'induire *in vitro* des altérations de la voie de la eNOS mimant le phénotype pathologique *in vivo*. Cette approche permet d'autre part d'éviter un biais de sélection de cytokines dans le sérum des patients (14).

Analyse des facteurs inflammatoires et des miARN circulants dans le défaut de réponse à l'entraînement

De nombreux marqueurs inflammatoires ont été impliqués dans les dysfonctions de la cellule endothéliale et l'analyse exhaustive de ces marqueurs n'est pas envisageable dans le cadre d'une étude clinique telle que celle proposée ici. Ainsi, nous avons fait le choix de concentrer les dosages sanguins de l'étude sur des cytokines inflammatoires ayant été directement impliquées dans des altérations de voies cellulaires endothéliales indispensables à l'hyperémie réactive et/ou associées à des altérations de la capacité de vasorelaxation artérielle *ex vivo* ou *in vivo*. Parmi ces cytokines, le facteur de nécrose tumorale (TNF)- α induit un effet délétère direct sur la VRA *in vivo* (13) tout comme une réduction de l'expression de la eNOS *in vitro* (14). La protéine C réactive (CRP) induit une réduction de l'activité et découplage au niveau de la eNOS *in vivo* (35). Enfin, d'autres cytokines comme les interleukines (IL)-1 β et -6 ont été impliquées dans la régulation négative de l'expression de la eNOS, en lien avec la VRA, et constituent donc également des cibles de choix (15, 16). Les cytokines ci-dessus qui présenteront des expressions différentielles entre les groupes « *high-responder* » et « *low-responder* » verront également leurs effets testés *in vitro* sur des cellules endothéliales aortiques humaines en culture primaire. L'analyse des miARN se fera par une méthode d'analyse transcriptomique sans *a priori*. Notre choix s'est porté sur cette méthode car seulement un nombre réduit de miARNs ont été décrits en rapport avec la VRA, et jamais, à notre connaissance, en réponse à l'entraînement à l'effort ou en rapport avec la BPCO. Ainsi, cette approche est cohérente avec la nature exploratoire de notre étude, qui permettra d'établir un catalogue de miARNs impliqués dans le défaut de réponse de la VRA chez des patients BPCO. Sur la base de cette exploration, nous pourrions confirmer par qPCR les dysrégulations les plus importantes observées sur des miARNs jouant un rôle dans la fonction vasculaire. Enfin, une fois la confirmation réalisée, des études fonctionnelles *in vitro* et *in vivo* chez l'animal permettront une réelle compréhension du rôle des miARN dans le défaut d'adaptation de la vasoreactivité artérielle au réentraînement à l'effort chez les patients BPCO.

Conclusion

Nous avons démontré dans cet article que notre étude clinique présente tous les éléments de faisabilité et se base sur un rationnel scientifique clairement identifié. Le design de cette étude exploratoire permettra de mettre en évidence des déterminants potentiels de la réponse de la VRA au REE chez le patient BPCO. Ces résultats pourront servir de base pour de futures études mécanistiques plus ciblées et, à terme, mener à de nouvelles stratégies thérapeutiques tentant de rétablir la réponse de VRA au REE chez les patients BPCO.

Références

1. W. Chen, J. Thomas, M. Sadatsafavi, J. M. FitzGerald, Risk of cardiovascular comorbidity in patients with chronic obstructive pulmonary disease: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Respir. Med.* 3, 631–639 (2015).
2. L. P. McGarvey, M. John, J. A. Anderson, M. Zvarich, R. A. Wise, Ascertainment of cause-specific mortality in COPD: Operations of the TORCH Clinical Endpoint Committee. *Thorax.* 62, 411–415 (2007).
3. C. Thuillez, V. Richard, Targeting endothelial dysfunction in hypertensive subjects. *J. Hum. Hypertens.* 19, S21–S25 (2005).
4. N. M. Hamburg, M. J. Keyes, M. G. Larson, R. S. Vasan, R. Schnabel, M. M. Pryde, G. F. Mitchell, J. Sheffy, J. A. Vita, E. J. Benjamin, Cross-sectional relations of digital vascular function to cardiovascular risk factors in the Framingham heart study. *Circulation.* 117, 2467–2474 (2008).
5. D. J. Green, H. Jones, D. Thijssen, N. T. Cable, G. Atkinson, Flow-mediated dilation and cardiovascular event prediction: Does nitric oxide matter? *Hypertension.* 57, 363–369 (2011).
6. T. M. Tinken, D. H. J. J. Thijssen, M. A. Black, N. T. Cable, D. J. Green, Time course of change in vasodilator function and capacity in response to exercise training in humans. *J. Physiol.* 586, 5003–5012 (2008).
7. A. W. Vaes, M. A. Spruit, J. Theunis, N. Goswami, L. E. Vanfleteren, F. M. E. Franssen, E. F. M. Wouters, P. De Boever, Endothelial function in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review of studies using flow mediated dilatation. *Expert Rev. Respir. Med.* 11, 1021–1031 (2017).
8. M. A. Spruit, S. J. Singh, C. Garvey, R. ZuWallack, L. Nici, C. Rochester, K. Hill, A. E. Holland, S. C. Lareau, W. D.-C. Man, F. Pitta, L. Sewell, J. Raskin, J. Bourbeau, R. Crouch, F. M. E. Franssen, R. Casaburi, J. H. Vercoulen, I. Vogiatzis, R. Gosselink, E. M. Clini, T. W. Effing, F. Maltais, J. van der Palen, T. Troosters, D. J. A. Janssen, E. Collins, J. Garcia-Aymerich, D. Brooks, B. F. Fahy, M. A. Puhan, M. Hoogendoorn, R. Garrod, A. M. W. J. Schols, B. Carlin, R. Benzo, P. Meek, M. Morgan, M. P. M. H. Rutten-van Mölken, A. L. Ries, B. Make, R. S. Goldstein, C. A. Dowson, J. L. Brozek, C. F. Donner, E. F. M. Wouters, An Official American Thoracic Society/European Respiratory Society Statement: Key Concepts and Advances in Pulmonary Rehabilitation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 188, e13–e64 (2013).
9. E. Brønstad, A. E. Tjønnå, Ø. Rognmo, H. Dalen, A. M. Heggli, U. Wisloff, C. B. Ingul, S. Steinshamn, Aerobic exercise training improves right- and left ventricular systolic function in patients with COPD. *COPD J. Chronic Obstr. Pulm. Dis.* 10, 300–306 (2013).
10. J. C. Gelinias, N. C. Lewis, M. I. Harper, B. Melzer, G. Agar, J. D. Rolf, N. D. Eves, Aerobic exercise training does not alter vascular structure and function in chronic obstructive pulmonary disease. *Exp. Physiol.* 102, 1548–1560 (2017).

11. U. W. Iepsen, G. D. W. Munch, M. Rugbjerg, A. R. Rinnov, M. Zacho, S. P. Mortensen, N. H. Secher, T. Ringbaek, B. K. Pedersen, Y. Hellsten, P. Lange, P. Thaning, Effect of endurance versus resistance training on quadriceps muscle dysfunction in COPD: A pilot study. *Int. J. COPD*. 11, 2659–2669 (2016).
12. V. Pinto-Plata, C. Casanova, H. Müllerova, J. P. de Torres, H. Corado, N. Varo, E. Cordoba, S. Zeineldine, H. Paz, R. Baz, M. Divo, F. Cortopassi, B. R. Celli, Inflammatory and repair serum biomarker pattern. Association to clinical outcomes in COPD. *Respir. Res.* 13, 71 (2012).
13. C. Rask-Madsen, H. Domínguez, N. Ihlemann, T. Hermann, L. Køber, C. Torp-Pedersen, Tumor Necrosis Factor- α Inhibits Insulin's Stimulating Effect on Glucose Uptake and Endothelium-Dependent Vasodilation in Humans. *Circulation*. 108, 1815–1821 (2003).
14. L. Agnoletti, S. Curello, T. Bachetti, F. Malacarne, G. Gaia, L. Comini, M. Volterrani, P. Bonetti, G. Parrinello, M. Cadei, P. G. Grigolato, R. Ferrari, Serum From Patients With Severe Heart Failure Downregulates eNOS and Is Proapoptotic. *Circulation*. 100, 1983–1991 (1999).
15. K. Bhagat, P. Vallance, Inflammatory Cytokines Impair Endothelium-Dependent Dilatation in Human Veins In Vivo. *Circulation*. 96, 3042–3047 (1997).
16. Y. Kawasaki, E. Yokobayashi, K. Sakamoto, E. Tenma, H. Takaki, Y. Chiba, T. Otashiro, M. Ishihara, S. Yonezawa, A. Sugiyama, Y. Natori, Angiostatin prevents IL-1 β -induced down-regulation of eNOS expression by inhibiting the NF- κ B cascade. *J. Pharmacol. Sci.* 129, 200–204 (2015).
17. S. Steiner, A. Niessner, S. Ziegler, B. Richter, D. Seidinger, J. Pleiner, M. Penka, M. Wolzt, K. Huber, J. Wojta, E. Minar, C. W. Kopp, Endurance training increases the number of endothelial progenitor cells in patients with cardiovascular risk and coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 181, 305–310 (2005).
18. K. E. Paschalaki, R. D. Starke, Y. Hu, N. Mercado, A. Margariti, V. G. Gorgoulis, A. M. Randi, P. J. Barnes, Dysfunction of endothelial progenitor cells from smokers and chronic obstructive pulmonary disease patients due to increased dna damage and senescence. *Stem Cells*. 31, 2813–2826 (2013).
19. S. Kumar, C. W. Kim, R. D. Simmons, H. Jo, Role of flow-sensitive microRNAs in endothelial dysfunction and atherosclerosis mechanosensitive athero-miRs. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 34, 2206–2216 (2014).
20. ATS statement: guidelines for the six-minute walk test. - PubMed - NCBI, (available at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12091180>).
21. M. Brzycki, Strength Testing—Predicting a One-Rep Max from Reps-to-Fatigue. *J. Phys. Educ. Recreat. Danc.* 64, 88–90 (1993).
22. V. Viart, A. Bergougnoux, J. Bonini, J. Varilh, R. Chiron, O. Tabary, N. Molinari, M. Claustres, M. Taulan-Cadars, Transcription factors and miRNAs that regulate fetal to adult CFTR expression change are new targets for cystic fibrosis. *Eur. Respir. J.* 45, 116–128 (2015).
23. J. Pinheiro, D. Bates, S. DebRoy, D. Sarkar, R Development Core Team. 2014. nlme: linear and nonlinear mixed effects models. R package version 3.1-117. R Found. Stat. Comput. Vienna, Austria (2014) (available at <http://cran.r-project.org/package=nlme>).
24. J. Yeboah, J. R. Crouse, F. C. Hsu, G. L. Burke, D. M. Herrington, Brachial flow-mediated dilation predicts incident cardiovascular events in older adults: The cardiovascular health study. *Circulation*. 115, 2390–2397 (2007).
25. M. Shechter, A. Shechter, N. Koren-Morag, M. S. Feinberg, L. Hirsch, Usefulness of brachial artery flow-mediated dilation to predict long-term cardiovascular events in subjects without heart disease. *Am. J. Cardiol.* 113, 162–167 (2014).
26. M. Shechter, A. Issachar, I. Marai, N. Koren-Morag, D. Freinark, Y. Shahar, A. Shechter, M. S. Feinberg, Long-term association of brachial artery flow-mediated vasodilation and cardiovascular events in middle-aged subjects with no apparent heart disease. *Int. J. Cardiol.* 134, 52–58 (2009).
27. P. Rodriguez-Miguel, J. Gregg, N. Seigler, L. Bass, J. Thomas, J. S. Pollock, J. C. Sullivan, T. A. Dillard, R. A. Harris, Acute Tetrahydrobiopterin Improves Endothelial Function in Patients With COPD. *Chest*. 154, 597–606 (2018).

28. N. M. Hamburg, E. J. Benjamin, Assessment of endothelial function using digital pulse amplitude tonometry (2009), doi:10.1016/j.tcm.2009.03.001.
29. N. M. Hamburg, J. Palmisano, M. G. Larson, L. M. Sullivan, B. T. Lehman, R. S. Vasan, D. Levy, G. F. Mitchell, J. A. Vita, E. J. Benjamin, Relation of brachial and digital measures of vascular function in the community: The framingham heart study. *Hypertension*. 57, 390–396 (2011).
30. A. Nohria, M. Gerhard-Herman, M. A. Creager, S. Hurley, D. Mitra, P. Ganz, Role of nitric oxide in the regulation of digital pulse volume amplitude in humans. *J. Appl. Physiol.* 101, 545–548 (2006).
31. P. O. Bonetti, G. M. Pumper, S. T. Higano, D. R. Holmes, J. T. Kuvin, A. Lerman, Noninvasive identification of patients with early coronary atherosclerosis by assessment of digital reactive hyperemia. *J. Am. Coll. Cardiol.* 44, 2137–2141 (2004).
32. D. M. Smadja, J. M. Melero-Martin, J. Eikenboom, M. Bowman, F. Sabatier, A. M. Randi, Standardization of methods to quantify and culture endothelial colony-forming cells derived from peripheral blood: Position paper from the International Society on Thrombosis and Haemostasis SSC. *J. Thromb. Haemost.* 17, 1190–1194 (2019).
33. S. Asano, G. C. O’Connell, K. C. Lemaster, E. R. DeVallance, K. W. Branyan, J. W. Simpkins, J. C. Frisbee, T. L. Barr, P. D. Chantler, Circulating leucocytes perpetuate stroke-induced aortic dysfunction. *Exp. Physiol.* 102, 1321–1331 (2017).
34. G. Baños, K. Carvajal, G. Cardoso, J. Zamora, M. Franco, Vascular reactivity and effect of serum in a rat model of hypertriglyceridemia and hypertension. *Am. J. Hypertens.* 10, 379–388 (1997).
35. T. W. Hein, U. Singh, J. Vasquez-Vivar, S. Devaraj, L. Kuo, I. Jialal, Human C-reactive protein induces endothelial dysfunction and uncoupling of eNOS in vivo. *Atherosclerosis*. 206, 61–68 (2009).

Discussion générale

Nos travaux de thèse ont exploré les défauts d'adaptation vasculaire au réentraînement à l'effort (REE) chez les patients BPCO. Deux études cliniques ont permis de mettre en évidence un mécanisme pathologique inédit dans le cadre de la BPCO : une atteinte au niveau des péricytes des capillaires sanguins musculaires. Cette atteinte est caractérisée par une incapacité d'adaptation de la couverture péricytaire suite à un REE. Cette altération s'ajoute aux autres défauts d'adaptation vasculaire au REE précédemment constatés chez le patient BPCO. L'étude cellulaire quant à elle a permis de mettre en évidence une altération des capacités de surexpression du PGC1- α en réponse à un stimulus mimant l'exercice en endurance dans les myotubes provenant de patients BPCO. Bien que nous n'ayons pas été en mesure de conclure sur une altération des voies musculaires classiques de stimulation de l'angiogenèse musculaire (VEGF-A), nous avons pu mettre en évidence une possible altération de la capacité d'orchestration de la maturation capillaire par le muscle (voie SPP1). Enfin, nous avons établi le rationnel scientifique, la démarche expérimentale et organisationnelle d'une nouvelle étude clinique dont les résultats permettront de mieux comprendre les défauts de réponse de la vasoréactivité artérielle au REE chez les patients BPCO.

La réponse angiogénique musculaire dans la BPCO est indépendante de l'intensité et de la durée du réentraînement à l'effort.

Les deux études cliniques dont les résultats sont présentés dans cette thèse (étude 1 et 2), présentaient le même design général : la comparaison de l'évolution de paramètres fonctionnels et musculaires, mesurés à l'aide de biopsies musculaires, sous l'effet d'un REE entre patients BPCO et contrôles sains sédentaires (CSS). Une première observation est que dans les études 1 et 2, tout comme dans une précédente étude menée par notre équipe (Gouzi et al., 2013), les patients BPCO présentaient un gain significatif de capacités fonctionnelles et de tolérance à l'effort mais significativement moindres comparé aux CSS.

Dans l'étude 1, les patients BPCO étaient réentraînés durant 6 semaines, à une intensité de REE correspondant au premier seuil ventilatoire. Cette intensité a été montrée comme optimale dans le REE des sujets BPCO en pratique clinique, permettant un REE personnalisé

(Vallet et al., 1997b). Cependant, il a été montré précédemment que le premier seuil ventilatoire apparaît plus précocement avec l'élévation de l'intensité chez des patients BPCO comparé à des sujets sains (Gouzi et al., 2013). Ainsi, lors d'études adoptant cette intensité comme cible de REE, l'intensité du REE exprimée en intensité absolue ($\text{mL}/\text{min}/\text{kg}$ de $V'O_2$) se retrouve par conséquent inférieure chez les patients BPCO comparé aux CSS. La charge de travail étant plus faible, il apparaît ainsi difficile de conclure à une réelle altération pathologique de la capacité d'adaptation des paramètres de tolérance à l'effort, laissant suspecter une simple différence de protocole de REE. D'autre part, l'altération des capacités fonctionnelles après 6 semaines de REE n'exclue pas la présence d'un délai plus important d'adaptation chez les patients BPCO, corrigible en augmentant simplement la durée de REE et ne témoignant pas de fait d'une atteinte physiopathologique intrinsèque systématique. Ces questions d'intensité et de durée apparaissaient donc comme des freins importants dans notre capacité à conclure sur la contribution d'une atteinte musculaire intrinsèque dans l'altération de la réponse fonctionnelle et musculaire au REE chez les patients BPCO.

Pour tenter de s'affranchir de ces questions d'intensité et de durée, l'étude 2 a intégré 10 semaines de REE, avec une évaluation intermédiaire de tous les paramètres à 5 semaines. De plus, deux groupes de patients BPCO étaient constitués, de manière randomisée et en double aveugle, l'un étant réentraîné à la même intensité relative que les CSS (en % de $V'O_{2\text{max}}$) alors que le second était réentraîné à la même intensité absolue (en $\text{ml}/\text{min}/\text{kg}$ de $V'O_2$). Au terme de cette étude, nous avons pu voir que les patients BPCO présentaient une réponse en termes d'endurance musculaire et d'adaptation du premier seuil ventilatoire significativement plus faible que les CSS. Fait intéressant, l'adaptation de ce paramètre était similaire entre les deux groupes d'intensité de patients BPCO et persistait malgré la poursuite du REE jusqu'à 10 semaines. Ainsi, l'émoussement des capacités d'adaptation des paramètres fonctionnels sous l'effet du REE chez les patients BPCO de cette étude ne semblait pas être la conséquence de modalités de REE inadaptées en termes d'intensité ou de durée mais de perturbations intrinsèques, liées à la pathologie elle-même. L'endurance du quadriceps était évaluée de manière isolée, n'engendrant que de faibles sollicitations des paramètres cardiorespiratoires. Or, la capacité d'adaptation de cette dernière était également émoussée chez les patients BPCO, laissant ainsi suspecter une localisation musculaire des altérations intrinsèques.

L'atteinte capillaire dans la BPCO est fonction de la sévérité de la maladie.

Dans le muscle, la capacité oxydative des fibres musculaires, dont dépendent en grande partie l'endurance et la $V'O_2$, est dépendante de l'apport et de la diffusion de l'oxygène au niveau musculaire (Broxterman et al., 2020). Ces deux paramètres apparaissent intimement liés à la qualité et la densité du réseau de capillaires sanguins musculaires (Hepple et al., 2017; Richardson et al., 1995). Ainsi, nous avons testé dans les études 1 et 2 si l'altération de la capacité d'adaptation fonctionnelle au REE des patients BPCO était liée à une angiogenèse musculaire émoussée. De manière surprenante, nous avons trouvé que la capacité angiogénique musculaire des patients BPCO était altérée dans l'étude 1 mais pas dans l'étude 2. Cette discordance apparente peut être attribuée à une différence de population de l'étude. En effet, alors que l'étude 1 a inclus une majorité de patients BPCO sévères et présentant une désaturation artérielle en O_2 au repos pour 50% d'entre eux, l'étude 2 a inclus une majorité de patients de sévérité légère, dont aucun ne présentait d'anomalies de saturation artérielle en O_2 . Dans la littérature, différents travaux ont montré que contrairement aux patients BPCO les plus sévères qui présentent une raréfaction capillaire musculaire, les patients BPCO légers avaient une capillarisation musculaire à l'état de base préservée (Eliason et al., 2010; Jatta et al., 2009). D'autre part, une étude a mis en évidence un émoussement de la réponse angiogénique musculaire chez les patients BPCO hypoxémiques comparé à des patients normoxémiques (Costes et al., 2015). Au vu de ces éléments, nos études n°1 & 2, plaident en faveur du caractère tardif de l'émoussement de la réponse angiogénique musculaire induite par le REE dans la BPCO, se manifestant préférentiellement chez les patients BPCO sévères et hypoxémiques.

Dans le contexte de l'étude 2 incluant des patients légers à modérés et non hypoxémiques, nous avons recherché des atteintes plus précoces de la capillarisation musculaire et de l'angiogenèse. Etant donné qu'une dysfonction au niveau des péricytes précède la régression capillaire (Hammes et al., 2011), nous avons recherché chez les patients des études 1 & 2 des anomalies au niveau des péricytes, qui apparaissent plus sensibles au stress oxydant et à l'inflammation que les cellules endothéliales (Shojaee et al., 1999). De manière intéressante, des anomalies de couverture péricytaire des capillaires sanguins musculaires durant l'angiogenèse induite par le REE apparaissaient chez les patients BPCO de l'étude 2, pourtant

moins sévères et non-hypoxémiques. Cet élément confirme la nature précoce des atteintes péri-cytaires qui apparaissent chez des patients ne présentant pas d'anomalies de croissance du lit capillaire sous l'effet du réentraînement à l'effort. Fait intéressant, nous avons également trouvé chez les patients de l'étude 1 des anomalies d'interaction entre péricytes et capillaires, complétant ainsi le tableau des atteintes capillaires chez les patients BPCO sévères et hypoxémiques, caractérisées par une raréfaction capillaire (Blervaque et al., 2019; Eliason et al., 2010; Gouzi et al., 2013; Jatta et al., 2009; Jobin et al., 1998), une angiogenèse émoussée (Blervaque et al., 2019; Gouzi et al., 2013) mais également une anomalie d'interactions endothélium/péricytes. L'atteinte des péricytes est ainsi une caractéristique pathologique de la BPCO inédite et indépendante, touchant non pas la croissance du lit capillaire mais la phase tardive d'angiogenèse musculaire.

En résumé, les patients BPCO sévères présenteraient un défaut de croissance en plus d'un défaut de maturation du lit capillaire à l'inverse des patients moins sévères. Une anomalie spécifique aux patients les plus sévères altère donc probablement la croissance du lit capillaire. Dans l'étude n°1, nous avons pu observer de manière indirecte une réduction de la prolifération cellulaire endothéliale au cours du réentraînement à l'effort chez le patient BPCO. Or, cette prolifération est requise pour le bourgeonnement capillaire. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ce défaut: Premièrement, la quantité de facteurs circulants délétères augmentant avec la sévérité de la maladie (Pinto-Plata et al., 2012), il est donc possible que ces facteurs ne perturbent plus seulement les péricytes, très sensibles, mais également les cellules endothéliales et limitent ainsi la croissance capillaire. D'autre part, les patients BPCO sévères étant plus fréquemment hypoxémiques, l'hypoxie chronique pourrait limiter la réponse angiogénique musculaire, comme cela a précédemment été montré chez l'animal (Olfert et al., 2001).

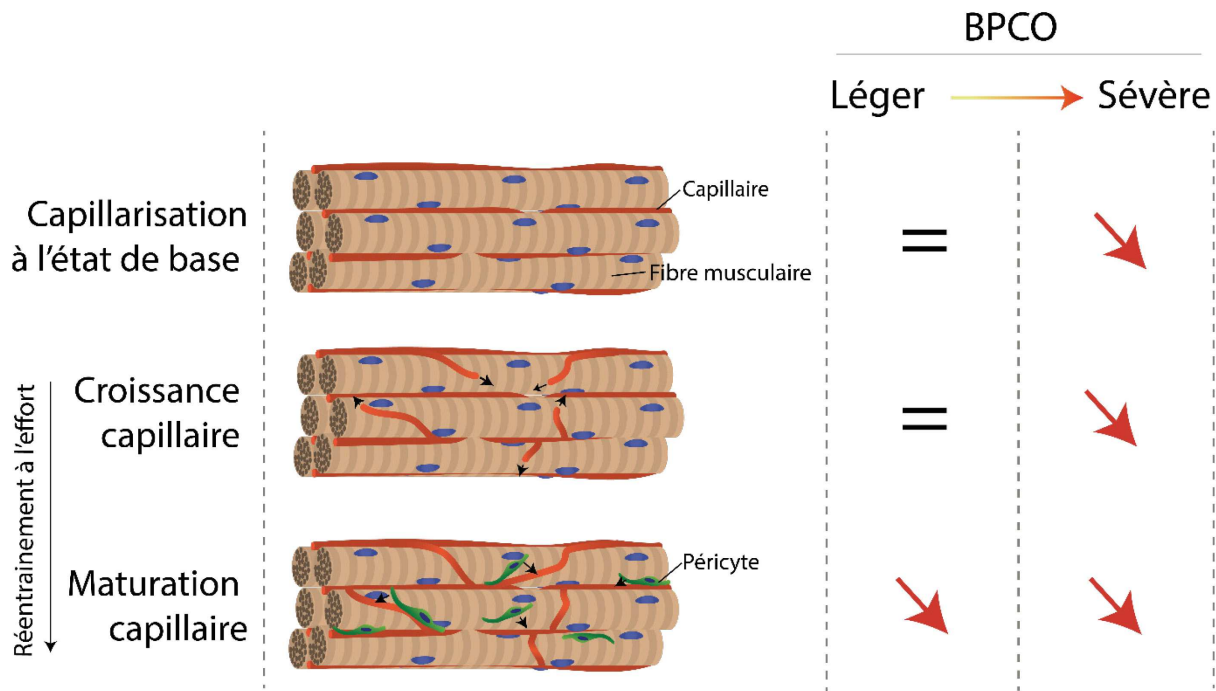


Schéma de synthèse des atteintes capillaires à l'état de base et lors de l'angiogenèse musculaire induite par le réentraînement à l'effort observée dans ce travail chez le patient BPCO. = : Similaire aux sujets sains contrôlés ; ↘ : Réduit par rapport aux sujets sains contrôlés.

Impact du défaut de couverture péricytaire capillaire au cours de l'angiogenèse dans la BPCO.

Au vu des résultats d'angiogenèse et de fonction musculaire des études 1 et 2, l'hypothèse de répercussions directes du défaut de péricyte sur la fonction musculaire, indépendamment du nombre de capillaires sanguins, doit être discutée. Ce rôle a très peu été exploré, bien que certaines équipes se questionnent depuis peu sur le rôle des péricytes musculaires dans le couplage vasculo-métabolique dans le muscle (Attrill et al., 2019). En effet, le rôle vasoactif des péricytes a été prouvé dans d'autres organes comme le cerveau ou le pancréas (Almaça et al., 2018; Kisler et al., 2017) et une inhibition spécifique de ce rôle a été associée à une perturbation de la fonction de ces organes, notamment par défaut d'apport suffisant d'oxygène. Dans le muscle squelettique, ce rôle n'est que très peu évoqué malgré de récentes preuves montrant un rôle vasoactif des péricytes au niveau musculaire (Heinze et al., 2014; Methner et al., 2019; Špiranec et al., 2018). Un des arguments des détracteurs du rôle

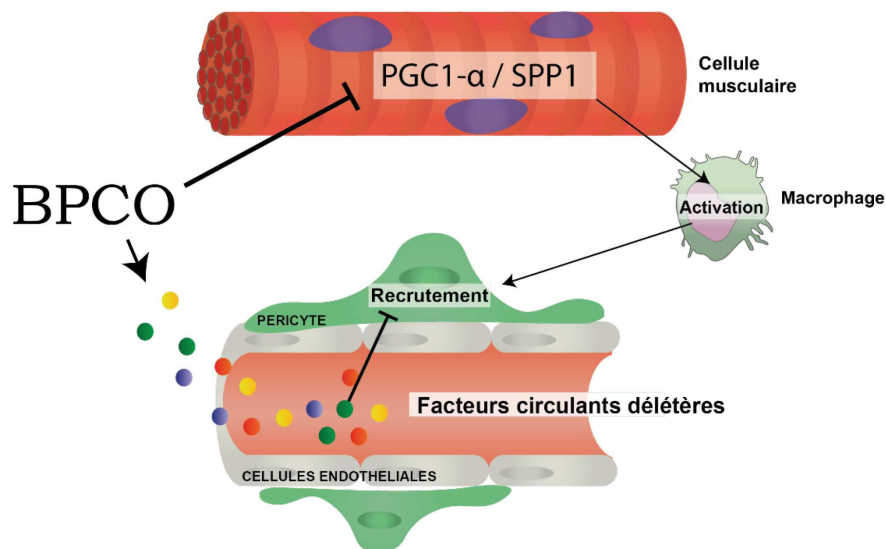
vasoactif des péricytes est que, lors de leurs études, ces derniers ne retrouvent pas d'expression d' α -SMA au niveau capillaire (Hill et al., 2015). Cependant, cette absence de visualisation de l' α -SMA au niveau capillaire pourrait être liée à la techniques de fixation des tissus (Alarcon-Martinez et al., 2018). Dans l'étude 2, en utilisant une fixation des tissus par le froid, nous avons été en mesure de détecter une expression d' α -SMA au niveau capillaire, présente par ailleurs dans une grande majorité des péricytes musculaires NG2-positifs. Ainsi, notre étude confirme les études qui supportent le rôle vasoactif des péricytes dans le muscle. Ainsi, en perturbant l'apport sanguin musculaire, le défaut de couverture péricytaire pourrait expliquer les défauts d'adaptation de la consommation musculaire d'oxygène ($V'O_2$)(Richardson et al., 1995) et de l'endurance musculaire, retrouvés chez les patients BPCO de l'étude 2. Par ailleurs, le muscle squelettique compte pour une grande part de la captation de glucose systémique et cette captation repose sur la régulation du flux sanguin. Ainsi, la perte de péricytes pourrait également participer à l'insulino-résistance, comme proposé précédemment (Laakso et al., 1990). Enfin, les péricytes musculaires jouent un rôle essentiel dans la régulation de la pression artérielle, en étant la cible de substances vasodilatatrices et en se relaxant pour réduire les résistances vasculaires périphériques (Špiranec et al., 2018), très importantes au niveau musculaire. Or, de précédentes études ont montré que la réduction de la pression artérielle attendue chez les personnes hypertendues sous l'effet de l'entraînement ne se faisait pas chez les patients BPCO (Canavan et al., 2015; Gouzi et al., 2016b). Nos résultats permettent de faire l'hypothèse que ce défaut de réduction de la pression artérielle chez les patients BPCO pourrait être la conséquence d'anomalie de couverture péricytaire des capillaires au cours du REE. Etant donné que l'hypertension artérielle apparait comme une comorbidité de premier plan chez les patients BPCO (Vanfleteren et al., 2013a), l'exploration de cette nouvelle piste de recherche apparait cliniquement pertinente.

Défaut de couverture péricytaire dans la BPCO, les causes probables.

Dans l'étude 1, nous avons trouvé que les patients BPCO présentaient un niveau de stress oxydant circulant augmenté, comme cela a été précédemment mis en évidence chez ces patients (Pinto-Plata et al., 2012). Ce niveau corrélait avec les altérations au niveau des interactions péricyte/capillaire. De précédentes études ont par ailleurs démontré

expérimentalement que le stress oxydant pouvait causer un détachement des péricytes (Tsai et al., 2009). Dans l'étude 2, nous avons apporté une démonstration expérimentale causale du lien entre facteurs circulants et altérations péricytaire dans la BPCO, en montrant que le sérum de patients BPCO abolissait la différenciation des cellules mésenchymales - précurseurs péricytaire- en péricytes, dans un modèle de co-culture *in vitro* avec des précurseurs endothéliaux. Cette différenciation est induite physiologiquement par l'interaction entre précurseurs péricytaire et cellules endothéliales. Ces résultats vont dans le sens d'une origine systémique des défauts de couverture péricytaire trouvés chez les patients BPCO. Au total, ces résultats nous permettent de proposer le stress oxydant circulant comme une piste potentielle d'explication du défaut de couverture péricytaire chez les patients BPCO.

D'autre part, l'inflammation joue un rôle important dans la physiopathologie de la BPCO, au niveau pulmonaire comme systémique. Ses niveaux sont augmentés au niveau circulant dans la BPCO et cette inflammation systémique a été impliquée dans l'altération des interactions péricytes/capillaires (Zeng et al., 2016). Cependant, le rôle de l'inflammation tout comme du stress oxydant comme médiateurs de l'effet délétère de facteurs circulants de la BPCO sur les interactions péricyte/capillaire reste à démontrer.



Proposition de mécanismes explicatifs du défaut de couverture péricytaire sous l'effet de la BPCO à la suite de ces travaux de thèse.

Dans l'étude 3, nous avons mis en évidence qu'une réduction de la couverture péricytaire musculaire pouvait être associée à une diminution de l'expression de SPP1 au niveau des myotubes BPCO. Dans cette étude, bien que le défaut de PGC1- α fasse évoquer des anomalies menant à la production de VEGF-A, nous n'avons pas été en mesure de conclure sur cet effet, du fait de réponses inattendues des cellules dérivées du muscle de CSS à la stimulation. En revanche, les résultats obtenus ont permis de formuler de nouvelles hypothèses quant au rôle du SPP1 musculaire. Cette observation fait écho à de précédentes études montrant qu'une inhibition de l'expression de SPP1 dans le muscle mène à l'obtention de capillaires immatures et peu couverts par les péricytes post-angiogenèse musculaire (Rowe et al., 2014). Bien que ce lien doive être confirmé par de plus amples expérimentations, il semblerait que des défauts de la cellule musculaire puissent être impliqués dans les défauts de couverture péricytaires retrouvés chez les patients BPCO, s'ajoutant aux troubles engendrés par les facteurs circulants.

Hétérogénéité de la réponse au REE de la vasoréactivité artérielle dans la BPCO, vers la mise en évidence de déterminants.

Les études n°1 et 2 ont suggéré que des facteurs circulants, tels que le stress oxydant et l'inflammation, seraient en mesure de perturber les adaptations microvasculaires au REE chez les patients BPCO. Il est ainsi possible qu'il en soit de même pour les adaptations macrovasculaires, l'endothélium étant un dénominateur commun de ces deux lits vasculaires. C'est sur la base de cette hypothèse de travail que nous avons construit l'étude 4, ayant pour but de comprendre les déterminants de la réponse de VRA sous l'effet du REE chez les patients BPCO. Malheureusement, la crise sanitaire engendrée par l'épidémie de COVID-19 nous a contraints à suspendre temporairement cette étude, nous empêchant d'en présenter les premiers résultats comme prévu initialement. Cependant, sur la base des inclusions déjà réalisées, nous sommes en mesure de confirmer la faisabilité de cette étude qui, une fois conduite à terme, permettra de répondre aux questions posées. Notamment, nous sommes en mesure d'adresser le rôle des ECFC dans cette réponse, du fait de l'isolement réussi de ces cellules chez les premiers patients inclus. Cet isolement a été réalisé en suivant rigoureusement les protocoles de standardisation récemment publiés concernant l'étude de ces cellules (Smadja et al., 2019). Cela nous a permis d'obtenir des critères de qualité de

l'isolement de ces cellules proches de ceux trouvés dans la littérature. Nous avons ainsi trouvé que les cultures de cellules mononuclées du sang donnaient lieu à l'apparition de colonies d'ECFC d'un aspect circulaire caractéristique et composées d'au moins 50 cellules et ce, chez 67% des sujets, proches des 70% de réussites attendus (Smadja et al., 2019). Le temps d'apparition des colonies était lui aussi standard, avec des colonies apparaissant entre 8 et 22 jours. Le phénotype endothélial des cellules dérivées de ces colonies a été confirmé à l'aide de marquages immunohistochimiques mais également de tests de fonction cellulaire, *via* la capacité de tubulogenèse *in vitro* (Smadja et al., 2019). En intégrant des méthodologies expérimentales telles que celle-ci, cette étude permettra une approche novatrice dans l'exploration des défauts de VRA chez le patient BPCO et pourra servir de base pour les futures études dans ce champ où malheureusement peu d'hypothèses ont été explorées.

Conclusion et perspectives

Les travaux réalisés durant cette thèse ont permis quelques avancées originales dans la compréhension du défaut d'angiogenèse musculaire au cours du REE chez les patients BPCO. Nous avons notamment montré que l'intensité et la durée de réentraînement à l'effort n'étaient pas des facteurs pouvant expliquer ce défaut. De plus, nous avons pu établir une distinction entre les atteintes capillaires des patients BPCO sévères et de ceux présentant une atteinte plus légère. Enfin, nous avons mis en évidence une altération de la couverture péricytaire des capillaires sanguins musculaires durant l'angiogenèse chez ces patients, altération inédite dans le cadre la BPCO et touchant toutes les classes de sévérité de patient. Les causes de ces atteintes apparaissaient principalement liées aux facteurs circulants délétères de la BPCO et/ou à des défauts intrinsèques de la cellule musculaire squelettique.

Toutefois, de futures études complémentaires sont nécessaires pour obtenir un niveau de preuve scientifique suffisant et répondre de manière plus précise aux hypothèses présentées dans la partie 1. A ce stade, la stratégie de recherche sur cette thématique pourrait reposer sur 4 différents axes.

Le premier axe chercherait à établir expérimentalement la preuve que le défaut de couverture péricytaire est impliqué dans des altérations du flux sanguin et d'oxygénation musculaire. En effet, les études 1 et 2 montraient un défaut de péricytes musculaires chez les patients BPCO mais n'ont pas permis d'apporter des preuves expérimentales d'une répercussion de ce défaut sur la fonction musculaire des patients. Ceci pourrait être effectué sur modèle animal en observant par microscopie intravitale bi-photon les différences de flux sanguins, d'oxygénation tissulaire et de diamètres capillaires entre des souris « Wild-type » et des souris PDGFR^{+/-} présentant une délétion partielle de la couverture péricytaire (Kisler et al., 2017). Ensuite, ces résultats pourraient être confirmés chez l'humain *via* une étude intégrant des mesures de spectroscopie dans le proche infra-rouge du flux sanguin capillaire et de l'oxygénation musculaire durant l'effort chez des patients présentant ou non un défaut de couverture péricytaire. Si ces études confirment nos hypothèses, alors la couverture

péricytaire pourra représenter une nouvelle cible thérapeutique dans l'optimisation des gains de tolérance à l'effort sous l'effet du REE chez les patients BPCO.

Le second axe de recherche serait centré sur l'étude des facteurs circulants sur l'angiogenèse musculaire et la couverture péricytaire. En effet, si nous pouvons incriminer le rôle de facteurs présents dans le sérum des patients BPCO (étude 2), nous n'avons pas mis en évidence d'acteurs précis de ces défauts. Les isoprostanes, marqueur du stress oxydant circulant étaient corrélés aux interactions péricytes/capillaires dans l'étude n°1. Ainsi, le stress oxydant pourrait constituer une première cible (Cacicedo et al., 2005; Hayden et al., 2010), des interventions anti-oxydantes limitant la perte péricytaire dans d'autres contextes (Tsai et al., 2009). Le stress oxydant et l'inflammation étant des phénomènes interconnectés, les molécules inflammatoires pourraient jouer un rôle dans l'altération de la couverture péricytaire. En effet, il a été montré que ces dernières limitaient les interactions péricytes/capillaires en perturbant les jonctions Notch3/Jagged-1 ou les gap jonction Cx43-dépendantes (Clément et al., 2007; Fernandez-Cobo et al., 1999). Par ailleurs, l'inhibition expérimentale de ces voies d'interactions est à l'origine de phénomènes proches de ceux retrouvés dans l'étude 2, i.e. une réduction de la différenciation des MSCs en péricytes et une réduction de la couverture péricytaire (Hirschi et al., 2003; Kofler et al., 2015; Sato et al., 2002). Il serait donc intéressant de réaliser un ciblage à large échelle du sérum des patients BPCO et des sujets sains contrôles puis, à l'aide d'analyses multivariées, d'associer des cytokines ou des cocktails de cytokines aux altérations péricytaires des patients. L'implication de ces cibles pourrait enfin être confirmée *in vitro*, sur les modèles utilisés avec le sérum total dans l'étude 2 et *in vivo* à l'aide d'un modèle animal BPCO par injection d'élastase et de LPS. Des études incluant des mesures chez l'animal avant et après un réentrainement à l'effort sont par ailleurs envisagées.

Enfin, ce modèle animal permettra également de tester la nature systémique de l'atteinte péricytaire dans la BPCO. En effet, alors que nous rapportons pour la première fois dans la BPCO un défaut de couverture péricytaire des capillaires sanguins dans le muscle, la question d'une altération systémique de cette cellule dans d'autres organes se pose. En effet, il a été montré que les patients BPCO présentaient des micro-saignements vasculaires au niveau cérébral (Lahousse et al., 2015), augmentant le risque de dégâts cérébraux et de déclin cognitif

chez ces patients. Ces anomalies pourraient être la conséquence d'une atteinte des péricytes qui sont des acteurs indispensables au maintien de l'intégrité de la barrière hématoencéphalique et de la prévention de troubles de la perméabilité vasculaire (Armulik et al., 2010). Par ailleurs, les péricytes des îlots pancréatiques permettent une hyperémie physiologique en réponse à une hyperglycémie, régulant ainsi l'apport sanguin pancréatique nécessaire à sa fonction tout comme à sa capacité de libération de l'insuline dans la circulation sanguine (Almaça et al., 2018). Dans le diabète de type 2 (Almaça et al., 2018), une « péricytopathie » pancréatique a été décrite et pourrait jouer un rôle dans les phénomènes d'hyperglycémie. Étant donné que la BPCO est associée à la survenue de phénomènes d'insulino-résistance, plus de la moitié des patients BPCO présentant des phénomènes d'hyperglycémie (Vanfleteren et al., 2013a) nous pensons qu'une atteinte péricytaire devrait être recherchée au niveau systémique, chez l'animal dans un premier temps. Le rôle des facteurs circulants de la maladie dans cette atteinte systémique devra bien sûr être caractérisé dans le même temps.

Au total, nous verrons si l'inactivation de ces facteurs circulants systémiques permet un retour à la normale *in vitro* et *in vivo*, permettant une nouvelle approche thérapeutique.

Le troisième axe de recherche serait centré sur l'étude du rôle de la dysfonction musculaire dans le défaut d'angiogenèse musculaire chez les patients BPCO. Bien que nous pensions que la cellule musculaire pouvait être impliquée dans les défauts d'angiogenèse en réponse au REE chez les patients BPCO, nous n'avons pas été en mesure de démontrer ce lien dans l'étude 3, du fait de réponse partielle chez les sujets sains. Cependant, nous n'avons testé que la voie menant à la production de VEGF-A pour le versant pro-bourgeoisement. Or, d'autres facteurs favorisent la prolifération endothéliale et la formation de tubes. Ainsi, l'effet du milieu conditionné total de myotubes BPCO et SHS sur la prolifération, la migration et la tubulogenèse des cellules endothéliales en culture devra être testée. Le versant du recrutement péricytaire *via* la voie SPP1 devra également être confirmé à l'aide de co-cultures myotubes/macrophages et de cultures de péricytes, comme précédemment décrit (Rowe et al., 2014). Nous avons évoqué précédemment les limites inhérentes à l'utilisation de la SEI seule comme modèle d'exercice *in vitro*. Ainsi, il est prévu de tester l'effet d'autres stimuli menant à la promotion de l'angiogenèse par ces cellules musculaires : AMPK, hypoxie,

stimulation l'influence β -adrénergique, etc. (Arany et al., 2008; Chinsomboon et al., 2009; Rowe et al., 2014; Thom et al., 2014), seuls ou associés à la SEI. Enfin, les résultats de l'étude 3 devraient être confirmés *in vivo* par le prélèvement de micro dialysats musculaires chez des patients BPCO et des contrôles sains durant un exercice aigu (Hoier et al., 2012), de manière à obtenir une stimulation plus réaliste et intégrant l'ensemble des voies de stimulation évoquées ci-dessus. Une fois ces différentes conditions testées, nous pourrions alors confirmer ou infirmer le rôle des cellules musculaires dans l'altération de l'angiogenèse musculaire des patients BPCO.

Le dernier axe de perspectives de recherche sera centré sur l'étude des mécanismes physiopathologiques impliqués dans le défaut de réponse de la vasoréactivité artérielle chez le patient BPCO. Cette approche sera réalisée dans un premier temps au travers de la finalisation de l'étude 4. De plus, l'étude 4 étant une étude exploratoire, elle fournira des résultats devant ensuite faire l'objet d'études de confirmation. Pour essayer d'obtenir un niveau de preuve le plus important possible, l'idée serait de combiner les approches scientifiques : de la mise en évidence de marqueurs sur les cellules et des modèles animaux à la validation de ces marqueurs sur des cohortes de patients BPCO.

Pour cela, une validation fonctionnelle des mécanismes mis en évidence dans l'étude 4 sera réalisée en utilisant une combinaison d'approche incluant un modèle animal de BPCO, des rats soumis à des injections d'élastase et de LPS. Des données préliminaires nous indiquent une atteinte vasculaire systémique dans ce modèle. Il pourra donc permettre de caractériser précisément les mécanismes évoqués dans l'étude 4. Cette caractérisation sera complétée à l'aide de modèles d'étude de la vasoréactivité *ex-vivo* et de la fonction endothéliale *in vitro*, utilisés en routine dans notre laboratoire.

En complément de cette validation fonctionnelle, une validation sur une cohorte de patients BPCO permettra de comprendre le sens et la pertinence clinique des marqueurs mis en évidence dans l'étude 4. Pour cela, nous conduirons une seconde étude basée sur l'évaluation de la vasoréactivité artérielle lors de visites annuelles à l'hôpital de patients BPCO. Ces sujets seront des sujets BPCO ayant intégré, à la suite d'un réentraînement à l'effort similaire à celui de l'étude 4, un programme de post-réhabilitation comprenant des séances d'activité physique hebdomadaires et ce, pour plusieurs années (1 à 5 ans). L'évaluation sur plusieurs

années nous permettra d'évaluer de manière prospective la relation entre certains marqueurs et le développement d'altérations de la VRA et/ou l'apparition d'évènements et de comorbidités cardiovasculaires.

Pour pouvoir mener à bien cette perspective, il était nécessaire d'identifier au préalable une cohorte de patients BPCO participant à un programme de post-réhabilitation au long court et d'en confirmer l'efficacité sur des marqueurs plus globaux des répercussions pulmonaires et systémiques de la maladie : tolérance à l'effort, dyspnée et qualité de vie. Nous avons donc mené une étude rétrospective sur la cohorte de patients BPCO adhérant au réseau de post-réhabilitation Air+R, qui est présentée comme étude en Annexe (Annexe 1). Grâce aux résultats de cette étude, nous avons confirmé l'éligibilité du réseau Air+R comme partenaire de notre future étude prospective incluant des évaluations cardiovasculaires, pour laquelle des demandes de financements sont en cours.

Annexe 1

Article original

Efficiency of a long-term pulmonary rehabilitation maintenance program for COPD patients in real-life setting– A 5-year cohort study

Léo Blervaque, Christian Préfaut, Hélène Forthin, Francis Maffre, Marion Bourrelier, Nelly Héraud, Matthias Catteau, Pascal Pomiès, Dany Jaffuel, Nicolas Molinari, Maurice Hayot, Fares Gouzi.

Article en cours de soumission dans la revue

Respirology

Présentation de l'étude n°5

La réhabilitation respiratoire représente une stratégie thérapeutique efficace dans la prise en charge de la BPCO et fait maintenant partie du parcours de soin classique de ces patients. L'efficacité de cette intervention dans l'obtention de gains de tolérance à l'effort, de qualité de vie, de dyspnée n'est plus à démontrer tant les études la supportant sont nombreuses (Yves Lacasse et al., 2015). Cependant, une des principales limites persistantes de la réhabilitation respiratoire est que, en l'absence de prise en charge spécifique après le séjour, les gains sont perdus dans l'année suivant la fin du séjour (Rochester & Spruit, 2017). Malheureusement, bien que de plus en plus considérées (Rochester & Spruit, 2017), les stratégies permettant de maintenir ces bénéfices sont souvent évaluées sur un délai de 12 mois seulement. Une seule étude à notre connaissance a prouvé l'efficacité d'un programme de post-réhabilitation jusqu'à 3 ans (Güell et al., 2017), mais se basait sur une intervention intense, peu réaliste en dehors d'un contexte de recherche (Rochester & Spruit, 2017). Il est donc nécessaire d'élargir ces résultats à des programmes de post-réhabilitation réalistes et directement implémentables dans un système de soin. Les programmes de post-réhabilitation basés sur des associations de patients présentent l'avantage d'être peu coûteux, de stimuler l'adhérence et la motivation et ont fait leurs preuves sur le court terme (jusqu'à 12 mois) (Moullec et al., 2008). Ainsi, dans la présente étude, nous avons fait l'hypothèse qu'un tel programme permettrait un maintien des bénéfices de la réhabilitation respiratoire pour au moins 3 ans.

Nous avons conduit cette étude *via* l'analyse rétrospective d'une cohorte de 144 patients BPCO engagés au sein du réseau de post-réhabilitation Air+R, pour une durée de 1 à 5 ans suivant leur sortie de la réhabilitation respiratoire initiale. Nous avons également effectué un clustering sans *a priori* basé sur les trajectoires. Enfin, nous avons intégré un groupe contrôle de 137 patients BPCO n'ayant pas suivi de programme de post-réhabilitation pour les analyses de survie.

Au total, nous avons pu observer un maintien des bénéfices de la réhabilitation initiale pour une durée de 4 ans concernant la qualité de vie et la distance au test de marche de 6 minutes

et de 5 ans pour la dyspnée. De plus, nous avons pu identifier un groupe de patients bons répondeurs (n=114), comportant des patients plus jeunes et moins sévères que le groupe de patients non-répondeurs (n=30). Enfin, nous avons pu voir que les patients BPCO engagés dans le programme de post-réhabilitation présentaient un risque de mortalité 3.1 [95%CI : 1.0-9.6] fois plus faible que les patients ne l'étant pas.

Cette étude est la première à fournir une preuve de l'efficacité à long-terme d'un programme de post-réhabilitation directement implémentable dans un système de santé sur le maintien de la tolérance à l'effort, de la dyspnée, de la qualité de vie ainsi que de la survie. De plus, elle permet d'identifier les patients répondant le mieux à ce programme, améliorant la personnalisation du parcours de soin.

Ces réponses différentielles sur des paramètres comme la tolérance à l'effort témoignent d'une diversité dans la population de BPCO incluse, diversité qui devrait faciliter nos explorations futures sur les déterminants cardio-vasculaires au sein de cette cohorte.

Efficiency of a long-term pulmonary rehabilitation maintenance program for COPD patients in real-life setting– A 5-year cohort study

Léo Blervaque¹, Christian Préfaut², Hélène Forthin³, Francis Maffre³, Marion Bourrelier³, Nelly Héraud⁴, Matthias Catteau¹, Pascal Pomiès¹, Dany Jaffuel⁵, Nicolas Molinari⁶, Maurice Hayot⁷, Fares Gouzi⁷

1. PhyMedExp, INSERM U1046, CNRS UMR 9214, Montpellier University, France
2. Montpellier University, Air+R Network, Montpellier, France
3. Air+R Network, Montpellier, France
4. Les Cliniques du Souffle[®], Lodève, France
5. Department of Pneumology, Montpellier University Hospital, Montpellier, France.
6. IMAG, CNRS, Montpellier University, Montpellier University Hospital, Montpellier, France
7. PhyMedExp, INSERM U1046, CNRS UMR 9214, Montpellier University, Montpellier University Hospital, Montpellier, France

Corresponding author:

Dr Fares Gouzi
Montpellier University Hospital

PhyMedExp, Montpellier University, INSERM U1046, CNRS UMR9214, F_34295 Montpellier Cedex 5, France

Tel: +33 467 335 908; Fax: +33 467 335 923

Email: f-gouzi@chu-montpellier.fr

Abstract

Background: Pulmonary rehabilitation (PR) improves exercise capacity, health-related quality of life (HRQoL) and dyspnea in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) patients. Maintenance programs can sustain the benefits for 12 to 24 months. Yet, the long-term effects (>12 months) of pragmatic maintenance programs in real-life settings remain unknown. This prospective cohort study assessed the yearly evolution in outcomes of a supervised self-help PR maintenance program for COPD patients followed for 5 years. The primary outcome was the yearly change in 6-minute walking distance (6MWD). Secondary outcomes were the yearly changes in HRQoL, dyspnea, and survival probability.

Methods: Data were prospectively collected from 144 COPD patients who followed a pragmatic multidisciplinary PR maintenance program for 1 to 5 years. They were assessed yearly for PR outcomes: 6MWD, HRQoL (VQ11) and dyspnea (MRC). The 5-year survival probability was compared to that of a control PR group without maintenance program. A trajectory-based cluster analysis identified the determinants of long-term response.

Results: Maintenance program patients maintained significant benefits of PR for 4 years for 6MWD and VQ11 and 5 years for MRC. The 5-year survival probability was higher than for PR patients without PR maintenance. Two clusters of response to long-term PR were identified, with responders being the less severe COPD patients.

Conclusions: This study provides evidence of the efficiency of a pragmatic PR maintenance program in a real-life setting for more than 3 years. In contrast to short-term PR, long-term PR maintenance appeared more beneficial in less severe COPD patients.

Keywords: Pulmonary rehabilitation, maintenance programs, COPD, survival.

Introduction

Randomized controlled trials (RCTs) show that short-term pulmonary rehabilitation (PR) programs provide clinically significant improvements in exercise capacity, health-related quality of life (HRQoL) and dyspnea in COPD patients. The last Cochrane Library meta-analysis concluded that additional RCTs comparing short-term PR to usual care in COPD were no longer warranted and that further studies should focus on new research questions (1). Currently, a major research question concerns the maintenance of these benefits 12-24 months after program discharge (2), which is when the benefits are lost after short-term PR (3). Unfortunately, little is known about strategies to maintain short-term PR benefits over years.

A few studies have shown that long-term (>12 months) PR maintenance programs are efficient to maintain the short-term PR benefits (4–6). However, the feasibility of intensive programs outside the research context is problematic, and translating experimental PR maintenance results to clinical settings remains an issue (3). A feasible PR maintenance program needs to be designed in a real-life setting.

An original and feasible strategy is to base PR maintenance on supervised self-help associations. In particular, the French Air+R network has offered supervised PR maintenance programs to patients in associations within the healthcare system since its creation in 2004 (950 patients enrolled to date). We previously showed that the French Air+R network PR maintenance program was clinically efficient 12 months after PR discharge (7). Nevertheless, practitioners need to know that the programs have been carefully evaluated (3), and both medical societies and regulatory authorities have requested the assessment of long-term trajectories and methods to identify responders (8). Randomizing patients into a usual-care group for many years would not be ethically acceptable, but well-designed observational studies of patient cohorts are adapted to investigating the effectiveness of such healthcare interventions (9, 10). On this basis, we hypothesized that the program would prevent clinically significant declines in exercise tolerance, HRQoL and dyspnea for at least 3 years. In addition, given COPD patients' heterogeneous responses to PR (11), we further expected to identify different patterns in response to the program.

Thus, the aim of this observational cohort study was to assess the yearly change in PR outcomes for 1 to 5 years after PR program discharge in COPD patients following a PR maintenance program supported by supervised self-help associations ("PR+maintenance" group). The primary outcome was the yearly change in 6-minute walking distance (6MWD). As secondary outcomes, we assessed: 1) the yearly changes in other PR outcomes (HRQoL, dyspnea) and 2) the survival probability at 60 months versus that of a control group (COPD after PR discharge, without maintenance program: "PR only" group).

Materials & Methods

Detailed information about the maintenance program, the outcomes and the statistical analysis are provided in the online supplementary material.

Subjects and experimental design

COPD patients in the self-help associations: “PR+maintenance” group

We conducted a retrospective cohort study using dataset from The French Air+R network constituted since 2009. The French Air+R network database was prospectively constituted from the yearly evaluations of patients who had joined the network after a PR program, in a standardized case report form. Data were extracted and analyzed in December 2018. The database was screened from January 2011 to December 2018. The inclusion criteria were the following: 1) a COPD diagnosis reported by a lung specialist and based on the association of compatible symptoms (dyspnea, chronic cough or sputum production) and/or a history of exposure to risk factors, and a post-bronchodilator forced expiratory volume in 1 s/forced vital capacity ratio <70%, 2) completion of a short-term inpatient PR program 3) completion of 1 to 5 years in the maintenance program, and 4) at least two interpretable 6MWD values. For the eligible COPD patients, the “zero-time” point (T0) was set at the maintenance program entry date. Additionally, we retrospectively collected the available data on 6MWD, VQ11 and MRC before and after the patients’ short-term inpatient PR program, in collaboration with the 2 main corresponding PR centers who address patients to the Air+R healthcare network (Cliniques du Souffle La Vallonie and la Solane). The Institutional Review Board of Montpellier University Hospital approved the study (2018_IRB-MTP_09-02), and informed consent was obtained from each patient. Clinical trial: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03704935>

Maintenance program

After a short-term inpatient PR program performed in the Occitanie Est region, France, all COPD patients in the had the opportunity to join the Air+R healthcare network of 12 local self-help patient associations (for further information please see www.airplusr.fr) during the following weeks. This network offers multidisciplinary PR maintenance programs comprising: 1) individualized exercise training (~42 sessions/year), 2) health education classes (6 hr/session; 2 sessions), and 3) psychological support (~2.5 sessions/year). Financial support to the self-help associations for these supervised activities is provided by the Air+R healthcare network.

“PR only” group

For survival analysis, we extracted data from the database of the 2 main corresponding PR centers and recruitment sources of the Air+R healthcare network (Cliniques du Souffle La Vallonie and la Solane). The inclusion criteria were similar as those of the “PR+maintenance” group, except that patients did not participate to a maintenance program after completion of the short-term PR program. The PR centers database was screened for the same period (from January 2011 to December 2018), and for patients who lived in the same region (Occitanie Est, France) as patients in the “PR+maintenance” group and a random subset of eligible patients was obtained.

Outcomes

Patients in the maintenance program were evaluated for baseline values of all parameters at inclusion (T0) and then every 12 months for a maximum of 60 months (T12-T60).

Primary outcome measure

6MWD was assessed following international recommendations (12). Briefly, patients were asked to cover the longest possible distance along a 30-m corridor. Tests were performed twice to control the learning effect. The predicted 6MWD value was determined using the equation of Troosters et al. (13).

Secondary outcome measures

Health-related quality of life

The VQ11 questionnaire assessed health-related quality of life. This short self-administered questionnaire was validated in COPD patients (14, 15).

Dyspnea

The impact of dyspnea was assessed with the Medical Research Council (MRC) dyspnea scale, which was validated and has prognostic value for COPD patients (16).

Lung function and BODE index

Lung function was assessed by a lung specialist using a plethysmographic spirometer and recorded in the network database. The BODE index was calculated as previously described (17).

Survival analysis

In order to compare the survival probability of COPD patients from the “PR+maintenance” group with that of the “PR only” group, we extracted the vital status of these patients from the *Institut national de la statistique et des études économiques* (INSEE) database. This database includes all deaths of French people from 1977 to January 2020. To assess the deaths among patients from our databases, we performed automatic matching with the INSEE database.

Statistical analysis

We analyzed evolution of outcomes using linear mixed effect models (LME) (18), survival analysis Kaplan-Meier survival curves and COX uni- and multivariate regression. Trajectories were analyzed using latent class mixed models (19). A p-value <0.05 was considered significant. All analysis was performed using R 3.5.0 software (www.r-project.org).

Results

Patient characteristics and maintenance program adherence

During the study period, 144 COPD patients were eligible. Baseline characteristics of the “PR+maintenance” patients included in the analysis are fully detailed in Table 1. Most patients (n=105, 73%) had complete survival follow-up to death, or censoring at 31 December 2018.

Table 1. Baseline characteristics of the “PR+maintenance” COPD patients.

	n=144
Sex ratio M/F	56.9%
Age years	66.26 (8.48)
BMI kg.m⁻²	26.59 (5.29)
FEV₁ %pred.	63.18 (25.78)
FEV₁/VC	52.73 (13.24)
Disease severity (GOLD)	
I	25.6%
II	40.6%
III	24.8%
IV	9.0%
Smoking history pack-year	37.89 (25.81)
BODE Index	2.64 (1.88)
6MWD m	454.51 (97.98)
6MWD %pred.	74.38 (17.07)
MRC	2.45 (1.26)
VQ11	25.53 (8.28)
Comorbidities n (% total)	
Total	118 (81.9%)
Pulmonary	66 (45.8%)
Cardiovascular	86 (59.7%)
Metabolic	47 (32.6%)
Neurologic	7 (4.9%)
Joint & muscle disorders	16 (11.1%)
Others	23 (16.0%)

Data are presented as means (SD). BMI: body mass index; FEV₁: forced expiratory volume in 1 s; VC: vital capacity; 6MWD: 6-min walking distance; %pred: % predicted; MRC: modified Medical Research Council dyspnea score; VQ11: short health-related quality of life questionnaire. Disease severity classified according to the GOLD guidelines: stage I, mild, FEV₁ >80% of predicted normal value; stage II, moderate, FEV₁ 50–79%; stage III, severe, FEV₁ 30–49%; stage IV, very severe, FEV₁ <30%.

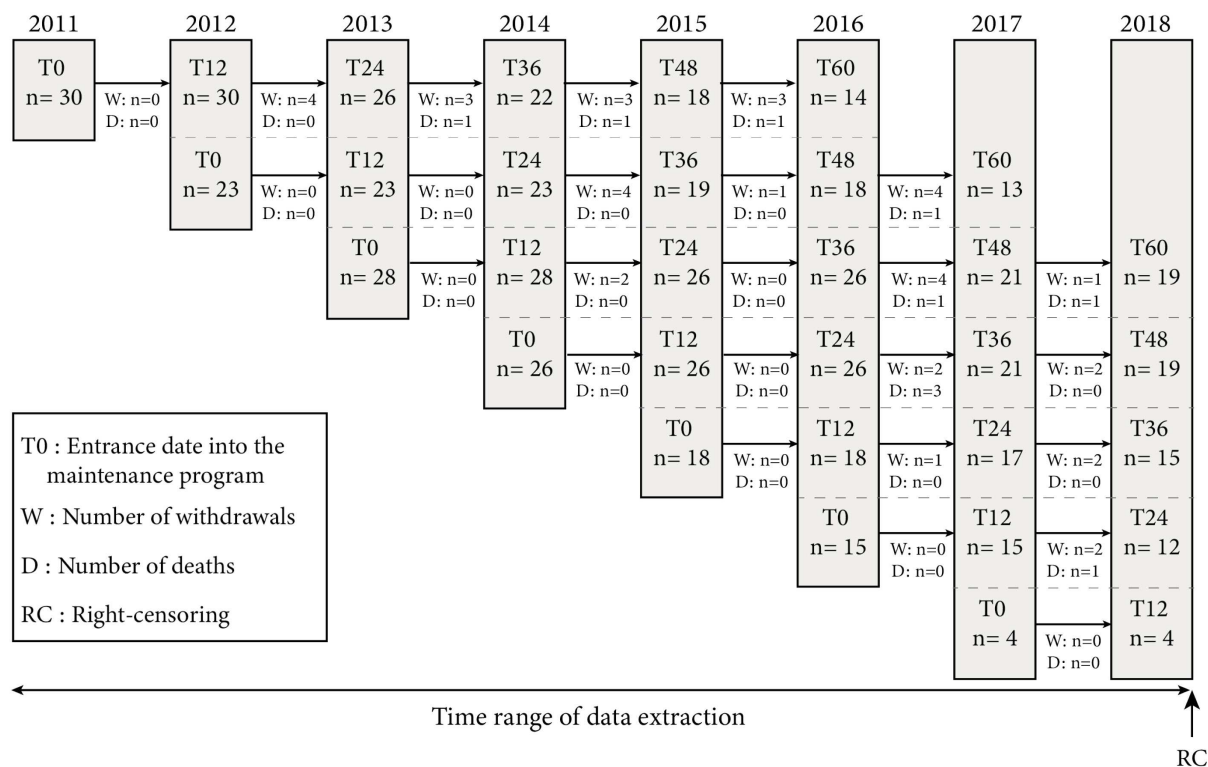


Figure 1. Flow chart of subject participation for the “PR+maintenance” COPD patients. COPD: chronic obstructive pulmonary disease. Right-censored data are from patients who did not perform all evaluations due to program entry after 2013 and not due to withdrawal (e.g., patients joining the program in 2015 could only be evaluated up to T36, the data extraction and analysis having been done in December 2018).

Figure 1 presents the design of the patient inclusion procedure. From T0, the mean follow-up duration was 41.6 ± 16.4 months. The dropout rate was 36% over the 5 years, with 39 patients withdrawing and 10 patients who died. The main reasons for withdrawal were clinical worsening ($n=10$), motivation ($n=7$), logistics ($n=6$), relationships within the network ($n=6$), and others ($n=10$). Withdrawn patients did not differ from other patients in terms of severity (BODE index: 2.30 ± 1.94 vs. 2.75 ± 1.86 ; $p=0.28$), exercise tolerance (6MWD: $71.23 \pm 17.87\%$ vs. $75.59 \pm 16.70\%$; $p=0.21$), dyspnea (MRC: 2.38 ± 1.29 vs. 2.48 ± 1.25 ; $p=0.68$) or quality of life (VQ11: 23.90 ± 7.58 vs. 26.11 ± 8.48 ; $p=0.21$). Some patients who joined the program after 2013 had not completed all the assessments in December 2018. Thus, they were therefore right-censored (RC) at that time (Figure 1). The rate of adherence to the maintenance program was $53 \pm 22\%$ (sessions attended/sessions scheduled). Over the 5 years, only one adverse event related to the maintenance program was reported (knee synovial effusion).

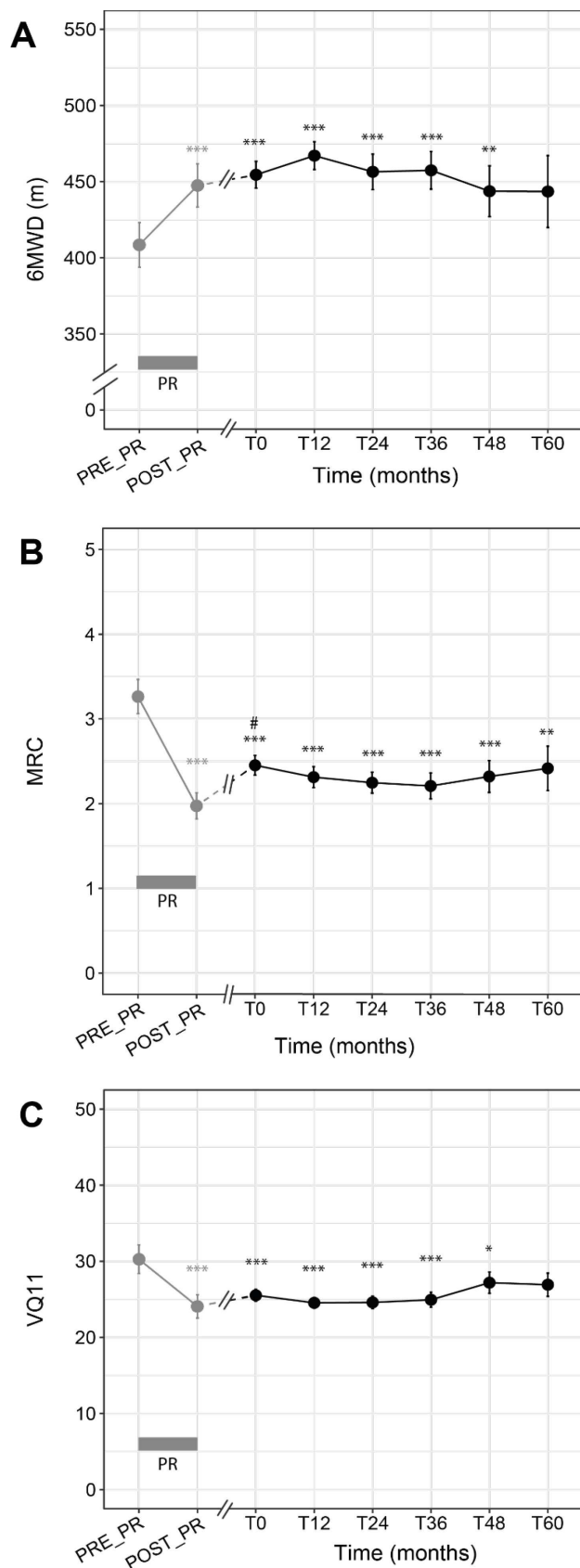


Figure 2. Pattern of change in pulmonary rehabilitation outcomes over time in the “PR+maintenance” group. A. Change in 6-min walking distance (6MWD). B. Change in Medical Research Council dyspnea score (MRC). C. Change in health-related quality of life score (VQ11). Gray box: pulmonary rehabilitation (PR) program. Gray dots & lines: pre- and post-PR values. Black dots & lines: values during the maintenance program. Linear mixed effects model. Time effect: $p < 0.001$ for (A), (B) and (C). Post-hoc: different from pre-PR: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Different from post-PR: # $p < 0.05$.

Effect of the maintenance program

The evolutions in outcome variables over time are presented in Figure 2. Figure 2A shows that the COPD patients in the maintenance program presented no significant difference between 6MWD at program entry (T0) and at any point in the 5-year follow-up (T12,T24,T36,T48,T60). Results were the same for MRC (Fig. 2B) and VQ11 (Fig. 2C). We were able to retrospectively collect pre- and post-PR 6MWD values in 38% (n=55) of these patients. This subgroup did not differ from the total population of maintenance program patients in age, sex ratio, disease severity, BODE index, 6MWD, MRC or VQ11 (Suppl. Table 1). Moreover, the change in 6MWD over the 5 years did not differ between this subgroup and patients without PR data (Group x Time interaction: $p=0.68$; data not shown). In patients with PR data, we found that the significant effect of the initial PR remained up to month 48 for 6MWD and VQ11 (Fig. 2A & 2C) and month 60 for MRC (Fig. 2B). In all “PR+maintenance” patients, 0.26 ± 0.59 unprogrammed medical consultations per year and 0.86 ± 4.74 hospitalization days per year were recorded during the 5-year follow-up. The mean yearly cost per patient was 986€, detailed in Suppl. Table 2.

Survival analysis

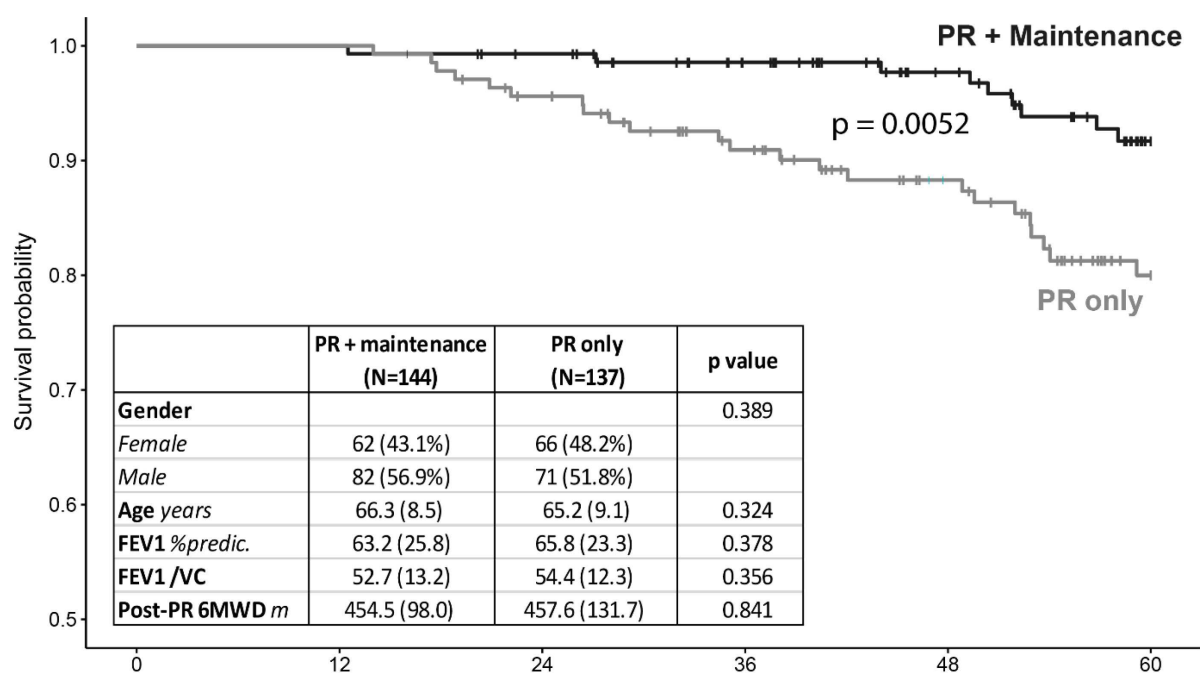


Figure 3. 5-year survival probability for the “PR+maintenance” and “PR only” groups. Curves: Kaplan-Meier analysis; gray line: “PR only” group; black line: “PR+maintenance” group. Table: Comparison of main clinical characteristics of the “PR+maintenance” and “PR only” groups.

During the study period, 137 COPD patients were eligible for the “PR only” group. Baseline characteristics of these patients in the “PR only” group did not significantly differ from the patients of “PR+maintenance” (Fig. 3). The mean follow-up duration did not differ between groups (“PR only”: 50±13 vs. “PR+maintenance”: 52±12 months; $p=0.14$). The survival probability at 60 months was significantly higher in the “PR+maintenance” group compared to “PR only” (Log-Rank: $p=0.005$; Fig. 3). Multivariate regression analysis including statistically significant cofounders (sex ratio, FEV₁/VC and post-PR 6MWD) confirmed that the adjusted risk of mortality in the “PR+maintenance” patients was significantly and 3.1 times lower compared to that of “PR only” patients (95%CI: 1.0-9.6; $p=0.045$; Suppl. Table 3).

Trajectory models

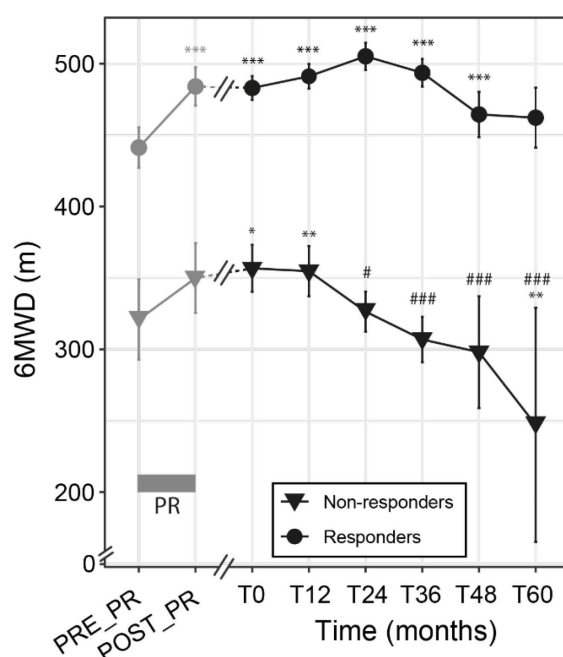


Figure 4. Two-class model showing the mean trajectory of primary outcomes (6-min walking distance) over 5 years of follow-up. PR: pulmonary rehabilitation. Gray box: pulmonary rehabilitation (PR) program. Gray dots & lines: pre- and post-PR values. Black dots & lines: values during the maintenance program. Linear mixed effects model: Group x Time: Group/Time interaction effect, $p<0.001$. Post-hoc: different from pre-PR: * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$. Different from T0: # $p<0.05$; ### $p<0.001$.

With latent-class analysis, we identified one cluster of responder patients and one cluster of non-responders. The non-responder cluster included 21% of the maintenance program patients ($n=30$). Figure 4 presents the evolution of the primary outcome along the 5-year follow-up for the two clusters, which presented significantly different evolutions of 6MWD

along the program (Group x Time interaction: $p < 0.001$; Fig. 4). The 6MWD values of the non-responder cluster significantly declined from month 24 onward (Fig. 4). Conversely, the responder cluster showed no significant 6MWD decline over the follow-up (Fig. 4), and the initial PR showed significant benefits up to month 48 (Fig. 4). Baseline characteristics of the two clusters are presented in Table 2.

Table 2. Baseline characteristics of the “PR+maintenance” COPD patients by trajectory class.

	Non-responders (N=30)	Responders (N=114)	p value
Sex ratio M/F	80.0%	50.9%	0.004
Age years	67.83 (10.21)	65.84 (7.97)	0.254
BMI kg.m⁻²	25.87 (5.20)	26.80 (5.32)	0.416
FEV1 %pred.	50.79 (23.66)	66.20 (25.48)	0.006
FEV1/VC	46.74 (12.47)	54.47 (13.03)	0.028
Disease severity (GOLD)			0.022
I	11.5%	29.0%	
II	38.5%	41.1%	
III	26.9%	24.3%	
IV	23.1%	5.6%	
Smoking history pack- year	51.48 (27.32)	34.64 (24.55)	0.018
BODE Index	4.55 (1.77)	2.15 (1.58)	< 0.001
6MWD m	356.70 (87.13)	483.04 (81.43)	< 0.001
6MWD %pred.	55.44 (12.53)	79.97 (13.96)	< 0.001
MRC	3.46 (1.21)	2.16 (1.12)	< 0.001
VQ11	29.83 (7.97)	24.40 (8.02)	0.004
Comorbidities n (% total)			
Total	17 (56.7%)	101 (88.6%)	< 0.001
Pulmonary	7 (23.3%)	59 (51.8%)	0.005
Cardiovascular	14 (46.7%)	72 (63.2%)	0.101
Metabolic	7 (23.3%)	40 (35.1%)	0.222
Neurologic	1 (3.3%)	6 (5.3%)	0.662
Joint disorders	0 (0.0%)	16 (14.0%)	0.030
Others	2 (6.7%)	21 (18.4%)	0.118

Data are presented as means (SD). BMI: body mass index; FEV₁: forced expiratory volume in 1 s; VC: vital capacity; 6MWD: 6-min walking distance; %pred: % predicted; MRC: modified Medical Research Council dyspnea score; VQ11: a short health-related quality of life questionnaire. Disease severity classified according to the GOLD guidelines: stage I, mild, FEV₁ >80% of predicted normal value; stage II, moderate, FEV₁ 50–79%; stage III, severe, FEV₁ 30–49%; stage IV, very severe, FEV₁ <30%.

The responder cluster was significantly younger and had less severe COPD than the non-responder cluster (Table 2). Program adherence tended to be higher in the responder cluster (Suppl. Fig. 1A, $p=0.07$), whereas the initial response to PR did not differ between the two clusters (Suppl. Fig. 1B).

Discussion

This long-term follow-up study is the first to show the time course of major PR outcomes for more than 3 years in patients included in a PR maintenance program in a real-life setting. The outcome values during follow-up were compared with the values at maintenance entry and short-term PR entry and showed a sustained benefit for 48 to 60 months.

The COPD patients in the maintenance program were evaluated at study entry (T0) for 6MWD, quality of life and dyspnea. We then showed that these T0 values did not significantly decline over the 5-year follow-up (Fig. 2). To confirm the long-term program efficiency, we also tested its effect by comparing values over the course of the maintenance program with the values before the short-term PR in a representative patient subgroup (Suppl. Table 1). After significant improvements in exercise tolerance, HRQoL and dyspnea induced by short-term PR (as reported before (20)), these maintenance-program patients were able to maintain these significant improvements for 4 years for exercise tolerance and quality of life (Fig. 2A & C) and 5 years for dyspnea (Fig. 2B). In contrast, an earlier study reported that COPD patients were unable to maintain significant PR benefits 12 months after PR discharge without maintenance strategies (2). Here we provide evidence that a pragmatic maintenance program supported by self-help associations offers a reliable response to the challenges of maintaining short-term PR benefits.

In a real-life setting study, the long-term clinical benefits must be balanced by the costs of the therapeutic intervention. The mean annual cost of 986€ per patient (Suppl. Table 2) is considerably less than the cost of repeated inpatient PR programs (21). Altogether, while this should be verified prospectively, this pragmatic PR maintenance program could be cost-effective. Other healthcare systems might consider the benefits of this program, already in broad use in a clinical context.

As 6MWD and dyspnea have been associated with survival probability in COPD patients(22, 23), we also investigated whether the patients in the Air+R maintenance program presented a survival advantage versus the control “PR only” group, which was composed of COPD patients who differed from our “PR+maintenance group” only by the lack of a maintenance program during follow-up. The external validity of this “PR only” group was acceptable because the mortality at 48 months was 88%, in line with previous studies reporting a 4-year survival probability of 85% in COPD patients with similar exercise capacity (post-PR 6MWD >305 m) (24). The “PR+maintenance” patients had a better prognosis compared to the “PR only” group during the 60 months of follow-up, with an adjusted risk of mortality 3.1 times lower. In order to strengthen this observational result, we considered every confounding factor in a multivariate analysis (Suppl. Table 3), which confirmed the increased survival in these patients. The observed survival also appeared higher than in other published “PR only” groups. While the survival probability of our “PR+maintenance” group reached 92% at 60 months, Camillo et al. reported survival probabilities ranging from 81% to 69% at 60 months in COPD patients with a similar exercise capacity. Although our result will have to be confirmed by other studies using different methodologies, it is clearly an additional argument for broader thinking in medical decision-making and healthcare policies regarding pulmonary rehabilitation maintenance strategies (9, 25, 26).

In line with studies that have isolated the phenotype of patients who respond to PR (11), we identified trajectories of response to our maintenance program. Whereas Soicher et al. (2012) identified trajectory clusters following a single PR, our study is the first to identify responses to a long-term PR maintenance program, classed into two clusters: a cluster of responders and a cluster of non-responders. Fortunately, only 21% of the patients were non-responders (Table 2), indicating that this program was efficient in prolonging the benefits of the initial PR in a large majority of patients. A previous study showed heterogeneous responses to short-term PR, with a better response for patients with the highest Body-Mass Index, Airflow Obstruction, Dyspnea, and Exercise Capacity (BODE) index scores (11). In contrast, in our study it was the non-responding group that comprised the most severe COPD patients with the highest BODE scores (Table 2). Nevertheless, it should be noted that long-term maintenance and short-term PR programs differ in terms of intensity, frequency and duration. Thus, it is not surprising that

short-term and long-term PR are related to different determinants. In line with the previous study (11), we also observed that the short-term PR response was higher in patients with reduced 6MWD (Suppl. Fig. 2). Furthermore, the response to the short-term PR did not differ between the responders and non-responders of the maintenance program (Suppl. Fig. 1). Altogether, our study is the first to provide a clear picture of the COPD patients who benefit from a PR maintenance program. This may be of great interest for healthcare providers who must define the PR organization for their patients. Given the specific determinants of the response to a long-term maintenance program, this study also opens new avenues for research on the responses to PR maintenance strategies.

The long-term efficiency and determinants of response of the maintenance program may have been mediated by the Air+R network's self-help associations. This maintenance program has been operating in a clinical context for 15 years and more than 950 patients have benefited from its experience. It is based on self-help communities, which are known to promote long-term exercise adherence (28, 29). Community-based programs are a growing interest in the field of pulmonary rehabilitation (30). A recent review identified facilitators and barriers to physical activity maintenance after PR discharge (31). The supervised sessions and health education in the maintenance program ensured continued support from healthcare professionals, who are key facilitators, and circumvented the key barriers: lack of positive feedback and lack of structured sessions (31). In addition, the self-help organization and discussion groups provided peer interactions, self-monitoring and routines, which are also key facilitators (31). These factors together may explain the mean program adherence of over 50% despite the long-term nature of the intervention. Moreover, the dropout rate at month 36 was lower than the dropout rate of the study with the longest follow-up in this context (6). Last, the psychological and social support from the self-help association and the group dynamics may also have contributed to the PR maintenance program's efficiency, as suggested (32).

Study limitations

A limitation of this study was the non-randomized design. However, several RCTs have shown the efficiency of experimental maintenance programs up to 36 months (2, 6, 7), and we thus

assumed that randomizing COPD patients into a group without a maintenance program would be unethical. Conversely, observational studies and RCTs agree head-to-head, if they are well-designed (9, 26, 33). In the present study, the inclusion criteria were predefined. Also, the outcomes were prospectively recorded from a definite “zero-time” point in each group, and during a follow-up duration that was not statistically different between groups. We strengthened the results as much as possible with statistical adjustments based on multivariate analysis. Moreover, studies have demonstrated the limits of RCTs in providing evidence for medical decisions and have emphasized the value of real-life observational cohorts (9, 10, 26). Altogether, the present study presents robust data regarding the long-term efficiency of a PR maintenance program in a real-life setting.

Another limitation was the failure to obtain the initial PR data for all patients, although the subgroup of patients with PR data was representative of the whole COPD group included in the study (Suppl. Table 1). Also, the primary outcome, i.e., the evolution of 6MWD, did not differ between patients with and without PR data. Further, we analyzed the data with linear mixed effect models, which allow unbiased and powerful analysis in a context of missing data (Bell et al., 2013; Duricki et al., 2016).

Conclusion

Based on a well-designed observational study, we showed that a pragmatic, supervised, self-help PR maintenance program can extend the benefits of the initial PR up to 4 years (exercise capacity and health-related quality of life) and 5 years (dyspnea) in a real-life setting. In addition, this longest PR maintenance follow-up study to date demonstrated favorable survival indicators compared to a comparable control group without maintenance intervention. We identified a small proportion of patients who did not respond to the program. In contrast to the findings for short-term PR, long-term responders were the less severe COPD patients. Although complementary research studies with other designs are warranted, this study adds valuable information regarding the indications and decisions for pulmonary rehabilitation.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge C. Stott for critical reading of the manuscript, and all the patients and healthcare providers of the Air + R network.

References

1. Lacasse Y, Cates CJ, McCarthy B, Welsh EJ. This Cochrane Review is closed: deciding what constitutes enough research and where next for pulmonary rehabilitation in COPD. In: Tovey D, editor. *Cochrane database Syst Rev* 2015;
2. Ries AL, Kaplan RM, Myers R, Prewitt LM. Maintenance after pulmonary rehabilitation in chronic lung disease: A randomized trial. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167:880–888.
3. Rochester CL, Spruit MA. Maintaining the benefits of pulmonary rehabilitation the Holy Grail. *Am J Respir Crit Care Med* 2017;195:548–551.
4. Beauchamp MK, Evans R, Janaudis-Ferreira T, Goldstein RS, Brooks D. Systematic review of supervised exercise programs after pulmonary rehabilitation in individuals with COPD. *Chest* 2013;144:1124–1133.
5. Jenkins AR, Gowler H, Curtis F, Holden NS, Bridle C, Jones AW. Efficacy of supervised maintenance exercise following pulmonary rehabilitation on health care use: A systematic review and meta-analysis. *Int J COPD* 2018;13:257–273.
6. Güell MR, Cejudo P, Ortega F, Puy MC, Rodríguez-Trigo G, Pijoan J, Martínez-Indart L, Gorostiza A, Bdeir K, Celli B, Galdiz JB. Benefits of long-term pulmonary rehabilitation maintenance program in patients with severe chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2017;195:622–629.
7. Moullec G, Ninot G, Varray A, Desplan J, Hayot M, Préfaut C. An innovative maintenance follow-up program after a first inpatient pulmonary rehabilitation. *Respir Med* 2008;102:556–566.
8. Préfaut C, Ninot G. « La réhabilitation du malade respiratoire chronique ». *Rev Mal Respir* 2009;26:1018.
9. Concato J, Shah N, Horwitz RI. Randomized, Controlled Trials, Observational Studies, and the Hierarchy of Research Designs. *N Engl J Med* 2000;342:1887–1892.
10. Barnish M, Turner S. The value of pragmatic and observational studies in health care and public health. *Pragmatic Obs Res* 2017;Volume 8:49–55.
11. Spruit MA, Augustin IML, Vanfleteren LE, Janssen DJA, Gaffron S, Pennings HJ, Smeenk F, Pieters W, Van Den Bergh JJAM, Michels AJ, Groenen MTJ, Rutten EPA, Wouters EFM, Franssen FME. Differential response to pulmonary rehabilitation in COPD: Multidimensional profiling. *Eur Respir J* 2015;46:1625–1635.
12. ATS. ATS Statement: The Six-Minute Walk Test. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:111–117.
13. Troosters T, Gosselink R, Decramer M. Six minute walking distance in healthy elderly subjects. *Eur Respir J* 1999;14:270–274.
14. Ninot G, Soye F, Préfaut C. A short questionnaire for the assessment of quality of life in patients with chronic obstructive pulmonary disease: Psychometric properties of VQ11. *Health Qual Life Outcomes* 2013;11:179.
15. Ninot G, Soye F, Fiocco S, Nassih K, Morin AJS, Préfaut C. Le VQ11, un questionnaire de qualité de vie spécifique à la BPCO utilisable en clinique. *Rev Mal Respir* 2010;27:472–481.
16. Bestall JC, Paul EA, Garrod R, Garnham R, Jones PW, Wedzicha JA. Usefulness of the Medical Research Council (MRC) dyspnoea scale as a measure of disability in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 1999;54:581–586.
17. Celli BR, Cote CG, Marin JM, Casanova C, Montes de Oca M, Mendez RA, Pinto Plata V, Cabral HJ. The Body-Mass Index, Airflow Obstruction, Dyspnea, and Exercise Capacity Index in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *N Engl J Med* 2004;350:1005–1012.

18. Pinheiro J, Bates D, DebRoy S, Sarkar D. R Development Core Team. 2014. nlme: linear and nonlinear mixed effects models. R package version 3.1-117. R Found Stat Comput Vienna, Austria 2014;at <<http://cran.r-project.org/package=nlme>>.
19. Proust-Lima C, Philipps V, Lique B. Estimation of Extended Mixed Models Using Latent Classes and Latent Processes: The R Package lamm. J Stat Softw 2017.
20. Lacasse Y, Martin S, Lasserson TJ, Goldstein RS. Meta-analysis of respiratory rehabilitation in chronic obstructive pulmonary disease a Cochrane systematic review. Eur J Respir Med 2007;
21. Foglio K, Bianchi L, Bruletti G, Porta R, Vitacca M, Balbi B, Ambrosino N. Seven-year time course of lung function, symptoms, health-related quality of life, and exercise tolerance in COPD patients undergoing pulmonary rehabilitation programs. Respir Med 2007;101:1961–1970.
22. Pinto-Plata VM, Cote C, Cabral H, Taylor J, Celli BR. The 6-min walk distance: Change over time and value as a predictor of survival in severe COPD. Eur Respir J 2004;23:28–33.
23. Nishimura K, Izumi T, Tsukino M, Oga T. Dyspnea is a better predictor of 5-year survival than airway obstruction in patients with COPD. Chest 2002;121:1434–1440.
24. Bowen JB, Votto JJ, Thrall RS, Haggerty MC, Stockdale-Woolley R, Bandyopadhyay T, ZuWallack RL. Functional status and survival following pulmonary rehabilitation. Chest 2000;118:697–703.
25. Rawlins M. De testimonio: on the evidence for decisions about the use of therapeutic interventions. Lancet 2008;
26. Concato J. Study design and “evidence” in patient-oriented research. Am J Respir Crit Care Med 2013;187:1167–1172.
27. Soicher JE, Mayo NE, Gauvin L, Hanley JA, Bernard S, Maltais F, Bourbeau J. Trajectories of endurance activity following pulmonary rehabilitation in COPD patients. Eur Respir J 2012;39:272–278.
28. Van Wetering CR, Hoogendoorn M, Mol SJM, Rutten-Van Mülken MPMH, Schols AM. Short- and long-term efficacy of a community-based COPD management programme in less advanced COPD: A randomised controlled trial. Thorax 2010;65:7–13.
29. Cockram J, Cecins N, Jenkins S. Maintaining exercise capacity and quality of life following pulmonary rehabilitation. Respirology 2006;11:98–104.
30. Nici L, Singh SJ, Holland AE, ZuWallack RL. Opportunities and challenges in expanding pulmonary rehabilitation into the home and community. Am J Respir Crit Care Med 2019;200:822–827.
31. Robinson H, Williams V, Curtis F, Bridle C, Jones AW. Facilitators and barriers to physical activity following pulmonary rehabilitation in COPD: A systematic review of qualitative studies. npj Prim Care Respir Med 2018;28:1–12.
32. Güell R, Casan P, Belda J, Sangenis M, Morante F, Guyatt GH, Sanchis J. Long-term effects of outpatient rehabilitation of COPD: A randomized trial. Chest 2000;117:976–983.
33. Benson K, Hartz AJ. A Comparison of Observational Studies and Randomized, Controlled Trials. N Engl J Med 2000;342:1878–1886.
34. Duricki DA, Soleman S, Moon LDF. Analysis of longitudinal data from animals with missing values using SPSS. Nat Protoc 2016;11:1112–1129.
35. Bell ML, Kenward MG, Fairclough DL, Horton NJ. Differential dropout and bias in randomised controlled trials: when it matters and when it may not. BMJ 2013;346:.

Fichier additionnel

Supplementary material and methods

Subjects and experimental design

“PR only” group

For survival analysis, we extracted data from a database of patients who participated in a short-term PR program during the same period (2011 to 2017) and in the same region (Occitanie Est, France) as the PR+maintenance group. The inclusion criteria were similar as those of the “PR+maintenance” group (i.e. a spirometry-based COPD diagnosis reported by the referent chest physician and completion of a short-term inpatient PR program), except that patients did not participate to a maintenance program after completion of the short-term PR program. As the first health status was available at 12 months in the “PR+maintenance” group, patients of the “PR only” group who died during the first 12 months following the PR program were excluded from the study. The PR centers database was screened for the same period (from January 2011 to December 2018), and for patients who lived in the same region (Occitanie Est, France) as patients in the “PR+maintenance” group and a random subset of eligible patients was obtained. Last, to avoid overlap between the “PR-only” group and the “PR+maintenance” group, the database of the Air+R network and those of the PR centers were compared, and patients present in both databases were excluded. The T0 point for the eligible COPD patients was set at the end of the short-term inpatient PR program. The data from patients with a follow-up longer than 60 months or without events up to 31 December 2018 were right-censored.

PR maintenance program

COPD patients had the opportunity to join a regional healthcare network of 12 local self-help patient associations: Air+R (for further information please see www.airplusr.fr). To do so, they had to have recently completed (within a few months) a certified inpatient PR program conducted along international guidelines (1). This network offers multidisciplinary PR

maintenance programs comprising: (1) individualized exercise training with endurance sessions targeting the first ventilatory threshold (outdoor and indoor walking) and interval, upper limb and resistance/strength sessions (local gym), all supervised by an adapted physical activity teacher once a week outside of school breaks (~42 sessions/year); (2) health education classes (6 hr/session; 2 sessions/year in a local conference room) with multidisciplinary health professionals from the network; and (3) psychological support via discussion groups supervised by a psychologist (~2.5 sessions/year). Financial support to the self-help associations for these supervised activities was provided by the Air+R healthcare network.

Assessments

Patients were evaluated for baseline values of all parameters at network entry, which averaged 86 days after PR completion (T0), and then every 12 months for a maximum of 60 months (T12-T60). As this network includes 12 associations, its research committee, a multidisciplinary team of physicians and scientists, standardized the evaluations and the protocol before the start of the study.

Health-related quality of life

The VQ11 questionnaire assessed health-related quality of life. This short self-administered questionnaire was validated by our group in COPD patients (2,3) and is used in routine care. It is composed of 11 items (1-5 points/item) along three dimensions: (1) functional, three items; (2) psychological, four items; and (3) social, four items. Good quality of life is characterized by a low VQ11 score. A VQ11 score ≥ 2 reflects poor quality of life.

Healthcare resource utilization

The utilization of healthcare resources was assessed through the yearly number of hospitalization days and the number of unprogrammed consultations during the PR maintenance program.

Program adherence

Adherence to the PR maintenance program was assessed by the multidisciplinary team for each activity. The number of attended sessions was recorded for each patient and compared to the number of scheduled sessions.

BODE index

The BODE index is calculated from body mass index (B), degree of airflow obstruction: FEV₁ (O), dyspnea score: MRC (D), and exercise capacity: 6MWD (E). This index is a 10-point scale; the higher the score is, the higher the risk of death (4).

Survival analysis

In order to compare the survival probability of COPD patients from the “PR+maintenance” group with that of the “PR only” group, we extracted the vital status of these patients from the *Institut national de la statistique et des études économiques* (INSEE) database. This database includes all deaths of French people from 1977 to January 2020, with information on name, date and place of birth, and date and place of death. To assess the deaths among patients from our databases, we performed automatic matching with the INSEE database based on date of birth and the first 10 digits of the social security number. To avoid misclassification, we performed two other matching methods, one with a combination of name and the first 10 numbers of the social security number and another with a combination of name and date of birth. The total number of deaths within each group was determined after rigorous comparison of these three datasets.

Statistical analysis

The evolution of the primary and secondary outcomes during follow-up was assessed using linear mixed effect models (LME) fit with the nlme R package (5), including a Time effect as fixed effect and a Subject effect as random effect. Given the long follow-up period, analyses were adjusted on the age effect when age was significant. When the Time effect was significant, post-hoc tests corrected by the false discovery rate method were performed to compare each evaluation to baseline.

Survival analysis was performed by producing Kaplan-Meier survival curves and COX uni- and multivariate regression analyses, fitted with the survival and survminer R packages (6,7) and allowing calculations of adjusted hazard ratio (HR). Right censoring was applied for patients who joined the program after 2013 and had not completed all assessments at the time of data extraction (December 2018).

Trajectories were analyzed using latent class mixed models fitted with the lcmm R package (8). Different numbers of clusters were tested and selected based on the Bayesian information criterion (BIC) and entropy. Patients' baseline characteristics from clusters 1 and 2 were compared using t-, Mann-Whitney or Chi² tests, depending on the data type. Outcome measures were compared using LME including a Time effect, a Group effect, and the interaction between these effects as fixed effects and a Subject effect as random effect. A p-value <0.05 was considered significant. All analysis was performed using R 3.5.0 software (www.r-project.org).

Results

Trajectory models

To identify patterns of response to the maintenance program, we performed latent class trajectory models. Two-, three- and four-class models were tested. The two-class model presented the best combination of fit indices (lowest Bayesian information criterion and highest entropy) and was thus selected.

References

1. Spruit MA, Singh SJ, Garvey C, et al. An official American thoracic society/European respiratory society statement: Key concepts and advances in pulmonary rehabilitation. *Am J Respir Crit Care Med* 2013;188(8):e13-64.
2. Ninot G, Soye F, Préfaut C. A short questionnaire for the assessment of quality of life in patients with chronic obstructive pulmonary disease: Psychometric properties of VQ11. *Health Qual Life Outcomes* [Internet] 2013 [cited 2019 Jul 31];11(1):179. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24160852>
3. Ninot G, Soye F, Fiocco S, Nassih K, Morin AJS, Préfaut C. Le VQ11, un questionnaire de qualité de vie spécifique à la BPCO utilisable en clinique. *Rev Mal Respir* 2010;27(5):472–481.
4. Celli BR, Cote CG, Marin JM, et al. The Body-Mass Index, Airflow Obstruction, Dyspnea, and Exercise Capacity Index in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *N Engl J Med* [Internet] 2004 [cited 2019 Nov 27];350(10):1005–1012. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa021322>

5. Pinheiro J, Bates D, DebRoy S, Sarkar D. R Development Core Team. 2014. nlme: linear and nonlinear mixed effects models. R package version 3.1-117. R Found Stat Comput Vienna, Austria [Internet] 2014; Available from: <http://cran.r-project.org/package=nlme>
6. Therneau TM, Grambsch PM. Frailty Models [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2000 [cited 2019 May 10]. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4757-3294-8>
7. Kassambara A, Kosinski M, Biecek P, Fabian S. Package “survminer” Type Package Title Drawing Survival Curves using “ggplot2.” 2019 [cited 2019 Jul 31];(1). Available from: <https://cran.r-project.org/web/packages/survminer/survminer.pdf>
8. Proust-Lima C, Philipps V, Lique B. Estimation of Extended Mixed Models Using Latent Classes and Latent Processes: The R Package lcmm [Internet]. 2017 [cited 2019 May 10]. Available from: <http://www.jstatsoft.org/v78/i02/>
Supplementary tables

Supplementary tables

Supplemental Table 1. Baseline characteristics of subgroups with or without PR data.

	Subgroup without PR data (N=89)	Subgroup with PR data (N=55)	p value
Sex ratio M/F	55.1%	60.0%	0.560
Age years	66.16 (9.11)	66.42 (7.43)	0.858
BMI kg.m⁻²	26.84 (5.32)	26.17 (5.25)	0.493
FEV₁ %pred.	65.72 (27.84)	59.23 (21.89)	0.157
FEV₁ / VC	52.27 (13.46)	53.02 (13.22)	0.808
Disease severity (GOLD)			0.568
I	29.6%	19.2%	
II	37.0%	46.2%	
III	24.7%	25.0%	
IV	8.6%	9.6%	
BODE index	2.63 (1.87)	2.65 (1.93)	0.963
6MWD m	459.82 (101.74)	445.20 (91.37)	0.427
6MWD %pred.	74.92 (17.86)	73.45 (15.76)	0.647
MRC	2.45 (1.28)	2.47 (1.22)	0.937
VQ11	25.75 (8.02)	25.16 (8.78)	0.715

Data are presented as means (SD). BMI: body mass index; FEV₁: forced expiratory volume in 1 s; VC: vital capacity; 6MWD: 6-min walking distance; %pred: % predicted; MRC: modified Medical Research Council dyspnea score; VQ11: short health-related quality of life questionnaire. Disease severity classified according to the GOLD guidelines: stage I, mild, FEV₁ >80% of predicted normal value; stage II, moderate, FEV₁ 50–79%; stage III, severe, FEV₁ 30–49%; stage IV, very severe, FEV₁ <30%.

Supplemental Table 2. Direct and indirect costs of the maintenance program for patients active in 2019.

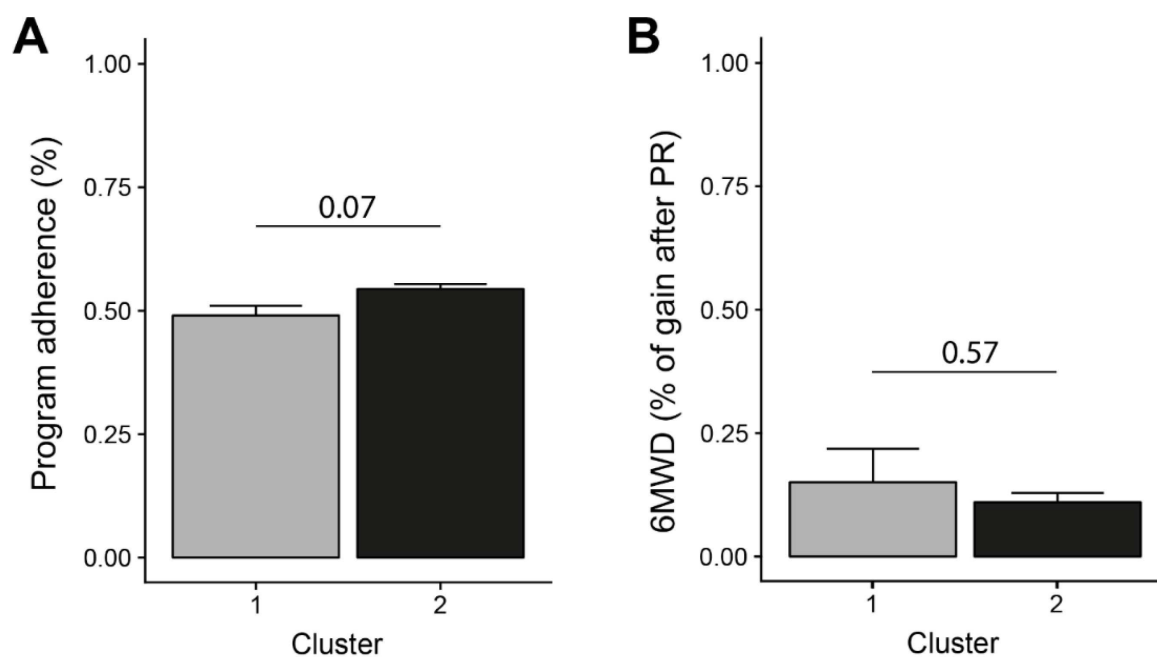
	Direct cost (€/patient/year)
Inclusion/patient evaluations	104.13
Complex case	8.38
Exercise training sessions	275.95
Discussion groups	23.23
Monitoring	31.75
Support to self-help associations	28.58
Support to professionals	156.86
TOTAL	628.88
	Indirect cost (€/patient/year)
Direction	102.82
Human resource management	13.33
Accounting	25.70
General services	215.40
TOTAL	357.00
TOTAL COST (€/patient/year)	985.88

Supplementary Table 3. Uni- and multivariate analyses of 5-year survival probability.

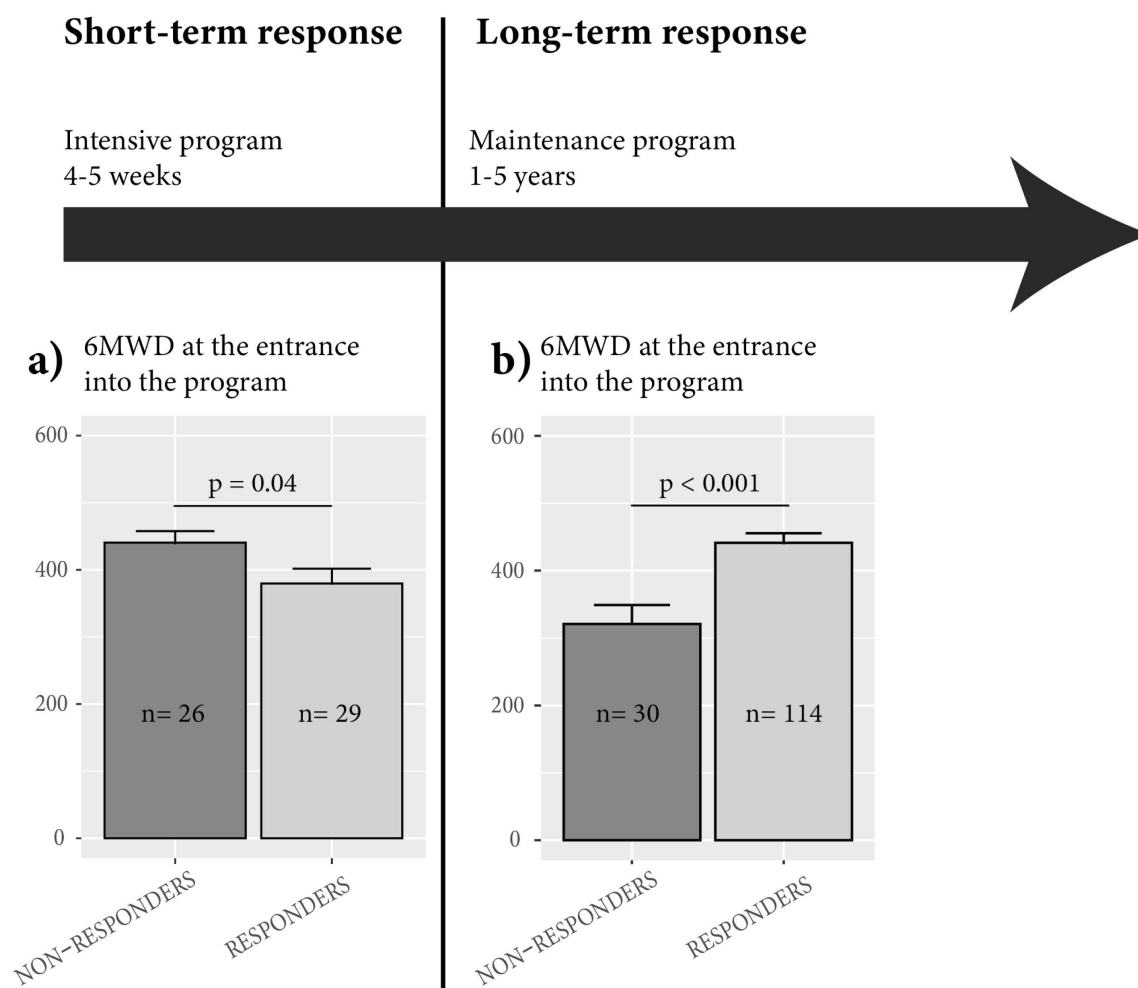
Cofunders	Univariate analysis		Multivariate analysis	
	HR	p-value	HR	p-value
Group PR only	2.9 (1.3-6.2)	0.008	3.1 (1.0-9.6)	0.045
Age years	1.1 (1-1.1)	< 0.001	-	-
Gender <i>male</i>	6.1 (2.1-17)	< 0.001	3.5 (1.2-10.7)	0.026
FEV₁ (%pred.)	0.96 (0.95-0.98)	< 0.001	-	-
FEV₁ / VC	0.95 (0.92-0.97)	< 0.001	0.95 (0.92-0.99)	0.009
Post-PR 6MWD <i>m</i>	0.99 (0.99-0.99)	< 0.001	0.99 (0.99-1.0)	< 0.001

Data are presented as HR (95% CI for HR). FEV₁: forced expiratory volume in 1 s; VC: vital capacity; 6MWD: 6-min walking distance; %pred: % predicted.

Supplementary figures



Supplemental Figure 1. Comparison of maintenance program adherence and response to initial pulmonary rehabilitation program between PR maintenance program responders and non-responders. A. Maintenance program adherence in non-responders (gray bar) and responders (black bar). B. Post-to-pre-pulmonary rehabilitation delta of 6MWD values in non-responders (gray bar) and responders (black bar).



Supplemental Figure 2. Relation between the 6-minute walking distance (6MWD) at program entrance and the response to this program for short-term PR and long-term PR maintenance program. Short-term: Responders were COPD patients with a gain of 6MWD >35 m after PR completion. Long-term: Responder and non-responder groups are set on the basis of trajectory analysis described on Figure 4 and Table 2.

LISTE DES COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

Articles scientifiques

Articles originaux

Impaired training-induced angiogenesis process with loss of pericyte-endothelium interactions is associated with an abnormal capillary remodelling in the skeletal muscle of COPD patients.

Blervaque L, Passerieux E, Pomiès P, Catteau M, Héraud N, Blaquièrre M, Bughin F, Ayoub B, Molinari N, Cristol JP, Perez-Martin A, Mercier J, Hayot M, Gouzi F.

Respir Res. 2019 Dec 5;20(1):278. doi: [10.1186/s12931-019-1240-6](https://doi.org/10.1186/s12931-019-1240-6).

Effects of a human microenvironment on the differentiation of human myoblasts.

Catteau M, Gouzi F, **Blervaque L**, Passerieux E, Blaquièrre M, Ayoub B, Bughin F, Mercier J, Hayot M, Pomiès P.

Biochem Biophys Res Commun. 2020 May 14;525(4):968-973 doi: [10.1016/j.bbrc.2020.03.020](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.03.020).

Interactive whiteboard use in clinical reasoning sessions to teach diagnostic test ordering and interpretation to undergraduate medical students.

Gouzi F, Hédon C, **Blervaque L**, Passerieux E, Kuster N, Pujol T, Mercier J, Hayot M.

BMC Med Educ. 2019 Nov 15;19(1):424. doi: [10.1186/s12909-019-1834-1](https://doi.org/10.1186/s12909-019-1834-1).

COPD is deleterious for pericytes: implications during training-induced angiogenesis in skeletal muscle.

L Blervaque, Pascal Pomiès, Elisa Rossi, Matthias Catteau, Adeline Blandinières, Emilie Passerieux, Marine Blaquièrre, Bronia Ayoub, Nicolas Molinari, Jacques Mercier, Antonia Perez-Martin, Nicola Marchi, David M. Smadja, Maurice Hayot, Fares Gouzi.

En révision

Efficiency of a long-term pulmonary rehabilitation maintenance program for COPD patients in real-life setting – Up to 5 years follow-up.

Léo Blervaque, Christian Préfaut, Hélène Forthin, Francis Maffre, Marion Bourrelier, Nelly Héraud, Matthias Catteau, Pascal Pomiès, Dany Jaffuel, Nicolas Molinari, Maurice Hayot, Fares Gouzi.

Soumis

Articles de revue

ERS International Congress, Madrid, 2019: highlights from the General Pneumology Assembly.

Vanfleteren LEGW, **Blervaque L**, Franssen FME, Daines L, Kocks JWH, Honkoop PJ, Poberezhets V.

ERJ Open Res. 2020 Mar 2;6(1):00323-2019. doi: [10.1183/23120541.00323-2019](https://doi.org/10.1183/23120541.00323-2019)

Communications en congrès

Communications orales

A 7-year pulmonary rehabilitation maintenance program: Benefits for exercise tolerance, dyspnea and quality of life in patients with obstructive lung disease.

L. Blervaque, Christian Préfaut, Hélène Forthin, Francis Maffre, Matthias Catteau, Pascal Pomiès, Nicolas Molinari, Maurice Hayot, Fares Gouzi.

European respiratory society (ERS) international congress, Madrid 2019.

Défaut de maturation capillaire au cours du réentraînement à l'effort chez le patient BPCO – étude de l'ultrastructure capillaire musculaire.

L. Blervaque, E. Passerieux, M. Catteau, P. Pomiès, N. Héraud, A. Pérez-Martin, M. Blaquièrre, F. Bughin, B. Ayoub, N. Molinari, J. Mercier, M. Hayot, F. Gouzi.

23^{ème} CPLF / Marseille – Janvier 2019.

Pericyte coverage of skeletal muscle capillaries is impaired during training-induced angiogenesis in COPD patients.

L. Blervaque, P. Pomiès, M. Catteau, E. Passerieux, B. Ayoub, M. Blaquièrre, L. Ducros, F. Bughin, N. Molinari, J. Mercier, M. Hayot, F. Gouzi.

European respiratory society (ERS) international congress, Paris 2018.

Défaut de couverture péricytaire capillaire au cours de l'angiogenèse musculaire induite par le réentraînement à l'effort chez le patient BPCO.

L. Blervaque, P. Pomiès, M. Catteau, E. Passerieux, B. Ayoub, M. Blaquièrre, L. Ducros, F. Bughin, N. Molinari, J. Mercier, M. Hayot, F. Gouzi.

22^{ème} CPLF / Lyon – Janvier 2018.

Communications affichées

Efficiency of a pragmatic pulmonary rehabilitation maintenance program in patients with obstructive lung disease – A 7 years follow-up study.

Léo Blervaque, Christian Préfaut, Hélène Forthin, Francis Maffre, Matthias Catteau, Pascal Pomiès, Nicolas Molinari, Maurice Hayot, Fares Gouzi.

3^{ème} congrès de la SPBI/ Montpellier – Juin 2019

Bénéfices d'un programme de post-réhabilitation au long cours sur le maintien de la tolérance à l'effort, de la dyspnée et de la qualité de vie de patients MBPOC.

Léo Blervaque, Christian Préfaut, Hélène Forthin, Francis Maffre, Matthias Catteau, Pascal Pomiès, Nicolas Molinari, Maurice Hayot, Fares Gouzi.

7^{ème} congrès ICEPS / Montpellier – Mars 2019

BIBLIOGRAPHIE

- Agnoletti, L., Curello, S., Bachetti, T., Malacarne, F., Gaia, G., Comini, L., Volterrani, M., Bonetti, P., Parrinello, G., Cadei, M., Grigolato, P. G., & Ferrari, R. (1999). Serum From Patients With Severe Heart Failure Downregulates eNOS and Is Proapoptotic. *Circulation*, *100*(19), 1983–1991. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.100.19.1983>
- Alarcon-Martinez, L., Yilmaz-Ozcan, S., Yemisci, M., Schallek, J., Kılıç, K., Can, A., Di Polo, A., & Dalkara, T. (2018). Capillary pericytes express α -smooth muscle actin, which requires prevention of filamentous-actin depolymerization for detection. *ELife*, *7*, e34861. <https://doi.org/10.7554/eLife.34861>
- Aldabayan, Y. S., Alrajeh, A. M., Lemson, A., & Hurst, J. R. (2017). Pulmonary rehabilitation and cardiovascular risk in COPD: a systematic review. *COPD Research and Practice*, *3*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s40749-017-0026-9>
- Almaça, J., Weitz, J., Rodriguez-Diaz, R., Pereira, E., & Caicedo, A. (2018). The Pericyte of the Pancreatic Islet Regulates Capillary Diameter and Local Blood Flow. *Cell Metabolism*, *27*(3), 630-644.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.02.016>
- Alpaydin, A. O., Arslan, I. K., Serter, S., Coskun, A. S., Celik, P., Taneli, F., & Yorgancioglu, A. (2013). Metabolic syndrome and carotid intima-media thickness in chronic obstructive pulmonary disease. *Multidisciplinary Respiratory Medicine*, *8*(9). <https://doi.org/10.1186/2049-6958-8-61>
- Andersen, P., & Henriksson, J. (1977). Capillary supply of the quadriceps femoris muscle of man: adaptive response to exercise. *The Journal of Physiology*, *270*(3), 677–690. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1977.sp011975>
- Ando, K., Kaneko, N., Doi, T., Aoshima, M., & Takahashi, K. (2014). Prevalence and risk factors of aortic aneurysm in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of Thoracic Disease*, *6*(10), 1388–1395. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2072-1439.2014.10.01>
- Arany, Z., Foo, S. Y., Ma, Y., Ruas, J. L., Bommi-Reddy, A., Girnun, G., Cooper, M., Laznik, D., Chinsomboon, J., Rangwala, S. M., Baek, K. H., Rosenzweig, A., & Spiegelman, B. M. (2008). HIF-independent regulation of VEGF and angiogenesis by the transcriptional coactivator PGC-1 α . *Nature*, *451*(7181), 1008–1012. <https://doi.org/10.1038/nature06613>
- Archer, J. R. H., & Baker, E. H. (2009). Diabetes and metabolic dysfunction in COPD. In *Respiratory Medicine: COPD Update*. <https://doi.org/10.1016/j.rmedu.2009.10.001>
- Armulik, A., Genové, G., Mäe, M., Nisancioglu, M. H., Wallgard, E., Niaudet, C., He, L., Norlin, J., Lindblom, P., Strittmatter, K., Johansson, B. R., & Betsholtz, C. (2010). Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature*, *468*(7323), 557–561. <https://doi.org/10.1038/nature09522>
- Ash, J. D., & Overbeek, P. A. (2000). Lens-specific VEGF-A expression induces angioblast migration and proliferation and stimulates angiogenic remodeling. *Developmental Biology*, *223*(2), 383–398. <https://doi.org/10.1006/dbio.2000.9755>
- Attrill, E., Ramsay, C., Ross, R., Richards, S., Sutherland, B. A., Keske, M. A., Eringa, E., & Premilovac, D. (2019). Metabolic-vascular coupling in skeletal muscle: A potential role for capillary pericytes? *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, *July 2019*, 520–528. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.13208>
- Attrill, E., Ramsay, C., Ross, R., Richards, S., Sutherland, B. A., Keske, M. A., Eringa, E., & Premilovac, D. (2020). Metabolic-vascular coupling in skeletal muscle: A potential role for capillary pericytes? *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, *47*(3), 520–528. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.13208>
- Augustin, H. G., Young Koh, G., Thurston, G., & Alitalo, K. (2009). Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin - Tie system. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *10*(3), 165–177. <https://doi.org/10.1038/nrm2639>
- Bafadhel, M., Pavord, I. D., & Russell, R. E. K. (2017). Eosinophils in COPD: just another biomarker? In *The Lancet Respiratory Medicine* (Vol. 5, Issue 9, pp. 747–759). Lancet Publishing Group.

[https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(17\)30217-5](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(17)30217-5)

- Bals, R., Boyd, J., Esposito, S., Foronjy, R., Hiemstra, P. S., Jiménez-Ruiz, C. A., Katsaounou, P., Lindberg, A., Metz, C., Schober, W., Spira, A., & Blasi, F. (2019). Electronic cigarettes: A task force report from the European Respiratory Society. In *European Respiratory Journal* (Vol. 53, Issue 2). European Respiratory Society. <https://doi.org/10.1183/13993003.01151-2018>
- Barnes, P. J. (2000). CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE. *New England Journal of Medicine*, 343(4), 269–280. <https://doi.org/10.1056/NEJM200007273430407>
- Baum, O., Bernd, J., Becker, S., Odriozola, A., Zuber, B., Tschanz, S. A., Zakrzewicz, A., Egginton, S., & Berkholtz, J. (2020). Structural Microangiopathies in Skeletal Muscle Related to Systemic Vascular Pathologies in Humans. *Frontiers in Physiology*, 11(February), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00028>
- Baum, O., & Bigler, M. (2016). Pericapillary basement membrane thickening in human skeletal muscles. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 311(3), H654–H666. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00048.2016>
- Baum, O., Gübeli, J., Frese, S., Torchetti, E., Malik, C., Odriozola, A., Graber, F., Hoppeler, H., & Tschanz, S. A. (2015). Angiogenesis-related ultrastructural changes to capillaries in human skeletal muscle in response to endurance exercise. *Journal of Applied Physiology*, 119(10), 1118–1126. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00594.2015>
- Baum, O., Torchetti, E., Malik, C., Hoier, B., Walker, M., Walker, P. J., Odriozola, A., Graber, F., Tschanz, S. A., Bangsbo, J., Hoppeler, H., Askew, C. D., & Hellsten, Y. (2016). Capillary ultrastructure and mitochondrial volume density in skeletal muscle in relation to reduced exercise capacity of patients with intermittent claudication. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 310(10), R943–R951. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00480.2015>
- Beck, D. T., Martin, J. S., Casey, D. P., & Braith, R. W. (2013). Exercise Training Reduces Peripheral Arterial Stiffness and Myocardial Oxygen Demand in Young Prehypertensive Subjects. *American Journal of Hypertension*, 26(9), 1093. <https://doi.org/10.1093/ajh/hpt080>
- Behnke, Brad J., Barstow, T. J., Kindig, C. A., McDonough, P., Musch, T. I., & Poole, D. C. (2002). Dynamics of oxygen uptake following exercise onset in rat skeletal muscle. *Respiratory Physiology and Neurobiology*, 133(3), 229–239. [https://doi.org/10.1016/S1569-9048\(02\)00183-0](https://doi.org/10.1016/S1569-9048(02)00183-0)
- Behnke, Bradley J., & Delp, M. D. (2010). Aging blunts the dynamics of vasodilation in isolated skeletal muscle resistance vessels. *Journal of Applied Physiology*, 108(1), 14–20. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00970.2009>
- Bell, M. L., Kenward, M. G., Fairclough, D. L., & Horton, N. J. (2013). Differential dropout and bias in randomised controlled trials: when it matters and when it may not. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 346. <https://doi.org/10.1136/bmj.e8668>
- Benjamin, L. E., Hemo, I., & Keshet, E. (1998). A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. In *Development (Cambridge, England)* (Vol. 125, Issue 9). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9521897>
- Bergers, G., & Song, S. (2005). The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro-Oncology*, 7(4), 452–464. <https://doi.org/10.1215/s1152851705000232>
- Bhatt, S. P., Balte, P. P., Schwartz, J. E., Cassano, P. A., Couper, D., Jacobs, D. R., Kalhan, R., O'Connor, G. T., Yende, S., Sanders, J. L., Umans, J. G., Dransfield, M. T., Chaves, P. H., White, W. B., & Oelsner, E. C. (2019). Discriminative Accuracy of FEV1:FVC Thresholds for COPD-Related Hospitalization and Mortality. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 321(24), 2438–2447. <https://doi.org/10.1001/jama.2019.7233>
- Bigler, M., Koutsantonis, D., Odriozola, A., Halm, S., Tschanz, S. A., Zakrzewicz, A., Weichert, A., & Baum, O. (2016). Morphometry of skeletal muscle capillaries: the relationship between capillary ultrastructure and

- ageing in humans. *Acta Physiologica*, 218(2), 98–111. <https://doi.org/10.1111/apha.12709>
- Bjarnegård, M., Enge, M., Norlin, J., Gustafsdottir, S., Fredriksson, S., Abramsson, A., Takemoto, M., Gustafsson, E., Fässler, R., & Betsholtz, C. (2004). Endothelium-specific ablation of PDGFB leads to pericyte loss and glomerular, cardiac and placental abnormalities. *Development*, 131(8), 1847–1857. <https://doi.org/10.1242/dev.01080>
- Blanco, I., Diego, I., Bueno, P., Casas-Maldonado, F., & Miravittles, M. (2019). Geographic distribution of COPD prevalence in the world displayed by Geographic Information System maps. *The European Respiratory Journal*, 54(1). <https://doi.org/10.1183/13993003.00610-2019>
- Blervaque, L., Passerieux, E., Pomiès, P., Catteau, M., Héraud, N., Blaquièrre, M., Bughin, F., Ayoub, B., Molinari, N., Cristol, J.-P., Perez-Martin, A., Mercier, J., Hayot, M., & Gouzi, F. (2019). Impaired training-induced angiogenesis process with loss of pericyte-endothelium interactions is associated with an abnormal capillary remodelling in the skeletal muscle of COPD patients. *Respiratory Research*, 20(1), 278. <https://doi.org/10.1186/s12931-019-1240-6>
- Blood, C. H., & Zetter, B. R. (1990). Tumor interactions with the vasculature: angiogenesis and tumor metastasis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1032(1), 89–118. [https://doi.org/10.1016/0304-419x\(90\)90014-r](https://doi.org/10.1016/0304-419x(90)90014-r)
- Bolton, C. E., Stone, M. D., Edwards, P. H., Duckers, J. M., Evans, W. D., & Shale, D. J. (2009). *Circulating matrix metalloproteinase-9 and osteoporosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease*. *Chronic Respiratory Disease*. <https://doi.org/10.1177/1479972309103131>
- Bowles, D. K., Laughlin, M. H., & Sturek, M. (1995). Exercise training alters the Ca²⁺ and contractile responses of coronary arteries to endothelin. *Journal of Applied Physiology*, 78(3), 1079–1087. <https://doi.org/10.1152/jap.1995.78.3.1079>
- Brevetti, G., Silvestro, A., Schiano, V., & Chiariello, M. (2003). Endothelial Dysfunction and Cardiovascular Risk Prediction in Peripheral Arterial Disease: Additive Value of Flow-Mediated Dilation to Ankle-Brachial Pressure Index. *Circulation*, 108(17), 2093–2098. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000095273.92468.D9>
- Brew, K., & Nagase, H. (2010). The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): An ancient family with structural and functional diversity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1803(1), 55–71. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2010.01.003>
- Brightling, C. E., Monteiro, W., Ward, R., Parker, D., Morgan, M. D. L., Wardlaw, A. J., & Pavord, I. D. (2000). Sputum eosinophilia and short-term response to prednisolone in chronic obstructive pulmonary disease: A randomised controlled trial. *Lancet*, 356(9240), 1480–1485. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)02872-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02872-5)
- Brønstad, E., Tjonna, A. E., Rognmo, Ø., Dalen, H., Heggli, A. M., Wisloff, U., Ingul, C. B., & Steinshamn, S. (2013). Aerobic exercise training improves right- and left ventricular systolic function in patients with COPD. *COPD: Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, 10(3), 300–306. <https://doi.org/10.3109/15412555.2012.745843>
- Broxterman, R. M., Hoff, J., Wagner, P. D., & Richardson, R. S. (2020). Determinants of the diminished exercise capacity in patients with chronic obstructive pulmonary disease: looking beyond the lungs. *Journal of Physiology*, 598(3), 599–610. <https://doi.org/10.1113/JP279135>
- Brzycki, M. (1993). Strength Testing—Predicting a One-Rep Max from Reps-to-Fatigue. *Journal of Physical Education, Recreation & Dance*, 64(1), 88–90. <https://doi.org/10.1080/07303084.1993.10606684>
- Burnley, M., & Jones, A. M. (2007). Oxygen uptake kinetics as a determinant of sports performance. *European Journal of Sport Science*, 7(2), 63–79. <https://doi.org/10.1080/17461390701456148>
- Cacicedo, J. M., Benjachareowong, S., Chou, E., Ruderman, N. B., & Ido, Y. (2005). Palmitate-induced apoptosis in cultured bovine retinal pericytes: Roles of NAD(P)H oxidase, oxidant stress, and ceramide. *Diabetes*, 54(6), 1838–1845. <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.6.1838>

- Canavan, J. L., Kaliaraju, D., Nolan, C. M., Clark, A. L., Jones, S. E., Kon, S. S. C., Polkey, M. I., & Man, W. D. C. (2015). Does pulmonary rehabilitation reduce peripheral blood pressure in patients with chronic obstructive pulmonary disease? *Chronic Respiratory Disease*, *12*(3), 256–263. <https://doi.org/10.1177/1479972315587515>
- Caporali, A., Meloni, M., Nailor, A., Mitić, T., Shantikumar, S., Riu, F., Sala-Newby, G. B., Rose, L., Besnier, M., Katare, R., Voellenkle, C., Verkade, P., Martelli, F., Madeddu, P., & Emanuelli, C. (2015). p75NTR-dependent activation of NF- κ B regulates microRNA-503 transcription and pericyte–endothelial crosstalk in diabetes after limb ischaemia. *Nature Communications*, *6*(1), 8024. <https://doi.org/10.1038/ncomms9024>
- Carmeli, E., Moas, M., Reznick, A. Z., & Coleman, R. (2004). Matrix metalloproteinases and skeletal muscle: A brief review. *Muscle and Nerve*, *29*(2), 191–197. <https://doi.org/10.1002/mus.10529>
- Carmeliet, P., & Jain, R. K. (2011a). Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*, *473*(7347), 298–307. <https://doi.org/10.1038/nature10144>
- Carmeliet, P., & Jain, R. K. (2011b). Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*, *473*(7347), 298–307. <https://doi.org/10.1038/nature10144>
- Carmeliet, P., & Jain, R. K. (2011c). Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. In *Nature* (Vol. 473, Issue 7347, pp. 298–307). <https://doi.org/10.1038/nature10144>
- Casanova, C., Cote, C., Marin, J. M., Pinto-Plata, V., De Torres, J. P., Aguirre-Jáime, A., Vassaux, C., & Celli, B. R. (2008). Distance and oxygen desaturation during the 6-min walk test as predictors of long-term mortality in patients with COPD. *Chest*, *134*(4), 746–752. <https://doi.org/10.1378/chest.08-0520>
- Castagna, O., Boussuges, A., Nussbaum, E., Marqueste, L., & Brisswalter, J. (2008). Peripheral arterial disease: an underestimated aetiology of exercise intolerance in chronic obstructive pulmonary disease patients. *European Journal of Cardiovascular Prevention and Rehabilitation : Official Journal of the European Society of Cardiology, Working Groups on Epidemiology & Prevention and Cardiac Rehabilitation and Exercise Physiology*, *15*(3), 270–277. <https://doi.org/10.1097/HJR.0b013e3282f009a9>
- Cau, S. B. A., Carneiro, F. S., & Tostes, R. C. (2012). Differential modulation of nitric oxide synthases in aging: Therapeutic opportunities. *Frontiers in Physiology*, *3* JUN(June), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00218>
- Celli, B. R., MacNee, W., Agusti, A., Anzueto, A., Berg, B., Buist, A. S., Calverley, P. M. A., Chavannes, N., Dillard, T., Fahy, B., Fein, A., Heffner, J., Lareau, S., Meek, P., Martinez, F., McNicholas, W., Muris, J., Austegard, E., Pauwels, R., ... ZuWallack, R. (2004). Standards for the diagnosis and treatment of patients with COPD: A summary of the ATS/ERS position paper. In *European Respiratory Journal* (Vol. 23, Issue 6, pp. 932–946). European Respiratory Society. <https://doi.org/10.1183/09031936.04.00014304>
- Chen, F., Liu, Q., Zhang, Z. D., & Zhu, X. H. (2013). Co-Delivery of G-CSF and EPO Released From Fibrin Gel for Therapeutic Neovascularization in Rat Hindlimb Ischemia Model. *Microcirculation*, *20*(5), 416–424. <https://doi.org/10.1111/micc.12037>
- Chen, L., Wang, L., Li, Y., Wuang, L., Liu, Y., Pang, N., Luo, Y., He, J., Zhang, L., Chen, N., Li, R., & Wu, J. (2018). Transplantation of Normal Adipose Tissue Improves Blood Flow and Reduces Inflammation in High Fat Fed Mice With Hindlimb Ischemia. *Frontiers in Physiology*, *9*, 197. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00197>
- Chen, W., Thomas, J., Sadatsafavi, M., & FitzGerald, J. M. (2015). Risk of cardiovascular comorbidity in patients with chronic obstructive pulmonary disease: A systematic review and meta-analysis. *The Lancet Respiratory Medicine*, *3*(8), 631–639. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(15\)00241-6](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(15)00241-6)
- Chen, Z., Peng, I. C., Cui, X., Li, Y. S., Chien, S., & Shyy, J. Y. J. (2010). Shear stress, SIRT1, and vascular homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(22), 10268–10273. <https://doi.org/10.1073/pnas.1003833107>
- Chiappa, G. R., Borghi-Silva, A., Ferreira, L. F., Carrascosa, C., Oliveira, C. C., Maia, J., Gimenes, A. C., Queiroga, F., Berton, D., Ferreira, E. M. V., Nery, L. E., & Neder, J. A. (2008). Kinetics of muscle deoxygenation are

- accelerated at the onset of heavy-intensity exercise in patients with COPD: Relationship to central cardiovascular dynamics. *Journal of Applied Physiology*, 104(5), 1341–1350. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01364.2007>
- Chinsomboon, J., Ruas, J., Gupta, R. K., Thom, R., Shoag, J., Rowe, G. C., Sawada, N., Raghuram, S., & Arany, Z. (2009). The transcriptional coactivator PGC-1 α mediates exercise-induced angiogenesis in skeletal muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(50), 21401–21406. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909131106>
- Clarenbach, C. F., Senn, O., Sievi, N. A., Camen, G., Van Gestel, A. J. R., Rossi, V. A., Puhan, M. A., Thurnheer, R., Russi, E. W., & Kohler, M. (2013). Determinants of endothelial function in patients with COPD. *European Respiratory Journal*, 42(5), 1194–1204. <https://doi.org/10.1183/09031936.00144612>
- Clément, N., Gueguen, M., Glorian, M., Blaise, R., Andréani, M., Brou, C., Bausero, P., & Limon, I. (2007). Notch3 and IL-1 β exert opposing effects on a vascular smooth muscle cell inflammatory pathway in which NF- κ B drives crosstalk. *Journal of Cell Science*, 120(19), 3352–3361. <https://doi.org/10.1242/jcs.007872>
- Cohen, K. D., Berg, B. R., & Sarelus, I. H. (2000). Remote arteriolar dilations in response to muscle contraction under capillaries. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 278(6 47-6). <https://doi.org/10.1152/ajpheart.2000.278.6.h1916>
- Cohen, K. D., & Sarelus, I. H. (2002). Muscle contraction under capillaries in hamster muscle induces arteriolar dilatation via KATP channels and nitric oxide. *Journal of Physiology*, 539(2), 547–555. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2001.013388>
- Copp, S. W., Ferreira, L. F., Herspring, K. F., Musch, T. I., & Poole, D. C. (2009). The effects of aging on capillary hemodynamics in contracting rat spinotrapezius muscle. *Microvascular Research*, 77(2), 113–119. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2008.11.001>
- Corretti, M. C., Anderson, T. J., Benjamin, E. J., Celermajer, D., Charbonneau, F., Creager, M. A., Deanfield, J., Drexler, H., Gerhard-Herman, M., Herrington, D., Vallance, P., Vita, J., & Vogel, R. (2002). Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: A report of the international brachial artery reactivity task force. *Journal of the American College of Cardiology*, 39(2), 257–265. [https://doi.org/10.1016/S0735-1097\(01\)01746-6](https://doi.org/10.1016/S0735-1097(01)01746-6)
- Costes, F., Gosker, H., Feasson, L., Desgeorges, M., Kelders, M., Castells, J., Schols, A., & Freyssenet, D. (2015). Impaired exercise training-induced muscle fiber hypertrophy and Akt/mTOR pathway activation in hypoxemic patients with COPD. *Journal of Applied Physiology*, 118(8), 1040–1049. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00557.2014>
- Csoma, B., Bikov, A., Nagy, L., Tóth, B., Tábi, T., Szucs, G., Komlósi, Z. I., Müller, V., Losonczy, G., & Lázár, Z. (2019). Dysregulation of the endothelial nitric oxide pathway is associated with airway inflammation in COPD. *Respiratory Research*, 20(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12931-019-1133-8>
- De Marco, R., Accordini, S., Marcon, A., Cerveri, I., Antó, J. M., Gislason, T., Heinrich, J., Janson, C., Jarvis, D., Kuenzli, N., Leynaert, B., Sunyer, J., Svanes, C., Wjst, M., & Burney, P. (2011). Risk factors for chronic obstructive pulmonary disease in a European cohort of young adults. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 183(7), 891–897. <https://doi.org/10.1164/rccm.201007-1125OC>
- de Oca, M. M., Torres, S. H., De Sanctis, J., Mata, A., Hernández, N., Tálamo, C., Montes de Oca, M., Torres, S. H., De Sanctis, J., Mata, A., Hernández, N., & Tálamo, C. (2005). Skeletal muscle inflammation and nitric oxide in patients with COPD. *European Respiratory Journal*, 26(3), 390–397. <https://doi.org/10.1183/09031936.05.00107404>
- Denninger, J. W., & Marletta, M. A. (1999). Guanylate cyclase and the .NO/cGMP signaling pathway. In *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* (Vol. 1411, Issues 2–3, pp. 334–350). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(99\)00024-9](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(99)00024-9)
- Di Marco, E., Gray, S. P., & Jandeleit-Dahm, K. (2013). Diabetes alters activation and repression of pro- and anti-inflammatory signaling pathways in the vasculature. In *Frontiers in Endocrinology* (Vol. 4, Issue JUN, p. 68).

- Diab, N., Gershon, A. S., Sin, D. D., Tan, W. C., Bourbeau, J., Boulet, L. P., & Aaron, S. D. (2018). Underdiagnosis and overdiagnosis of chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *198*(9), 1130–1139. <https://doi.org/10.1164/rccm.201804-0621CI>
- Doucet, M., Russell, A. P., Léger, B., Debigaré, R., Joannisse, D. R., Caron, M. A., LeBlanc, P., & Maltais, F. (2007). Muscle atrophy and hypertrophy signaling in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *176*(3), 261–269. <https://doi.org/10.1164/rccm.200605-704OC>
- Duricki, D. A., Soleman, S., & Moon, L. D. F. (2016). Analysis of longitudinal data from animals with missing values using SPSS. *Nature Protocols*, *11*(6), 1112–1129. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.048>
- Edwards, D. G., Schofield, R. S., Lennon, S. L., Pierce, G. L., Nichols, W. W., & Braith, R. W. (2004a). Effect of exercise training on endothelial function in men with coronary artery disease. *American Journal of Cardiology*, *93*(5), 617–620. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2003.11.032>
- Edwards, D. G., Schofield, R. S., Lennon, S. L., Pierce, G. L., Nichols, W. W., & Braith, R. W. (2004b). Effect of exercise training on endothelial function in men with coronary artery disease. *American Journal of Cardiology*, *93*(5), 617–620. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2003.11.032>
- Egginton, S., Zhou, A. L., Brown, M. D., & Hudlická, O. (2001). Unorthodox angiogenesis in skeletal muscle. *Cardiovascular Research*, *49*(3), 634–646. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(00\)00282-0](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(00)00282-0)
- Ejaz, S. (2007). Importance of pericytes and mechanisms of pericyte loss during diabetes retinopathy. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, *0*(0), 071018044430008-???. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2007.00795.x>
- Eliason, G., Abdel-Halim, S. M., Piehl-Aulin, K., & Kadi, F. (2010). Alterations in the muscle-to-capillary interface in patients with different degrees of chronic obstructive pulmonary disease. *Respiratory Research*, *11*(1), 97. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-11-97>
- Farah, C., Michel, L. Y. M., & Balligand, J. L. (2018). Nitric oxide signalling in cardiovascular health and disease. *Nature Reviews Cardiology*, *15*(5), 292–316. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2017.224>
- Féléto, M., & VanHoutte, P. M. (2009). EDHF: An update. *Clinical Science*, *117*(4), 139–155. <https://doi.org/10.1042/CS20090096>
- Fernandez-Cobo, M., Gingalewski, C., Drujan, D., & De Maio, A. (1999). Downregulation of connexin 43 gene expression in rat heart during inflammation. The role of tumour necrosis factor. *Cytokine*, *11*(3), 216–224. <https://doi.org/10.1006/cyto.1998.0422>
- Finkelstein, J., Cha, E., & Scharf, S. M. (2009). Chronic obstructive pulmonary disease as an independent risk factor for cardiovascular morbidity. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, *4*, 337–349. <https://doi.org/10.2147/copd.s6400>
- Fischer, B. M., Pavlisko, E., & Voynow, J. A. (2011). Pathogenic triad in COPD: Oxidative stress, protease-antiprotease imbalance, and inflammation. In *International Journal of COPD* (Vol. 6, Issue 1, pp. 413–421). Dove Press. <https://doi.org/10.2147/COPD.S10770>
- Fletcher, C. M., Elmes, P., Fairbairn, A., & Wood, C. (1959). The Significance of Respiratory Symptoms and the. *British Medical Journal*, *Aug 29*, 257–266.
- Fukada, K., & Kajiya, K. (2020a). Age-related structural alterations of skeletal muscles and associated capillaries. In *Angiogenesis*. Springer. <https://doi.org/10.1007/s10456-020-09705-1>
- Fukada, K., & Kajiya, K. (2020b). Age-related structural alterations of skeletal muscles and associated capillaries. In *Angiogenesis* (pp. 1–4). Springer. <https://doi.org/10.1007/s10456-020-09705-1>
- Gagnon, P., Lemire, B. B., Dubé, A., Saey, D., Porlier, A., Croteau, M., Provencher, S., Debigaré, R., Maltais, F., P, G., BB, L., A, D., D, S., A, P., M, C., S, P., R, D., F, M., Gagnon, P., ... F, M. (2014). Preserved function and

- reduced angiogenesis potential of the quadriceps in patients with mild COPD. *Respiratory Research*, 15(1), 1465–9921. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-15-4>
- Gan, W. Q., Man, S. F. P., Senthilselvan, A., & Sin, D. D. (2004). Association between chronic obstructive pulmonary disease and systemic inflammation: A systematic review and a meta-analysis. *Thorax*, 59(7), 574–580. <https://doi.org/10.1136/thx.2003.019588>
- García-Quintans, N., Sánchez-Ramos, C., Prieto, I., Tierrez, A., Arza, E., Alfranca, A., Redondo, J. M., & Monsalve, M. (2016). Oxidative stress induces loss of pericyte coverage and vascular instability in PGC-1 α -deficient mice. *Angiogenesis*, 19(2), 217–228. <https://doi.org/10.1007/S10456-016-9502-0>
- Gayeski, T. E. J., Connett, R. J., & Honig, C. R. (1987). Minimum intracellular Po₂ for maximum cytochrome turnover in red muscle in situ. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 252(5) (21/5)). <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1987.252.5.h906>
- Gelinas, J. C., Lewis, N. C., Harper, M. I., Melzer, B., Agar, G., Rolf, J. D., & Eves, N. D. (2017). Aerobic exercise training does not alter vascular structure and function in chronic obstructive pulmonary disease. *Experimental Physiology*, 102(11), 1548–1560. <https://doi.org/10.1113/EP086379>
- Gershon, A. S., Thiruchelvam, D., Chapman, K. R., Aaron, S. D., Stanbrook, M. B., Bourbeau, J., Tan, W., & To, T. (2018). Health Services Burden of Undiagnosed and Overdiagnosed COPD. *Chest*, 153(6), 1336–1346. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2018.01.038>
- Gianni-Barrera, R., Burger, M., Wolff, T., Heberer, M., Schaefer, D. J., Gürke, L., Mujagic, E., & Banfi, A. (2016). Long-term safety and stability of angiogenesis induced by balanced single-vector co-expression of PDGF-BB and VEGF 164 in skeletal muscle. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep21546>
- Gibson, G. J., Lodenkemper, R., Lundbäck, B., & Sibille, Y. (2013). Respiratory health and disease in Europe: The new European Lung White Book. In *European Respiratory Journal* (Vol. 42, Issue 3, pp. 559–563). <https://doi.org/10.1183/09031936.00105513>
- Gliemann, L., Buess, R., Nyberg, M., Hoppeler, H., Odriozola, A., Thaning, P., Hellsten, Y., Baum, O., & Mortensen, S. P. (2015). Capillary growth, ultrastructure remodelling and exercise training in skeletal muscle of essential hypertensive patients. *Acta Physiologica*, 214(2), 210–220. <https://doi.org/10.1111/apha.12501>
- Gokce, N., Keaney, J. F., Hunter, L. M., Watkins, M. T., Nedeljkovic, Z. S., Menzoian, J. O., & Vita, J. A. (2003). Predictive value of noninvasively determined endothelial dysfunction for long-term cardiovascular events in patients with peripheral vascular disease. *Journal of the American College of Cardiology*, 41(10), 1769–1775. [https://doi.org/10.1016/S0735-1097\(03\)00333-4](https://doi.org/10.1016/S0735-1097(03)00333-4)
- Gouzi, F., Blaquièrre, M., Catteau, M., Bughin, F., Maury, J., Passerieux, E., Ayoub, B., Mercier, J., Hayot, M., & Pomiès, P. (2018). Oxidative stress regulates autophagy in cultured muscle cells of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of Cellular Physiology*, 233(12), 9629–9639. <https://doi.org/10.1002/jcp.26868>
- Gouzi, F., Maury, J., Bughin, F., Blaquièrre, M., Ayoub, B., Mercier, J., Perez-Martin, A., Pomiès, P., & Hayot, M. (2016a). Impaired training-induced adaptation of blood pressure in COPD patients: Implication of the muscle capillary bed. *International Journal of COPD*, 11(1), 2349–2357. <https://doi.org/10.2147/COPD.S113657>
- Gouzi, F., Maury, J., Bughin, F., Blaquièrre, M., Ayoub, B., Mercier, J., Perez-Martin, A., Pomiès, P., & Hayot, M. (2016b). Impaired training-induced adaptation of blood pressure in COPD patients: Implication of the muscle capillary bed. *International Journal of COPD*, 11(1), 2349–2357. <https://doi.org/10.2147/COPD.S113657>
- Gouzi, F., Préfaut, C., Abdellaoui, A., Roudier, E., De Rigal, P., Molinari, N., Laoudj-Chenivesse, D., Mercier, J., Birot, O., & Hayot, M. (2013). Blunted muscle angiogenic training response in COPD patients versus sedentary controls. *European Respiratory Journal*, 41(4), 806–814. <https://doi.org/10.1183/09031936.00053512>

- Graz, Y., Perrenoud, J. J., & Gaspoz, J. M. (2009). Interprétation du test d'effort par le médecin de premier recours. *Revue Medicale Suisse*, 5(218), 1895–1899.
- Green, D. J., Dawson, E. A., Groenewoud, H. M. M., Jones, H., & Thijssen, D. H. J. (2014). Is flow-mediated dilation nitric oxide mediated?: A meta-analysis. *Hypertension*, 63(2), 376–382. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.02044>
- Green, D. J., Jones, H., Thijssen, D., Cable, N. T., & Atkinson, G. (2011). Flow-mediated dilation and cardiovascular event prediction: Does nitric oxide matter? *Hypertension*, 57(3), 363–369. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.167015>
- Green, D. J., Maiorana, A., O'Driscoll, G., & Taylor, R. (2004). Effect of exercise training on endothelium-derived nitric oxide function in humans. *Journal of Physiology*, 561(1), 1–25. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.068197>
- Greenberg, J. I., Shields, D. J., Barillas, S. G., Acevedo, L. M., Murphy, E., Huang, J., Schepke, L., Stockmann, C., Johnson, R. S., Angle, N., & Cheresch, D. A. (2008). A role for VEGF as a negative regulator of pericyte function and vessel maturation. *Nature*, 456(7223), 809–814. <https://doi.org/10.1038/nature07424>
- Griendling, K. K., & FitzGerald, G. A. (2003). Oxidative Stress and Cardiovascular Injury Part I: Basic Mechanisms and In Vivo Monitoring of ROS. *Circulation*, 108(16), 1912–1916. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000093660.86242.BB>
- Güell, M. R., Cejudo, P., Ortega, F., Puy, M. C., Rodríguez-Trigo, G., Pijoan, J., Martínez-Indart, L., Gorostiza, A., Bdeir, K., Celli, B., & Galdiz, J. B. (2017). Benefits of long-term pulmonary rehabilitation maintenance program in patients with severe chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 195(5), 622–629. <https://doi.org/10.1164/rccm.201603-0602OC>
- Gustafsson, T., Rundqvist, H., Norrbom, J., Rullman, E., Jansson, E., & Sundberg, C. J. (2007). The influence of physical training on the angiotensin and VEGF-A systems in human skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*, 103(3), 1012–1020. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01103.2006>
- Gut-Gobert, C., Cavallès, A., Dixmier, A., Guillot, S., Jouneau, S., Leroyer, C., Marchand-Adam, S., Marquette, D., Meurice, J. C., Desvigne, N., Morel, H., Person-Tacnet, C., & Raherison, C. (2019). Women and COPD: Do we need more evidence? *European Respiratory Review*, 28(151). <https://doi.org/10.1183/16000617.0055-2018>
- Haas, T. L., Milkiewicz, M., Davis, S. J., Zhou, A. L., Egginton, S., Brown, M. D., Madri, J. A., & Hudlicka, O. (2000). Matrix metalloproteinase activity is required for activity-induced angiogenesis in rat skeletal muscle. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 279(4), 48–4. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.2000.279.4.h1540>
- Haas, Tara L., & Nwadozi, E. (2015). Regulation of skeletal muscle capillary growth in exercise and disease. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 40(12), 1221–1232. <https://doi.org/10.1139/apnm-2015-0336>
- Hall, C. N., Reynell, C., Gesslein, B., Hamilton, N. B., Mishra, A., Sutherland, B. A., O'Farrell, F. M., Buchan, A. M., Lauritzen, M., & Attwell, D. (2014). Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease. *Nature*, 508(1), 55–60. <https://doi.org/10.1038/nature13165>
- Hamburg, N. M., Keyes, M. J., Larson, M. G., Vasani, R. S., Schnabel, R., Pryde, M. M., Mitchell, G. F., Sheffy, J., Vita, J. A., & Benjamin, E. J. (2008). Cross-sectional relations of digital vascular function to cardiovascular risk factors in the Framingham heart study. *Circulation*, 117(19), 2467–2474. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.748574>
- Hamburg, N. M., Palmisano, J., Larson, M. G., Sullivan, L. M., Lehman, B. T., Vasani, R. S., Levy, D., Mitchell, G. F., Vita, J. A., & Benjamin, E. J. (2011). Relation of brachial and digital measures of vascular function in the community: The framingham heart study. *Hypertension*, 57(3), 390–396. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.160812>
- Hammes, H. P., Feng, Y., Pfister, F., & Brownlee, M. (2011). Diabetic retinopathy: Targeting vasoregression.

Diabetes, 60(1), 9–16. <https://doi.org/10.2337/db10-0454>

- Hammes, H. P., Lin, J., Wagner, P., Feng, Y., Vom Hagen, F., Krzikok, T., Renner, O., Breier, G., Brownlee, M., & Deutsch, U. (2004). Angiotensin-2 Causes Pericyte Dropout in the Normal Retina: Evidence for Involvement in Diabetic Retinopathy. *Diabetes*, 53(4), 1104–1110. <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.4.1104>
- Hansen-Smith, F. M., Hudlicka, O., & Egginton, S. (1996). In vivo angiogenesis in adult rat skeletal muscle: Early changes in capillary network architecture and ultrastructure. *Cell and Tissue Research*, 286(1), 123–136. <https://doi.org/10.1007/s004410050681>
- Hansen, A., Butt, J., Holm-Yildiz, S., Karlsson, W., & Kruse, C. (2017). Validation of repeated endothelial function measurements using EndoPAT in stroke. *Frontiers in Neurology*, 8(MAY), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fneur.2017.00178>
- Hansen, J. E., Sun, X. G., & Wasserman, K. (2007). Spirometric criteria for airway obstruction: Use percentage of FEV₁/FVC ratio below the fifth percentile, not < 70%. *Chest*, 131(2), 349–355. <https://doi.org/10.1378/chest.06-1349>
- Hayden, M. R., Yang, Y., Habibi, J., Bagree, S. V., & Sowers, J. R. (2010). Pericytopathy: Oxidative stress and impaired cellular longevity in the pancreas and skeletal muscle in metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 3(5), 290–303. <https://doi.org/10.4161/oxim.3.5.13653>
- Haynes, W. G., & Webb, D. J. (1994). Contribution of endogenous generation of endothelin-1 to basal vascular tone. *The Lancet*, 344(8926), 852–854. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(94\)92827-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(94)92827-4)
- Hayot, M., Michaud, A., Koechlin, C., Caron, M. A., LeBlanc, P., Préfaut, C., & Maltais, F. (2005). Skeletal muscle microbiopsy: A validation study of a minimally invasive technique. *European Respiratory Journal*, 25(3), 431–440. <https://doi.org/10.1183/09031936.05.00053404>
- Heinze, C., Schroeder, B. C., Christian, A., Heinze, C., Seniuk, A., Sokolov, M. V., & Huebner, A. K. (2014). *Disruption of vascular Ca²⁺-activated chloride currents lowers blood pressure Find the latest version : Disruption of vascular Ca²⁺-activated chloride currents lowers blood pressure*. 124(2), 675–686. <https://doi.org/10.1172/JCI70025.of>
- Hellsten, Y., Rufener, N., Nielsen, J. J., Høier, B., Krustrup, P., & Bangsbo, J. (2008). Passive leg movement enhances interstitial VEGF protein, endothelial cell proliferation, and eNOS mRNA content in human skeletal muscle. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 294(3), R975–82. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00677.2007>
- Hellström, M., Gerhardt, H., Kalén, M., Li, X., Eriksson, U., Wolburg, H., & Betsholtz, C. (2001). Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. *Journal of Cell Biology*, 152(3), 543–553. <https://doi.org/10.1083/jcb.153.3.543>
- Hepple, R. T., Hogan, M. C., Stary, C., Bebout, D. E., Mathieu-Costello, O., & Wagner, P. D. (2017). Structural basis of muscle O₂ diffusing capacity: Evidence from muscle function in situ. *Journal of Applied Physiology*, 88(2), 560–566. <https://doi.org/10.1152/jappl.2000.88.2.560>
- Hepple, R. T., & Mathieu-Costello, O. (2001). Estimating the size of the capillary-to-fiber interface in skeletal muscle: A comparison of methods. *Journal of Applied Physiology*, 91(5), 2150–2156. <https://doi.org/10.1152/jappl.2001.91.5.2150>
- Herman, I. M., & D'Amore, P. A. (1985). Microvascular pericytes contain muscle and nonmuscle actins. *Journal of Cell Biology*, 101(1), 43–52. <https://doi.org/10.1083/jcb.101.1.43>
- Hill, J. M., Zalos, G., Halcox, J. P. J., Schenke, W. H., Waclawiw, M. A., Quyyumi, A. A., & Finkel, T. (2003). Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *New England Journal of Medicine*, 348(7), 593–600. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa022287>
- Hill, R. A., Tong, L., Yuan, P., Murikinati, S., Gupta, S., & Grutzendler, J. (2015). Regional Blood Flow in the Normal

- and Ischemic Brain Is Controlled by Arteriolar Smooth Muscle Cell Contractility and Not by Capillary Pericytes. *Neuron*, 87(1), 95–110. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.06.001>
- Hirai, D. M., Colburn, T. D., Craig, J. C., Hotta, K., Kano, Y., Musch, T. I., & Poole, D. C. (2019). Skeletal muscle interstitial O₂ pressures: bridging the gap between the capillary and myocyte. *Microcirculation*, 26(5), 0–2. <https://doi.org/10.1111/micc.12497>
- Hirai, D. M., Copp, S. W., Holdsworth, C. T., Ferguson, S. K., McCullough, D. J., Behnke, B. J., Musch, T. I., & Poole, D. C. (2014). Skeletal muscle microvascular oxygenation dynamics in heart failure: Exercise training and nitric oxide-mediated function. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 306(5). <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00901.2013>
- Hirai, D. M., Craig, J. C., Colburn, T. D., Eshima, H., Kano, Y., Musch, T. I., & Poole, D. C. (2019). Skeletal muscle interstitial PO₂ kinetics during recovery from contractions. *Journal of Applied Physiology*, 127(4), 930–939. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00297.2019>
- Hirai, D. M., Craig, J. C., Colburn, T. D., Eshima, H., Kano, Y., Sexton, W. L., Musch, T. I., & Poole, D. C. (2018). Skeletal muscle microvascular and interstitial PO₂ from rest to contractions. *Journal of Physiology*, 596(5), 869–883. <https://doi.org/10.1113/JP275170>
- Hirschi, K. D. K. K., Burt, J. M., Hirschi, K. D. K. K., & Dai, C. (2003). Gap junction communication mediates transforming growth factor- β activation and endothelial-induced mural cell differentiation. *Circulation Research*, 93(5), 429–437. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000091259.84556.D5>
- Hirschi, K. K., Burt, J. M., Hirschi, K. D., & Dai, C. (2003). Gap junction communication mediates transforming growth factor- β activation and endothelial-induced mural cell differentiation. *Circulation Research*, 93(5), 429–437. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000091259.84556.D5>
- Hoier, B., Nordsborg, N., Andersen, S., Jensen, L., Nybo, L., Bangsbo, J., & Hellsten, Y. (2012). Pro- and anti-angiogenic factors in human skeletal muscle in response to acute exercise and training. *Journal of Physiology*, 590(3), 595–606. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.216135>
- Hoier, Birgitte, & Hellsten, Y. (2014). Exercise-induced capillary growth in human skeletal muscle and the dynamics of VEGF. *Microcirculation*, 21(4), 301–314. <https://doi.org/10.1111/micc.12117>
- Hoier, Birgitte, Prats, C., Qvortrup, K., Pilegaard, H., Bangsbo, J., & Hellsten, Y. (2013). Subcellular localization and mechanism of secretion of vascular endothelial growth factor in human skeletal muscle. *FASEB Journal*, 27(9), 3496–3504. <https://doi.org/10.1096/fj.12-224618>
- Hostrup, M., Kalsen, A., Ørtenblad, N., Juel, C., Mørch, K., Rzeppa, S., Karlsson, S., Backer, V., & Bangsbo, J. (2014). β 2-Adrenergic stimulation enhances Ca²⁺ release and contractile properties of skeletal muscles, and counteracts exercise-induced reductions in Na⁺-K⁺-ATPase V_{max} in trained men. *Journal of Physiology*, 592(24), 5445–5459. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.277095>
- Huang, A. L., & Vita, J. A. (2006). *Effects of Systemic Inflammation on*. 16(1), 108–113.
- Humar, R., Zimmerli, L., & Battegay, E. (2009a). Angiogenesis and hypertension: An update. *Journal of Human Hypertension*, 23(12), 773–782. <https://doi.org/10.1038/jhh.2009.63>
- Humar, R., Zimmerli, L., & Battegay, E. (2009b). Angiogenesis and hypertension: An update. In *Journal of Human Hypertension* (Vol. 23, Issue 12, pp. 773–782). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/jhh.2009.63>
- Hunt, J. E. A., Galea, D., Tufft, G., Bunce, D., & Ferguson, R. A. (2013). Time course of regional vascular adaptations to low load resistance training with blood flow restriction. *Journal of Applied Physiology*, 115(3), 403–411. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00040.2013>
- Iepsen, U. W., Munch, G. D. W., Rugbjerg, M., Rinnov, A. R., Zacho, M., Mortensen, S. P., Secher, N. H., Ringbaek, T., Pedersen, B. K., Hellsten, Y., Lange, P., & Thaning, P. (2016a). Effect of endurance versus resistance training on quadriceps muscle dysfunction in COPD: A pilot study. *International Journal of COPD*, 11(1),

2659–2669. <https://doi.org/10.2147/COPD.S114351>

- Iepsen, U. W., Munch, G. D. W., Rugbjerg, M., Rinnov, A. R., Zacho, M., Mortensen, S. P., Secher, N. H., Ringbaek, T., Pedersen, B. K., Hellsten, Y., Lange, P., & Thaning, P. (2016b). Effect of endurance versus resistance training on quadriceps muscle dysfunction in COPD: A pilot study. *International Journal of COPD*, *11*(1), 2659–2669. <https://doi.org/10.2147/COPD.S114351>
- Inaba, Y., Chen, J. A., & Bergmann, S. R. (2010). Prediction of future cardiovascular outcomes by flow-mediated vasodilatation of brachial artery: A meta-analysis. *International Journal of Cardiovascular Imaging*, *26*(6), 631–640. <https://doi.org/10.1007/s10554-010-9616-1>
- Ispanovic, E., & Haas, T. L. (2006). JNK and PI3K differentially regulate MMP-2 and MT1-MMP mRNA and protein in response to actin cytoskeleton reorganization in endothelial cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, *291*(4), C579–C588. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00300.2005>
- Ives, S. J., Harris, R. A., Witman, M. A. H., Fjeldstad, A. S., Garten, R. S., Mcdaniel, J., Wray, D. W., & Richardson, R. S. (2014). Vascular Dysfunction and Chronic Obstructive Pulmonary Disease: The role of Redox Balance. *Hypertension*, *63*(3), 459–467. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.02255>
- Jain, R. K. (2003). Molecular regulation of vessel maturation. *Nature Medicine*, *9*(6), 685–693. <https://doi.org/10.1038/nm0603-685>
- Jaitovich, A., & Barreiro, E. (2018). Skeletal muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease what we know and can do for our patients. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *198*(2), 175–186. <https://doi.org/10.1164/rccm.201710-2140CI>
- Jatta, K., Eliason, G., Portela-Gomes, G. M., Grimelius, L., Caro, O., Nilholm, L., Sirjsö, A., Piehl-Aulin, K., & Abdel-Halim, S. M. (2009). Overexpression of von Hippel-Lindau protein in skeletal muscles of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of Clinical Pathology*, *62*(1), 70–76. <https://doi.org/10.1136/jcp.2008.057190>
- Jinjuvadia, C., Jinjuvadia, R., Mandapakala, C., Durairajan, N., Liangpunsakul, S., & Soubani, A. O. (2017). Trends in Outcomes, Financial Burden, and Mortality for Acute Exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) in the United States from 2002 to 2010. *COPD: Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, *14*(1), 72–79. <https://doi.org/10.1080/15412555.2016.1199669>
- Jobin, J., Maltais, F., Doyon, J. F., LeBlanc, P., Simard, P. M., Simard, A. A., & Simard, C. (1998). Chronic obstructive pulmonary disease: Capillarity and fiber-type characteristics of skeletal muscle. *Journal of Cardiopulmonary Rehabilitation*, *18*(6), 432–437. <https://doi.org/10.1097/00008483-199811000-00005>
- Kato, K., Okamura, K., Hatta, M., Morita, H., Kajioaka, S., Naito, S., & Yamazaki, J. (2013). Involvement of IP3-receptor activation in endothelin-1-induced Ca²⁺ influx in rat pulmonary small artery. *European Journal of Pharmacology*, *720*(1–3), 255–263. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.09.076>
- Kindig, C. A., Sexton, W. L., Fedde, M. R., & Poole, D. C. (1998). Skeletal muscle microcirculatory structure and hemodynamics in diabetes. *Respiration Physiology*, *111*(2), 163–175. [https://doi.org/10.1016/S0034-5687\(97\)00122-9](https://doi.org/10.1016/S0034-5687(97)00122-9)
- Kisler, K., Nelson, A. R., Rege, S. V., Ramanathan, A., Wang, Y., Ahuja, A., Lazic, D., Tsai, P. S., Zhao, Z., Zhou, Y., Boas, D. A., Sakadžić, S., & Zlokovic, B. V. (2017). Pericyte degeneration leads to neurovascular uncoupling and limits oxygen supply to brain. *Nature Neuroscience*, *20*(3), 406–416. <https://doi.org/10.1038/nn.4489>
- Kitta, Y., Nakamura, T., Kodama, Y., Takano, H., Umetani, K., Fujioka, D., Saito, Y., Kawabata, K. I., Obata, J. E., Ichigi, Y., Mende, A., & Kugiyama, K. (2005). Endothelial vasomotor dysfunction in the brachial artery is associated with late in-stent coronary restenosis. *Journal of the American College of Cardiology*, *46*(4), 648–655. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2005.04.055>
- Klement, W., Garbelli, R., Zub, E., Rossini, L., Tassi, L., Girard, B., Blaquiere, M., Bertaso, F., Perroy, J., de Bock, F., & Marchi, N. (2018a). Seizure progression and inflammatory mediators promote pericytosis and pericyte-microglia clustering at the cerebrovasculature. *Neurobiology of Disease*, *113*, 70–81.

<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2018.02.002>

- Klement, W., Garbelli, R., Zub, E., Rossini, L., Tassi, L., Girard, B., Blaquiére, M., Bertaso, F., Perroy, J., de Bock, F., & Marchi, N. (2018b). Seizure progression and inflammatory mediators promote pericytosis and pericyte-microglia clustering at the cerebrovasculature. *Neurobiology of Disease*, *113*, 70–81. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2018.02.002>
- Klooster, K., ten Hacken, N. H. T., Hartman, J. E., Kerstjens, H. A. M., van Rikxoort, E. M., & Slebos, D.-J. (2015). Endobronchial Valves for Emphysema without Interlobar Collateral Ventilation. *New England Journal of Medicine*, *373*(24), 2325–2335. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1507807>
- Kofler, N. M., Cuervo, H., Uh, M. K., Murtomäki, A., & Kitajewski, J. (2015). Combined deficiency of Notch1 and Notch3 causes pericyte dysfunction, models CADASIL, and results in arteriovenous malformations. *Scientific Reports*, *5*(1), 16449. <https://doi.org/10.1038/srep16449>
- Kou, R., & Michel, T. (2007). Epinephrine regulation of the endothelial nitric-oxide synthase: Roles of RAC1 and β 3-adrenergic receptors in endothelial NO signaling. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(45), 32719–32729. <https://doi.org/10.1074/jbc.M706815200>
- Krogh, A. (1919). The number and distribution of capillaries in muscles with calculations of the oxygen pressure head necessary for supplying the tissue. *The Journal of Physiology*, *52*(6), 409–415. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1919.sp001839>
- Kuhn, M. (2016). Molecular physiology of membrane guanylyl cyclase receptors. *Physiological Reviews*, *96*(2), 751–804. <https://doi.org/10.1152/physrev.00022.2015>
- Laakso, M., Edelman, S. V., Brechtel, G., & Baron, A. D. (1990). Decreased effect of insulin to stimulate skeletal muscle blood flow in obese man: A novel mechanism for insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation*, *85*(6), 1844–1852. <https://doi.org/10.1172/JCI114644>
- Lacasse, Y., Martin, S., Lasserson, T. J., & Goldstein, R. S. (2007). Meta-analysis of respiratory rehabilitation in chronic obstructive pulmonary disease a Cochrane systematic review. In *Europa Medicophyica* (Vol. 43, Issue 4, pp. 475–485).
- Lacasse, Yves, Cates, C. J., McCarthy, B., & Welsh, E. J. (2015). This Cochrane Review is closed: deciding what constitutes enough research and where next for pulmonary rehabilitation in COPD. In D. Tovey (Ed.), *The Cochrane database of systematic reviews* (Vol. 11, Issue 11, p. ED000107). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/14651858.ED000107>
- Lahousse, L., Tiemeier, H., Ikram, M. A., & Brusselle, G. G. (2015). Chronic obstructive pulmonary disease and cerebrovascular disease: A comprehensive review. *Respiratory Medicine*, *109*(11), 1371–1380. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2015.07.014>
- Lamprecht, B., Soriano, J. B., Studnicka, M., Kaiser, B., Vanfleteren, L. E., Gnatiuc, L., Burney, P., Miravitlles, M., García-Río, F., Akbari, K., Ancochea, J., Menezes, A. M., Perez-Padilla, R., De Oca, M. M., Torres-Duque, C. A., Caballero, A., González-García, M., Buist, S., Menezes, A. M. B., ... Jardim, J. R. B. (2015). Determinants of underdiagnosis of COPD in national and international surveys. *Chest*, *148*(4), 971–985. <https://doi.org/10.1378/chest.14-2535>
- Larsson, K. (2007). Aspects on pathophysiological mechanisms in COPD. *Journal of Internal Medicine*, *262*(3), 311–340. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2007.01837.x>
- Laufs, U., Werner, N., Link, A., Endres, M., Wassmann, S., Jürgens, K., Miche, E., Böhm, M., & Nickenig, G. (2004a). Physical Training Increases Endothelial Progenitor Cells, Inhibits Neointima Formation, and Enhances Angiogenesis. *Circulation*, *109*(2), 220–226. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000109141.48980.37>
- Laufs, U., Werner, N., Link, A., Endres, M., Wassmann, S., Jürgens, K., Miche, E., Böhm, M., & Nickenig, G. (2004b). Physical Training Increases Endothelial Progenitor Cells, Inhibits Neointima Formation, and Enhances Angiogenesis. *Circulation*, *109*(2), 220–226. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000109141.48980.37>

- Lebrin, F., Deckers, M., Bertolino, P., & Ten Dijke, P. (2005). TGF- β receptor function in the endothelium. In *Cardiovascular Research* (Vol. 65, Issue 3, pp. 599–608). Oxford Academic. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2004.10.036>
- Leick, L., Hellsten, Y., Fentz, J., Lyngby, S. S., Wojtaszewski, J. F. P., Hidalgo, J., & Pilegaard, H. (2009). PGC-1 α mediates exercise-induced skeletal muscle VEGF expression in mice. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 297(1), 92–103. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00076.2009>
- Lewandowska, E., Szpak, G. M., Wierzba-Bobrowicz, T., Modzelewska, J., Stępień, T., Pasennik, E., Schmidt-Sidor, B., & Rafałowska, J. (2010). Capillary vessel wall in CADASIL angiopathy. *Folia Neuropathologica*, 48(2), 104–115.
- Lindahl, P., Johansson, B. R., Levéen, P., & Betsholtz, C. (1997). Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science*, 277(5323), 242–245. <https://doi.org/10.1126/science.277.5323.242>
- Lundby, C., Gassmann, M., & Pilegaard, H. (2006). Regular endurance training reduces the exercise induced HIF-1 α and HIF-2 α mRNA expression in human skeletal muscle in normoxic conditions. *European Journal of Applied Physiology*, 96(4), 363–369. <https://doi.org/10.1007/s00421-005-0085-5>
- MacLay, J. D., & MacNee, W. (2013a). Cardiovascular disease in COPD: Mechanisms. *Chest*, 143(3), 798–807. <https://doi.org/10.1378/chest.12-0938>
- MacLay, J. D., & MacNee, W. (2013b). Cardiovascular disease in COPD: Mechanisms. *Chest*, 143(3), 798–807. <https://doi.org/10.1378/chest.12-0938>
- MacNee, W. (2005). Pulmonary and systemic oxidant/antioxidant imbalance in chronic obstructive pulmonary disease. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 2(1), 50–60. <https://doi.org/10.1513/pats.200411-056SF>
- MacNee, W., & Rahman, I. (2001). Is oxidative stress central to the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease? In *Trends in Molecular Medicine* (Vol. 7, Issue 2, pp. 55–62). Elsevier Ltd. [https://doi.org/10.1016/S1471-4914\(01\)01912-8](https://doi.org/10.1016/S1471-4914(01)01912-8)
- Maeno, T., Houghton, A. M., Quintero, P. A., Grumelli, S., Owen, C. A., & Shapiro, S. D. (2007). CD8 + T Cells Are Required for Inflammation and Destruction in Cigarette Smoke-Induced Emphysema in Mice. *The Journal of Immunology*, 178(12), 8090–8096. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.12.8090>
- Maisonpierre, P. C., Suri, C., Jones, P. F., Bartunkova, S., Wiegand, S. J., Radziejewski, C., Compton, D., McClain, J., Aldrich, T. H., Papadopoulos, N., Daly, T. J., Davis, S., Sato, T. N., & Yancopoulos, G. D. (1997). Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science*, 277(5322), 55–60. <https://doi.org/10.1126/science.277.5322.55>
- Maltais, F., Simard, A. A., Simard, C., Jobin, J., Desgagnés, P., LeBlanc, P., & Janvier, R. (1996). Oxidative capacity of the skeletal muscle and lactic acid kinetics during exercise in normal subjects and in patients with COPD. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 153(1), 288–293. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.153.1.8542131>
- Manian, P. (2019). Chronic obstructive pulmonary disease classification, phenotypes and risk assessment. In *Journal of Thoracic Disease* (Vol. 11, Issue Suppl 14, pp. S1761–S1766). AME Publishing Company. <https://doi.org/10.21037/jtd.2019.05.10>
- Marsh, S., Aldington, S., Shirtcliffe, P., Weatherall, M., & Beasley, R. (2006). Smoking and COPD: What really are the risks? [1]. In *European Respiratory Journal* (Vol. 28, Issue 4, pp. 883–884). <https://doi.org/10.1183/09031936.06.00074806>
- Maruhashi, T., Kihara, Y., & Higashi, Y. (2018). Assessment of endothelium-independent vasodilation: From methodology to clinical perspectives. *Journal of Hypertension*, 36(7), 1460–1467. <https://doi.org/10.1097/HJH.0000000000001750>
- Masaki, N., Ido, Y., Yamada, T., Yamashita, Y., Toya, T., Takase, B., Hamburg, N. M., & Adachi, T. (2019).

- Endothelial Insulin Resistance of Freshly Isolated Arterial Endothelial Cells From Radial Sheaths in Patients With Suspected Coronary Artery Disease. *Journal of the American Heart Association*, 8(6). <https://doi.org/10.1161/JAHA.118.010816>
- Mason, S. D., Rundqvist, H., Papandreou, I., Duh, R., McNulty, W. J., Howlett, R. A., Olfert, I. M., Sundberg, C. J., Denko, N. C., Poellinger, L., & Johnson, R. S. (2007). HIF-1 α in endurance training: Suppression of oxidative metabolism. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 293(5), 2059–2069. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00335.2007>
- Mathers, C. D., & Loncar, D. (2006). Projections of Global Mortality and Burden of Disease from 2002 to 2030. *PLoS Medicine*, 3(11), e442. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030442>
- Mathers C., Stevens, G. A., Mahanani W.R., Fat, D. M., & Hogan, D. (2018). WHO | Disease burden and mortality estimates. *Who, March*, 1–65. <https://doi.org/2013>
- McGarvey, L. P., John, M., Anderson, J. A., Zvarich, M., & Wise, R. A. (2007). Ascertainment of cause-specific mortality in COPD: Operations of the TORCH Clinical Endpoint Committee. *Thorax*, 62(5), 411–415. <https://doi.org/10.1136/thx.2006.072348>
- Mercado, N., Ito, K., & Barnes, P. J. (2015). Accelerated ageing of the lung in COPD: New concepts. In *Thorax* (Vol. 70, Issue 5, pp. 482–489). BMJ Publishing Group. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2014-206084>
- Methner, C., Mishra, A., Golgotiu, K., Li, Y., Wei, W., Yanez, N. D., Zlokovic, B., Wang, R. K., Alkayed, N. J., Kaul, S., & Iliff, J. J. (2019). Pericyte constriction underlies capillary derecruitment during hyperemia in the setting of arterial stenosis. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 317(2), H255–H263. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00097.2019>
- Meyer, B., Mörtl, D., Strecker, K., Hülsmann, M., Kulemann, V., Neunteufl, T., Pacher, R., & Berger, R. (2005). Flow-mediated vasodilation predicts outcome in patients with chronic heart failure: Comparison with B-type natriuretic peptide. *Journal of the American College of Cardiology*, 46(6), 1011–1018. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2005.04.060>
- MILLER, M. R., & PINCOCK, A. C. (1989). Predicted values: how should we use them? *Thorax*, 44(6), 527. <https://doi.org/10.1136/thx.44.6.527>
- Miyai, N., Arita, M., Miyashita, K., Morioka, I., Shiraishi, T., & Nishio, I. (2002). Blood Pressure Response to Heart Rate During Exercise Test and Risk of Future Hypertension. *Hypertension*, 39(3), 761–766. <https://doi.org/10.1161/hy0302.105777>
- Mofarrahi, M., Sigala, I., Vassilokopoulos, T., Harel, S., Guo, Y., Debigare, R., Maltais, F., & Hussain, S. N. A. (2013). Angiogenesis-related factors in skeletal muscles of COPD patients: roles of angiopoietin-2. *Journal of Applied Physiology*, 114(9), 1309–1318. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00954.2012>
- Montero, D., Walther, G., Benamo, E., Perez-Martin, A., & Vinet, A. (2013). Effects of exercise training on arterial function in type 2 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. In *Sports Medicine* (Vol. 43, Issue 11, pp. 1191–1199). Springer. <https://doi.org/10.1007/s40279-013-0085-2>
- Montes De Oca, M., Loeb, E., Torres, S. H., De Sanctis, J., Hernández, N., & Tálamo, C. (2008). Peripheral muscle alterations in non-COPD smokers. *Chest*, 133(1), 13–18. <https://doi.org/10.1378/chest.07-1592>
- Motzer, R. J., Hutson, T. E., Tomczak, P., Michaelson, D., Bukowski, R. M., Rixe, O., Oudard, S., Negrier, S., Szczylik, C., Kim, S. T., Chen, I., Bycott, P. W., Baum, C. M., & Figlin, R. A. (2007). Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *New England Journal of Medicine*, 356(2), 115–124. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa065044>
- Moullec, G., Ninot, G., Varray, A., Desplan, J., Hayot, M., & Prefaut, C. (2008). An innovative maintenance follow-up program after a first inpatient pulmonary rehabilitation. *Respiratory Medicine*, 102(4), 556–566. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2007.11.012>
- Munroe, M., Dvoretzkiy, S., Lopez, A., Leong, J., Dyle, M. C., Kong, H., Adams, C. M., & Boppart, M. D. (2019).

- Pericyte transplantation improves skeletal muscle recovery following hindlimb immobilization. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 33(6), 7694–7706. <https://doi.org/10.1096/fj.201802580R>
- Murrant, C. L., Lamb, I. R., & Novielli, N. M. (2017). Capillary endothelial cells as coordinators of skeletal muscle blood flow during active hyperemia. *Microcirculation*, 24(3), 1–10. <https://doi.org/10.1111/micc.12348>
- Murrant, C. L., & Sarelius, I. H. (2015). Local control of blood flow during active hyperaemia: what kinds of integration are important?: Arteriolar dilatation in active hyperaemia. *The Journal of Physiology*, 593(21), 4699–4711. <https://doi.org/10.1113/JP270205>
- Nasr, S. Z., & Sweet, S. C. (2015). Electronic Cigarette Use in Middle and High School Students Triples from 2013 to 2014. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 192(3), 276–278. <https://doi.org/10.1164/rccm.201505-0898ED>
- Naylor, A. J., McGettrick, H. M., Maynard, W. D., May, P., Barone, F., Croft, A. P., Egginton, S., & Buckley, C. D. (2014). A differential role for CD248 (Endosialin) in PDGF-mediated skeletal muscle angiogenesis. *PLoS ONE*, 9(9), e107146. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107146>
- Nelson, M. E., Rejeski, W. J., Blair, S. N., Duncan, P. W., Judge, J. O., King, A. C., Macera, C. A., & Castaneda-Sceppa, C. (2007). Physical activity and public health in older adults: Recommendation from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. *Circulation*, 116(9), 1094–1105. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.185650>
- Nikolić, N., Görgens, S. W., Thoresen, G. H., Aas, V., Eckel, J., & Eckardt, K. (2017). Electrical pulse stimulation of cultured skeletal muscle cells as a model for in vitro exercise – possibilities and limitations. *Acta Physiologica*, 220(3), 310–331. <https://doi.org/10.1111/apha.12830>
- O'DONNELL, D. E., REVILL, S. M., & WEBB, K. A. (2001). Dynamic Hyperinflation and Exercise Intolerance in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 164(5), 770–777. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.164.5.2012122>
- O'Farrel, F. M., Mastitskaya, S., Hammond-Haley, M., Freitas, F., Wah, W. R., Attwell, D., O'Farrell, F. M., Mastitskaya, S., Hammond-Haley, M., Freitas, F., Wah, W. R., Attwell, D., O'Farrel, F. M., Mastitskaya, S., Hammond-Haley, M., Freitas, F., Wah, W. R., Attwell, D., O'Farrell, F. M., ... Attwell, D. (2018). Capillary pericytes mediate coronary no-reflow after myocardial ischaemia. *ELife*, 6, 1–16. <https://doi.org/10.7554/eLife.29280>
- O'Farrell, F. M., & Attwell, D. (2014). A role for pericytes in coronary no-reflow. *Nature Reviews Cardiology*, 11(7), 427–432. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2014.58>
- Oelsner, E. C., Ortega, V. E., Smith, B. M., Nguyen, J. N., Manichaikul, A. W., Hoffman, E. A., Guo, X., Taylor, K. D., Woodruff, P. G., Couper, D. J., Hansel, N. N., Martinez, F. J., Paine, R., Han, M. K., Cooper, C., Dransfield, M. T., Criner, G., Krishnan, J. A., Bowler, R., ... Barr, R. G. (2019). A Genetic Risk Score Associated with Chronic Obstructive Pulmonary Disease Susceptibility and Lung Structure on Computed Tomography. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 200(6), 721–731. <https://doi.org/10.1164/rccm.201812-2355OC>
- Olenich, S. A., Gutierrez-Reed, N., Audet, G. N., & Olfert, M. I. (2013). Temporal response of positive and negative regulators in response to acute and chronic exercise training in mice. *Journal of Physiology*, 591(20), 5157–5169. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.254979>
- Olfert, I. M., & Birot, O. (2011). Importance of Anti-angiogenic Factors in the Regulation of Skeletal Muscle Angiogenesis. *Microcirculation*, 18(4), 316–330. <https://doi.org/10.1111/j.1549-8719.2011.00092.x>
- Olfert, I. M., Breen, E. C., Mathieu-Costello, O., & Wagner, P. D. (2001). Chronic hypoxia attenuates resting and exercise-induced VEGF, flt-1, and flk-1 mRNA levels in skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*, 90(4), 1532–1538. <https://doi.org/10.1152/jappl.2001.90.4.1532>
- Olfert, I. M., Howlett, R. A., Wagner, P. D., & Breen, E. C. (2010a). Myocyte vascular endothelial growth factor is

- required for exercise-induced skeletal muscle angiogenesis. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 299(4), R1059–R1067. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00347.2010>
- Olfert, I. M., Howlett, R. A., Wagner, P. D., & Breen, E. C. (2010b). Myocyte vascular endothelial growth factor is required for exercise-induced skeletal muscle angiogenesis. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 299(4). <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00347.2010>
- Olszewska-Pazdrak, B., Hein, T. W., Olszewska, P., & Carney, D. H. (2009). Chronic hypoxia attenuates VEGF signaling and angiogenic responses by downregulation of KDR in human endothelial cells. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 296(5), 1162–1170. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00533.2008>
- Ozerdem, U., Grako, K. A., Dahlin-Huppe, K., Monosov, E., & Stallcup, W. B. (2001). NG2 proteoglycan is expressed exclusively by mural cells during vascular morphogenesis. *Developmental Dynamics*, 222(2), 218–227. <https://doi.org/10.1002/dvdy.1200>
- Paschalaki, K. E., Starke, R. D., Hu, Y., Mercado, N., Margariti, A., Gorgoulis, V. G., Randi, A. M., & Barnes, P. J. (2013). Dysfunction of endothelial progenitor cells from smokers and chronic obstructive pulmonary disease patients due to increased dna damage and senescence. *Stem Cells*, 31(12), 2813–2826. <https://doi.org/10.1002/stem.1488>
- Paschalaki, K. E., Zampetaki, A., Baker, J. R., Birrell, M. A., Starke, R. D., Belvisi, M. G., Donnelly, L. E., Mayr, M., Randi, A. M., & Barnes, P. J. (2018). Downregulation of MicroRNA-126 Augments DNA Damage Response in Cigarette Smokers and Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. In *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* (Vol. 197, Issue 5, pp. 665–668). American Thoracic Society. <https://doi.org/10.1164/rccm.201706-1304LE>
- Pearson, M. J., & Smart, N. A. (2017). Effect of exercise training on endothelial function in heart failure patients: A systematic review meta-analysis. *International Journal of Cardiology*, 231, 234–243. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2016.12.145>
- Pedralli, M. L., Eibel, B., Waclawovsky, G., Schaun, M. I., Nisa-Castro-Neto, W., Umpierre, D., Pescatello, L. S., Tanaka, H., & Lehnen, A. M. (2018). Effects of exercise training on endothelial function in individuals with hypertension: a systematic review with meta-analysis. *Journal of the American Society of Hypertension*, 12(12), e65–e75. <https://doi.org/10.1016/j.jash.2018.09.009>
- Peled, N., Shitrit, D., Fox, B. D., Shlomi, D., Amital, A., Bendayan, D., & Kramer, M. R. (2009). Peripheral arterial stiffness and endothelial dysfunction in idiopathic and scleroderma associated pulmonary arterial hypertension. *Journal of Rheumatology*, 36(5), 970–975. <https://doi.org/10.3899/jrheum.081088>
- Pellegrino, R., Viegi, G., Brusasco, V., Crapo, R. O., Burgos, F., Casaburi, R., Coates, A., van der Grinten, C. P. M., Gustafsson, P., Hankinson, J., Jensen, R., Johnson, D. C., MacIntyre, N., McKay, R., Miller, M. R., Navajas, D., Pedersen, O. F., & Wanger, J. (2005). Interpretative strategies for lung function tests. *European Respiratory Journal*, 26(5), 948–968. <https://doi.org/10.1183/09031936.05.00035205>
- Peterson, C. M., Jones, R. L., Esterly, J. A., Wantz, G. E., & Jackson, R. L. (1980). Changes in basement membrane thickening and pulse volume concomitant with improved glucose control and exercise in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 3(5), 586–589. <https://doi.org/10.2337/diacare.3.5.586>
- Pfister, F., Feng, Y., Hagen, F. Vom, Hoffmann, S., Molema, G., Hillebrands, J. L., Shani, M., Deutsch, U., & Hammes, H. P. (2008). Pericyte migration: A novel mechanism of pericyte loss in experimental diabetic retinopathy. *Diabetes*, 57(9), 2495–2502. <https://doi.org/10.2337/db08-0325>
- Pinto-Plata, V., Casanova, C., Müllerova, H., de Torres, J. P., Corado, H., Varo, N., Cordoba, E., Zeineldine, S., Paz, H., Baz, R., Divo, M., Cortopassi, F., & Celli, B. R. (2012). Inflammatory and repair serum biomarker pattern. Association to clinical outcomes in COPD. *Respiratory Research*, 13(1), 71. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-13-71>
- Plant, P. J., Brooks, D., Faughnan, M., Bayley, T., Bain, J., Singer, L., Correa, J., Pearce, D., Binnie, M., & Batt, J.

- (2010). Cellular markers of muscle atrophy in chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 42(4), 461–471. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2008-0382OC>
- Pomiès, P., Blaquièrre, M., Maury, J., Mercier, J., Gouzi, F., & Hayot, M. (2016). Involvement of the FoxO1/MuRF1/Atrogin-1 Signaling Pathway in the Oxidative Stress-Induced Atrophy of Cultured Chronic Obstructive Pulmonary Disease Myotubes. *PLOS ONE*, 11(8), e0160092. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160092>
- Pomiès, P., Rodriguez, J., Blaquièrre, M., Sedraoui, S., Gouzi, F., Carnac, G., Laoudj-Chenivresse, D., Mercier, J., Préfaut, C., & Hayot, M. (2015). Reduced myotube diameter, atrophic signalling and elevated oxidative stress in cultured satellite cells from COPD patients. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 19(1), 175–186. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12390>
- Poole, D. C., Copp, S. W., Ferguson, S. K., & Musch, T. I. (2013). Skeletal muscle capillary function: Contemporary observations and novel hypotheses. *Experimental Physiology*, 98(12), 1645–1658. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2013.073874>
- Qin, D., Trenkwalder, T., Lee, S., Chillo, O., Deindl, E., Kupatt, C., & Hinkel, R. (2013). Early Vessel Destabilization Mediated by Angiopoietin-2 and Subsequent Vessel Maturation via Angiopoietin-1 Induce Functional Neovasculature after Ischemia. *PLoS ONE*, 8(4), e61831. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061831>
- Quaderi, S. A., & Hurst, J. R. (2018). The unmet global burden of COPD. *Global Health, Epidemiology and Genomics*, 3, 2018–2020. <https://doi.org/10.1017/gheg.2018.1>
- Queen, L. R., Ji, Y., Xu, B., Young, L., Yao, K., Wyatt, A. W., Rowlands, D. J., Siow, R. C. M., Mann, G. E., & Ferro, A. (2006). Mechanisms underlying β 2-adrenoceptor-mediated nitric oxide generation by human umbilical vein endothelial cells. *Journal of Physiology*, 576(2), 585–594. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.115998>
- Radtko, T., Crook, S., Kaltsakas, G., Louvaris, Z., Berton, D., Urquhart, D. S., Kampouras, A., Rabinovich, R. A., Verges, S., Kontopidis, D., Boyd, J., Tonia, T., Langer, D., De Brandt, J., Goërtz, Y. M. J., Burtin, C., Spruit, M. A., Braeken, D. C. W., Dacha, S., ... Hebestreit, H. (2019). ERS statement on standardisation of cardiopulmonary exercise testing in chronic lung diseases. *European Respiratory Review*, 28(154). <https://doi.org/10.1183/16000617.0101-2018>
- Rahman, I. (2005). Oxidative stress in pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease: Cellular and molecular mechanisms. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 43(1), 167–188. <https://doi.org/10.1385/CBB:43:1:167>
- Rembold, C. M. (1992). Regulation of contraction and relaxation in arterial smooth muscle. *Hypertension*, 20(2), 129–137. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.20.2.129>
- Remels, A. H., Schrauwen, P., Broekhuizen, R., Willems, J., Kersten, S., Gosker, H. R., & Schols, A. M. (2007). Peroxisome proliferator-activated receptor expression is reduced in skeletal muscle in COPD. *European Respiratory Journal*, 30(2), 245–252. <https://doi.org/10.1183/09031936.00144106>
- Richardson, R. S., Wagner, H., Mudaliar, S. R. D., Saucedo, E., Henry, R., & Wagner, P. D. (2000). Exercise adaptation attenuates VEGF gene expression in human skeletal muscle. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 279(2 48-2). <https://doi.org/10.1152/ajpheart.2000.279.2.h772>
- Richardson, Russell S., Noyszewski, E. A., Kendrick, K. F., Leigh, J. S., & Wagner, P. D. (1995). Myoglobin O₂ desaturation during exercise: Evidence of limited O₂ transport. *Journal of Clinical Investigation*, 96(4), 1916–1926. <https://doi.org/10.1172/JCI118237>
- Ries, A. L., Bauldoff, G. S., Carlin, B. W., Casaburi, R., Emery, C. F., Mahler, D. A., Make, B., Rochester, C. L., ZuWallack, R., & Herrerias, C. (2007). Pulmonary rehabilitation: Joint ACCP/AACVPR Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest*, 131(5 SUPPL.), 4S-42S. <https://doi.org/10.1378/chest.06-2418>
- Rochester, C. L., & Spruit, M. A. (2017). Maintaining the benefits of pulmonary rehabilitation the Holy Grail. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 195(5), 548–551.

<https://doi.org/10.1164/rccm.201609-1925ED>

- Rodriguez-Miguel, P., Gregg, J., Seigler, N., Bass, L., Thomas, J., Pollock, J. S., Sullivan, J. C., Dillard, T. A., & Harris, R. A. (2018). Acute Tetrahydrobiopterin Improves Endothelial Function in Patients With COPD. *Chest*, *154*(3), 597–606. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2018.04.028>
- Rossi, E., Goyard, C., Cras, A., Dizier, B., Bacha, N., Lokajczyk, A., Guerin, C., Gendron, N., Planquette, B., Mignon, V., Bernabeu, C., Sanchez, O., & Smadja, D. (2017). Co-injection of mesenchymal stem cells with endothelial progenitor cells accelerates muscle recovery in hind limb ischemia through an endoglin-dependent mechanism. *Thrombosis and Haemostasis*, *117*(10), 1908–1918. <https://doi.org/10.1160/th17-01-0007>
- Rossi, R., Nuzzo, A., Origliani, G., & Modena, M. G. (2008). Prognostic Role of Flow-Mediated Dilation and Cardiac Risk Factors in Post-Menopausal Women. *Journal of the American College of Cardiology*, *51*(10), 997–1002. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2007.11.044>
- Rowe, G. C., Raghuram, S., Jang, C., Nagy, J. A., Patten, I. S., Goyal, A., Chan, M. C., Liu, L. X., Jiang, A., Spokes, K. C., Beeler, D., Dvorak, H., Aird, W. C., & Arany, Z. (2014). PGC-1 α induces SPP1 to activate macrophages and orchestrate functional angiogenesis in skeletal muscle. *Circulation Research*, *115*(5), 504–517. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.303829>
- Rubinshtein, R., Kuvin, J. T., Soffler, M., Lennon, R. J., Lavi, S., Nelson, R. E., Pumper, G. M., Lerman, L. O., & Lerman, A. (2010). Assessment of endothelial function by non-invasive peripheral arterial tonometry predicts late cardiovascular adverse events. *European Heart Journal*, *31*(9), 1142–1148. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehq010>
- Rullman, E., Norrbom, J., Strömberg, A., Wågsäter, D., Rundqvist, H., Haas, T., & Gustafsson, T. (2009). Endurance exercise activates matrix metalloproteinases in human skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*, *106*(3), 804–812. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.90872.2008>
- Sabatier, F., Camoin-Jau, L., Anfosso, F., Sampol, J., & Dignat-George, F. (2009). Circulating endothelial cells, microparticles and progenitors: Key players towards the definition of vascular competence. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *13*(3), 454–471. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00639.x>
- Saey, D., Michaud, A., Couillard, A., Côté, C. H., Mador, M. J., LeBlanc, P., Jobin, J., & Maltais, F. (2005a). Contractile fatigue, muscle morphometry, and blood lactate in chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *171*(10), 1109–1115. <https://doi.org/10.1164/rccm.200408-1005OC>
- Saey, D., Michaud, A., Couillard, A., Côté, C. H., Mador, M. J., LeBlanc, P., Jobin, J., & Maltais, F. (2005b). Contractile fatigue, muscle morphometry, and blood lactate in chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *171*(10), 1109–1115. <https://doi.org/10.1164/rccm.200408-1005OC>
- Sagare, A. P., Bell, R. D., Zhao, Z., Ma, Q., Winkler, E. A., Ramanathan, A., & Zlokovic, B. V. (2013). Pericyte loss influences Alzheimer-like neurodegeneration in mice. *Nature Communications*, *4*. <https://doi.org/10.1038/ncomms3932>
- Sarto, P., Balducci, E., Balconi, G., Fiordaliso, F., Merlo, L., Tuzzato, G., Pappagallo, G. L., Frigato, N., Zanocco, A., Forestieri, C., Azzarello, G., Mazzucco, A., Valenti, M. T., Alborino, F., Noventa, D., Vinante, O., Pascotto, P., Sartore, S., Dejana, E., & Latini, R. (2007). Effects of Exercise Training on Endothelial Progenitor Cells in Patients With Chronic Heart Failure. *Journal of Cardiac Failure*, *13*(9), 701–708. <https://doi.org/10.1016/j.cardfail.2007.06.722>
- Sato, T., Haimovici, R., Kao, R., Li, A. F., & Roy, S. (2002). Downregulation of connexin 43 expression by high glucose reduces gap junction activity in microvascular endothelial cells. *Diabetes*, *51*(5), 1565–1571. <https://doi.org/10.2337/diabetes.51.5.1565>
- Scheef, E. A., Sorenson, C. M., & Sheibani, N. (2009). Attenuation of proliferation and migration of retinal pericytes in the absence of thrombospondin-1. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, *296*(4), C724. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00409.2008>

- Schikowski, T., Mills, I. C., Anderson, H. R., Cohen, A., Hansell, A., Kauffmann, F., Krämer, U., Marcon, A., Perez, L., Sunyer, J., Probst-Hensch, N., & Künzli, N. (2014). Ambient air pollution: A cause of COPD. *European Respiratory Journal*, *43*(1), 250–263. <https://doi.org/10.1183/09031936.00100112>
- Schmittgen, T. D., Livak, K. J., Schmittgen TD, & KJ., L. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature Protocols*, *3*(6), 1101–1108. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18546601>
- Scott-Burden, T. (1995). Regulation of nitric oxide production by tetrahydrobiopterin. In *Circulation* (Vol. 91, Issue 1, pp. 248–250). Lippincott Williams & Wilkins. <https://doi.org/10.1161/01.cir.91.1.248>
- Segura-Valdez, L., Pardo, A., Gaxiola, M., Uhal, B. D., Becerril, C., & Selman, M. (2000). Upregulation of gelatinases A and B, collagenases 1 and 2, and increased parenchymal cell death in COPD. *Chest*, *117*(3), 684–694. <https://doi.org/10.1378/chest.117.3.684>
- Serres, I., Gautier, V., Varray, A., & Préfaut, C. (1998). Impaired skeletal muscle endurance related to physical inactivity and altered lung function in COPD patients. *Chest*, *113*(4), 900–905. <https://doi.org/10.1378/chest.113.4.900>
- Shojaee, N., Patton, W. F., Hechtman, H. B., & Shepro, D. (1999). Myosin translocation in retinal pericytes during free-radical induced apoptosis. *Journal of Cellular Biochemistry*, *75*(1), 118–129. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4644\(19991001\)75:1<118::AID-JCB12>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4644(19991001)75:1<118::AID-JCB12>3.0.CO;2-U)
- SILVERMAN, E. K., WEISS, S. T., DRAZEN, J. M., CHAPMAN, H. A., CAREY, V., CAMPBELL, E. J., DENISH, P., SILVERMAN, R. A., CELEDON, J. C., REILLY, J. J., GINNS, L. C., & SPEIZER, F. E. (2000). Gender-Related Differences in Severe, Early-Onset Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *162*(6), 2152–2158. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.162.6.2003112>
- Singh, D., Agusti, A., Anzueto, A., Barnes, P. J., Bourbeau, J., Celli, B. R., Criner, G. J., Frith, P., Halpin, D. M. G., Han, M., López Varela, M. V., Martínez, F., Montes de Oca, M., Papi, A., Pavord, I. D., Roche, N., Sin, D. D., Stockley, R., Vestbo, J., ... Vogelmeier, C. (2019). Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Lung Disease: the GOLD science committee report 2019. *The European Respiratory Journal*, *53*(5). <https://doi.org/10.1183/13993003.00164-2019>
- Smadja, D. M., Melero-Martin, J. M., Eikenboom, J., Bowman, M., Sabatier, F., & Randi, A. M. (2019). Standardization of methods to quantify and culture endothelial colony-forming cells derived from peripheral blood: Position paper from the International Society on Thrombosis and Haemostasis SSC. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, *17*(7), 1190–1194. <https://doi.org/10.1111/jth.14462>
- Song, H., & Tyml, K. (1993). Evidence for sensing and integration of biological signals by the capillary network. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, *265*(4 34-4). <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1993.265.4.h1235>
- Sové, R. J., Goldman, D., & Fraser, G. M. (2017). A computational model of the effect of capillary density variability on oxygen transport, glucose uptake, and insulin sensitivity in prediabetes. *Microcirculation*, *24*(2), e12342. <https://doi.org/10.1111/micc.12342>
- Špiranec, K., Chen, W., Werner, F., Nikolaev, V. O., Naruke, T., Werner, F. K. A., Eder-Negrin, P., Diéguez-Hurtado, R., Adams, R. H., Baba, H. A., Schmidt, H., Schuh, K., Skryabin, B. V., Movahedi, K., Schweda, F., & Kuhn, M. (2018a). Endothelial C-type natriuretic peptide acts on pericytes to regulate microcirculatory flow and blood pressure. *Circulation*, *138*(5), 494–508. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.033383>
- Špiranec, K., Chen, W., Werner, F., Nikolaev, V. O., Naruke, T., Werner, F. K. A., Eder-Negrin, P., Diéguez-Hurtado, R., Adams, R. H., Baba, H. A., Schmidt, H., Schuh, K., Skryabin, B. V., Movahedi, K., Schweda, F., & Kuhn, M. (2018b). Endothelial C-type natriuretic peptide acts on pericytes to regulate microcirculatory flow and blood pressure. *Circulation*, *138*(5), 494–508. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.033383>
- Spruit, M. A., Singh, S. J., Garvey, C., Zu Wallack, R., Nici, L., Rochester, C., Hill, K., Holland, A. E., Lareau, S. C., Man, W. D. C., Pitta, F., Sewell, L., Raskin, J., Bourbeau, J., Crouch, R., Franssen, F. M. E., Casaburi, R., Vercoulen, J. H., Vogiatzis, I., ... Wouters, E. F. M. (2013). An official American thoracic society/European respiratory society statement: Key concepts and advances in pulmonary rehabilitation. *American Journal*

of Respiratory and Critical Care Medicine, 188(8), e13-64. <https://doi.org/10.1164/rccm.201309-1634ST>

- Spruit, M. A., Singh, S. J., Garvey, C., ZuWallack, R., Nici, L., Rochester, C., Hill, K., Holland, A. E., Lareau, S. C., Man, W. D.-C., Pitta, F., Sewell, L., Raskin, J., Bourbeau, J., Crouch, R., Franssen, F. M. E., Casaburi, R., Vercoulen, J. H., Vogiatzis, I., ... Wouters, E. F. M. (2013). An Official American Thoracic Society/European Respiratory Society Statement: Key Concepts and Advances in Pulmonary Rehabilitation. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 188(8), e13–e64. <https://doi.org/10.1164/rccm.201309-1634ST>
- Spyratos, D., Chloros, D., Michalopoulou, D., & Sichletidis, L. (2016). Estimating the extent and economic impact of under and overdiagnosis of chronic obstructive pulmonary disease in primary care. *Chronic Respiratory Disease*, 13(3), 240–246. <https://doi.org/10.1177/1479972316636989>
- Stallcup, W. B. (2018). The NG2 proteoglycan in pericyte biology. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1109, 5–19. https://doi.org/10.1007/978-3-030-02601-1_2
- Steeghs, N., Rabelink, T. J., Op 't Roodt, J., Batman, E., Cluitmans, F. H. M., Weijl, N. I., de Koning, E., & Gelderblom, H. (2009). Reversibility of capillary density after discontinuation of bevacizumab treatment. *Annals of Oncology*, 21(5), 1100–1105. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdp417>
- Steeghs, Neeltje, Gelderblom, H., Roodt, J. O. T., Christensen, O., Rajagopalan, P., Hovens, M., Putter, H., Rabelink, T. J., & De Koning, E. (2008). Hypertension and rarefaction during treatment with telatinib, a Small molecule angiogenesis inhibitor. *Clinical Cancer Research*, 14(11), 3470–3476. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-5050>
- Steiner, S., Niessner, A., Ziegler, S., Richter, B., Seidinger, D., Pleiner, J., Penka, M., Wolzt, M., Huber, K., Wojta, J., Minar, E., & Kopp, C. W. (2005). Endurance training increases the number of endothelial progenitor cells in patients with cardiovascular risk and coronary artery disease. *Atherosclerosis*, 181(2), 305–310. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2005.01.006>
- Stelken, A. M., Younis, L. T., Jennison, S. H., Miller, D. D., Miller, L. W., Shaw, L. J., Kargl, D., & Chaitman, B. R. (1996). Prognostic value of cardiopulmonary exercise testing using percent achieved of predicted peak oxygen uptake for patients with ischemic and dilated cardiomyopathy. In *Journal of the American College of Cardiology* (Vol. 27, Issue 2). [https://doi.org/10.1016/0735-1097\(95\)00464-5](https://doi.org/10.1016/0735-1097(95)00464-5)
- Stoebner, P., Mezin, P., Vila, A., Grosse, R., Kopp, N., & Paramelle, B. (1989). Microangiopathy of endoneurial vessels in hypoxemic chronic obstructive pulmonary disease (COPD): A quantitative ultrastructural study. *Acta Neuropathologica*, 78(4), 388–395. <https://doi.org/10.1007/BF00688175>
- Stoller, J. K., & Aboussouan, L. S. (2005). α 1-antitrypsin deficiency. *Lancet*, 365(9478), 2225–2236. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)66781-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)66781-5)
- Stratman, A. N., Malotte, K. M., Mahan, R. D., Davis, M. J., & Davis, G. E. (2009). Pericyte recruitment during vasculogenic tube assembly stimulates endothelial basement membrane matrix formation. *Blood*, 114(24), 5091–5101. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-05-222364>
- Stratman, A. N., Saunders, W. B., Sacharidou, A., Koh, W., Fisher, K. E., Zawieja, D. C., Davis, M. J., & Davis, G. E. (2009). Endothelial cell lumen and vascular guidance tunnel formation requires MT1-MMP-dependent proteolysis in 3-dimensional collagen matrices. *Blood*, 114(2), 237–247. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-12-196451>
- Suri, C., McClain, J., Thurston, G., McDonald, D. M., Zhou, H., Oldmixon, E. H., Sato, T. N., & Yancopoulos, G. D. (1998). Increased vascularization in mice overexpressing angiopoietin-1. *Science*, 282(5388), 468–471. <https://doi.org/10.1126/science.282.5388.468>
- Svanes, Ø., Bertelsen, R. J., Lygre, S. H. L., Carsin, A. E., Anto, J. M., Forsberg, B., García-García, J. M., Gullón, J. A., Heinrich, J., Holm, M., Kogevinas, M., Urrutia, I., Leynaert, B., Moratalla, J. M., Le Moual, N., Lytras, T., Norbäck, D., Nowak, D., Olivieri, M., ... Svanes, C. (2018). Cleaning at home and at work in relation to lung function decline and airway obstruction. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 197(9), 1157–1163. <https://doi.org/10.1164/rccm.201706-1311OC>

- Takeyama, K., Dabbagh, K., Jeong Shim, J., Dao-Pick, T., Ueki, I. F., & Nadel, J. A. (2000). Oxidative Stress Causes Mucin Synthesis Via Transactivation of Epidermal Growth Factor Receptor: Role of Neutrophils. *The Journal of Immunology*, *164*(3), 1546–1552. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.3.1546>
- Teichert, M., Milde, L., Holm, A., Stanicek, L., Gengenbacher, N., Savant, S., Ruckdeschel, T., Hasanov, Z., Srivastava, K., Hu, J., Hertel, S., Bartol, A., Schlereth, K., & Augustin, H. G. (2017a). Pericyte-expressed Tie2 controls angiogenesis and vessel maturation. *Nature Communications*, *8*, 16106. <https://doi.org/10.1038/ncomms16106>
- Teichert, M., Milde, L., Holm, A., Stanicek, L., Gengenbacher, N., Savant, S., Ruckdeschel, T., Hasanov, Z., Srivastava, K., Hu, J., Hertel, S., Bartol, A., Schlereth, K., & Augustin, H. G. (2017b). Pericyte-expressed Tie2 controls angiogenesis and vessel maturation. *Nature Communications*, *8*. <https://doi.org/10.1038/ncomms16106>
- Thom, R., Rowe, G. C., Jang, C., Safdar, A., & Arany, Z. (2014). Hypoxic induction of vascular endothelial growth factor (VEGF) and angiogenesis in muscle by truncated peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator (PGC)-1 α . *Journal of Biological Chemistry*, *289*(13), 8810–8817. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.554394>
- Thorell, D., Borjesson, M., Larsson, P., Ulfhammer, E., Karlsson, L., & DuttaRoy, S. (2009). Strenuous exercise increases late outgrowth endothelial cells in healthy subjects. *European Journal of Applied Physiology*, *107*(4), 481–488. <https://doi.org/10.1007/s00421-009-1144-0>
- Tilton, R. G., Hoffmann, P. L., Kilo, C., & Williamson, J. R. (1981). Pericyte degeneration and basement membrane thickening in skeletal muscle capillaries of human diabetics. *Diabetes*, *30*(4), 326–334. <https://doi.org/10.2337/diab.30.4.326>
- Tilton, R. G., Kilo, C., Williamson, J. R., & Murch, D. W. (1979). Differences in pericyte contractile function in rat cardiac and skeletal muscle microvasculatures. *Microvascular Research*, *18*(3), 336–352. [https://doi.org/10.1016/0026-2862\(79\)90042-6](https://doi.org/10.1016/0026-2862(79)90042-6)
- Timmons, J. A., Jansson, E., Fischer, H., Gustafsson, T., Greenhaff, P. L., Riddén, J., Rachman, J., & Sundberg, C. J. (2005a). Physiological Adaptation To Aerobic Exercise Training in Humans. *BMC Biology*, *4*, 1–10. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-3-19>
- Timmons, J. A., Jansson, E., Fischer, H., Gustafsson, T., Greenhaff, P. L., Riddén, J., Rachman, J., & Sundberg, C. J. (2005b). Modulation of extracellular matrix genes reflects the magnitude of physiological adaptation to aerobic exercise training in humans. *BMC Biology*, *3*, 19. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-3-19>
- Tinken, T. M., Thijssen, D. H. J., Hopkins, N., Black, M. A., Dawson, E. A., Minson, C. T., Newcomer, S. C., Laughlin, M. H., Cable, N. T., & Green, D. J. (2009). Impact of shear rate modulation on vascular function in humans. *Hypertension*, *54*(2), 278–285. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.134361>
- Tinken, T. M., Thijssen, D. H. J., Black, M. A., Cable, N. T., & Green, D. J. (2008). Time course of change in vasodilator function and capacity in response to exercise training in humans. *Journal of Physiology*, *586*(20), 5003–5012. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.158014>
- Triest, F. J. J., Singh, S. J., & Vanfleteren, L. E. G. W. (2016). Cardiovascular risk, chronic obstructive pulmonary disease and pulmonary rehabilitation: Can we learn from cardiac rehabilitation? *Chronic Respiratory Disease*, *13*(3), 286–294. <https://doi.org/10.1177/1479972316642367>
- Tsai, G. Y., Cui, J. Z., Syed, H., Xia, Z., Ozerdem, U., McNeill, J. H., & Matsubara, J. A. (2009). Effect of N-acetylcysteine on the early expression of inflammatory markers in the retina and plasma of diabetic rats. *Clinical and Experimental Ophthalmology*, *37*(2), 223–231. <https://doi.org/10.1111/j.1442-9071.2009.02000.x>
- ur Rehman, A., Ahmad Hassali, M. A., Muhammad, S. A., Shah, S., Abbas, S., Hyder Ali, I. A. Bin, & Salman, A. (2019). The economic burden of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in the USA, Europe, and Asia: results from a systematic review of the literature. *Expert Review of Pharmacoeconomics and Outcomes Research*, *00*(00), 1–12. <https://doi.org/10.1080/14737167.2020.1678385>

- Vaes, A. W., Spruit, M. A., Theunis, J., Goswami, N., Vanfleteren, L. E., Franssen, F. M. E., Wouters, E. F. M., & De Boever, P. (2017). Endothelial function in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review of studies using flow mediated dilatation. *Expert Review of Respiratory Medicine*, *11*(12), 1021–1031. <https://doi.org/10.1080/17476348.2017.1389277>
- Vallet, G., Ahmaïdi, S., Serres, I., Fabre, C., Bourgoïn, D., Desplan, J., Varray, A., & Préfaut, C. (1997a). Comparison of two training programmes in chronic airway limitation patients: Standardized versus individualized protocols. *European Respiratory Journal*, *10*(1), 114–122. <https://doi.org/10.1183/09031936.97.10010114>
- Vallet, G., Ahmaïdi, S., Serres, I., Fabre, C., Bourgoïn, D., Desplan, J., Varray, A., & Préfaut, C. (1997b). Comparison of two training programmes in chronic airway limitation patients: standardized <l>versus</l> individualized protocols. *European Respiratory Journal*, *10*(1), 114–122. <https://doi.org/10.1183/09031936.97.10010114>
- Van Craenenbroeck, E. M., Beckers, P. J., Possemiers, N. M., Wuyts, K., Frederix, G., Hoymans, V. Y., Wuyts, F., Paelinck, B. P., Vrints, C. J., & Conraads, V. M. (2010). Exercise acutely reverses dysfunction of circulating angiogenic cells in chronic heart failure. *European Heart Journal*, *31*(15), 1924–1934. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehq058>
- Van Craenenbroeck, E. M., Hoymans, V. Y., Beckers, P. J., Possemiers, N. M., Wuyts, K., Paelinck, B. P., Vrints, C. J., & Conraads, V. M. (2010). Exercise training improves function of circulating angiogenic cells in patients with chronic heart failure. *Basic Research in Cardiology*, *105*(5), 665–676. <https://doi.org/10.1007/s00395-010-0105-4>
- Van Guilder, G. P., Westby, C. M., Greiner, J. J., Stauffer, B. L., & DeSouza, C. A. (2007). Endothelin-1 vasoconstrictor tone increases with age in healthy men but can be reduced by regular aerobic exercise. *Hypertension*, *50*(2), 403–409. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.088294>
- Vanfleteren, L. E. G. W., Spruit, M. A., Groenen, M., Gaffron, S., Van Empel, V. P. M., Bruijnzeel, P. L. B., Rutten, E. P. A., Roodt, J. O. t., Wouters, E. F. M., & Franssen, F. M. E. (2013a). Clusters of comorbidities based on validated objective measurements and systemic inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *187*(7), 728–735. <https://doi.org/10.1164/rccm.201209-1665OC>
- Vanfleteren, L. E. G. W., Spruit, M. A., Groenen, M., Gaffron, S., Van Empel, V. P. M., Bruijnzeel, P. L. B., Rutten, E. P. A., Roodt, J. O. t., Wouters, E. F. M., & Franssen, F. M. E. (2013b). Clusters of comorbidities based on validated objective measurements and systemic inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *187*(7), 728–735. <https://doi.org/10.1164/rccm.201209-1665OC>
- Vanfleteren, L. E. G. W., Spruit, M. A., Groenen, M. T. J., Bruijnzeel, P. L. B., Taib, Z., Rutten, E. P. A., 'T Roodt, J. O., Akkermans, M. A., Wouters, E. F. M., & Franssen, F. M. E. (2014). Arterial stiffness in patients with COPD: The role of systemic inflammation and the effects of pulmonary rehabilitation. *European Respiratory Journal*, *43*(5), 1306–1315. <https://doi.org/10.1183/09031936.00169313>
- Vanfleteren, L. E. G. W., Spruit, M. A., Wouters, E. F. M., & Franssen, F. M. E. (2016). Management of chronic obstructive pulmonary disease beyond the lungs. *The Lancet Respiratory Medicine*, *4*(11), 911–924. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(16\)00097-7](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(16)00097-7)
- Vogelmeier, C. F., Criner, G. J., Martinez, F. J., Anzueto, A., Barnes, P. J., Bourbeau, J., Celli, B. R., Chen, R., Decramer, M., Fabbri, L. M., Frith, P., Halpin, D. M. G., Varela, M. V. L., Nishimura, M., Roche, N., Rodriguez-Roisin, R., Sin, D. D., Singh, D., Stockley, R., ... Agustí, A. (2017). Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive lung disease 2017 report. In *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* (Vol. 195, Issue 5, pp. 557–582). American Thoracic Society. <https://doi.org/10.1164/rccm.201701-0218PP>
- Vogiatis, I., Simoes, D. C. M., Stratakos, G., Kourepini, E., Terzis, G., Manta, P., Athanasopoulos, D., Roussos, C., Wagner, P. D., & Zakyntinos, S. (2010). Effect of pulmonary rehabilitation on muscle remodelling in

- cachectic patients with COPD. *European Respiratory Journal*, 36(2), 301–310. <https://doi.org/10.1183/09031936.00112909>
- Vono, R., Fuoco, C., Testa, S., Pirr , S., Maselli, D., McCollough, D. F., Sangalli, E., Pintus, G., Giordo, R., Finzi, G., Sessa, F., Cardani, R., Gotti, A., Losa, S., Cesareni, G., Rizzi, R., Bearzi, C., Cannata, S., Spinetti, G., ... Madeddu, P. (2016). Activation of the pro-oxidant PKC β 1p66Shc Signaling pathway contributes to pericyte dysfunction in skeletal muscles of patients with diabetes with critical limb Ischemia. *Diabetes*, 65(12), 3691–3704. <https://doi.org/10.2337/db16-0248>
- Wacker, M. E., J rres, R. A., Schulz, H., Heinrich, J., Karrasch, S., Karch, A., Koch, A., Peters, A., Leidl, R., Vogelmeier, C., & Holle, R. (2016). Direct and indirect costs of COPD and its comorbidities: Results from the German COSYCONET study. *Respiratory Medicine*, 111, 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2015.12.001>
- Wain, L. V., Shrine, N., Artigas, M. S., Erzurumluoglu, A. M., Noyvert, B., Bossini-Castillo, L., Obeidat, M., Henry, A. P., Portelli, M. A., Hall, R. J., Billington, C. K., Rimington, T. L., Fenech, A. G., John, C., Blake, T., Jackson, V. E., Allen, R. J., Prins, B. P., Campbell, A., ... Tobin, M. D. (2017). Genome-wide association analyses for lung function and chronic obstructive pulmonary disease identify new loci and potential druggable targets. *Nature Genetics*, 49(3), 416–425. <https://doi.org/10.1038/ng.3787>
- Wassmann, S., Werner, N., Czech, T., & Nickenig, G. (2006). Improvement of Endothelial Function by Systemic Transfusion of Vascular Progenitor Cells. *Circulation Research*, 99(8). <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000246095.90247.d4>
- Watz, H., Waschki, B., Meyer, T., & Magnussen, H. (2009). Physical activity in patients with COPD. *European Respiratory Journal*, 33(2), 262–272. <https://doi.org/10.1183/09031936.00024608>
- Werner, N., Kosiol, S., Schiegl, T., Ahlers, P., Walenta, K., Link, A., B hm, M., & Nickenig, G. (2005). Circulating Endothelial Progenitor Cells and Cardiovascular Outcomes. In *N Engl J Med* (Vol. 353). www.nejm.org
- Whittom, F., Jobin, J., Simard, P. M., Leblanc, P., Simard, C., Bernard, S., Belleau, R., & Maltais, F. (1998). Histochemical and morphological characteristics of the vastus lateralis muscle in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 30(10), 1467–1474. <https://doi.org/10.1097/00005768-199810000-00001>
- Williams, M. C., Murchison, J. T., Edwards, L. D., Agust , A., Bakke, P., Calverley, P. M. A., Celli, B., Coxson, H. O., Crim, C., Lomas, D. A., Miller, B. E., Rennard, S., Silverman, E. K., Tal-Singer, R., Vestbo, J., Wouters, E., Yates, J. C., Van Beek, E. J. R., Newby, D. E., & MacNee, W. (2014). Coronary artery calcification is increased in patients with COPD and associated with increased morbidity and mortality. *Thorax*, 69(8), 718–723. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2012-203151>
- Withers, N. J., Rudkin, S. T., & White, R. J. (1999). Anxiety and depression in severe chronic obstructive pulmonary disease: The effects of pulmonary rehabilitation. *Journal of Cardiopulmonary Rehabilitation*, 19(6), 362–365. <https://doi.org/10.1097/00008483-199911000-00007>
- Witkowski, S., Lockard, M. M., Jenkins, N. T., Obisesan, T. O., Spangenburg, E. E., & Hagberg, J. M. (2010). Relationship between circulating progenitor cells, vascular function and oxidative stress with long-term training and short-term detraining in older men. *Clinical Science*, 118(4), 303–311. <https://doi.org/10.1042/CS20090253>
- Wu, L. W., Mayo, L. D., Dunbar, J. D., Kessler, K. M., Baerwald, M. R., Jaffe, E. A., Wang, D., Warren, R. S., & Donner, D. B. (2000). Utilization of distinct signaling pathways by receptors for vascular endothelial cell growth factor and other mitogens in the induction of endothelial cell proliferation. *Journal of Biological Chemistry*, 275(7), 5096–5103. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.7.5096>
- Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, Y., Goto, K., & Masaki, T. (1988). A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. In *Nature* (Vol. 332, Issue 6163, pp. 411–415). <https://doi.org/10.1038/332411a0>
- Yang, Y. M., Huang, A., Kaley, G., & Sun, D. (2009). eNOS uncoupling and endothelial dysfunction in aged vessels.

- American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 297(5), 1829–1836. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00230.2009>
- Yang, Z., Wang, J. M., Chen, L., Luo, C. F., Tang, A. L., & Tao, J. (2007). Acute exercise-induced nitric oxide production contributes to upregulation of circulating endothelial progenitor cells in healthy subjects. *Journal of Human Hypertension*, 21(6), 452–460. <https://doi.org/10.1038/sj.jhh.1002171>
- Yeboah, J., Crouse, J. R., Hsu, F. C., Burke, G. L., & Herrington, D. M. (2007). Brachial flow-mediated dilation predicts incident cardiovascular events in older adults: The cardiovascular health study. *Circulation*, 115(18), 2390–2397. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.678276>
- Yemisci, M., Gursoy-Ozdemir, Y., Vural, A., Can, A., Topalkara, K., & Dalkara, T. (2009). Pericyte contraction induced by oxidative-nitrative stress impairs capillary reflow despite successful opening of an occluded cerebral artery. *Nature Medicine*, 15(9), 1031–1037. <https://doi.org/10.1038/nm.2022>
- Yu, J., DeMunck, E. D., Zhuang, Z., Drinane, M., Kauser, K., Rubanyi, G. M., Qian, H. S., Murata, T., Escalante, B., & Sessa, W. C. (2005). Endothelial nitric oxide synthase is critical for ischemic remodeling, mural cell recruitment, and blood flow reserve. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(31), 10999–11004. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501444102>
- Zeng, H., He, X., Tuo, Q. H., Liao, D. F., Zhang, G. Q., & Chen, J. X. (2016). LPS causes pericyte loss and microvascular dysfunction via disruption of Sirt3/angiopoietins/Tie-2 and HIF-2 α /Notch3 pathways. *Scientific Reports*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/srep20931>
- Zheng, C., & Liu, Z. (2015). Vascular function, insulin action, and exercise: An intricate interplay. In *Trends in Endocrinology and Metabolism* (Vol. 26, Issue 6, pp. 297–304). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2015.02.002>
- Zyoud, S. H., Al-Jabi, S. W., & Sweileh, W. M. (2014). Worldwide research productivity in the field of electronic cigarette: A bibliometric analysis. *BMC Public Health*, 14(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-14-667>

Résumé

La broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) est une maladie respiratoire chronique associée à une intolérance à l'effort et à des comorbidités cardiovasculaires. Ces éléments apparaissent intimement liés à la structure et la fonction des capillaires sanguins musculaires mais également des artères en amont. Bien que le réentrainement à l'effort (REE) ait un effet bénéfique sur la fonction vasculaire chez les sujets sains, cet effet semble émoussé chez les patients BPCO. L'objectif de ces travaux de thèse était ainsi de comprendre les défauts d'adaptation vasculaire chez les patients BPCO en réponse au REE. Dans une première étude, nous avons analysé l'angiogenèse musculaire à l'échelon ultrastructural, chez des patients BPCO et des sujets contrôles sédentaires sains (CSS) au cours d'un REE et avons mis en évidence des défauts d'interaction péricyte/capillaire chez les patients. Dans une deuxième étude, nous avons recherché des anomalies d'adaptation de la couverture péricytaire au cours de l'angiogenèse induite par le REE chez les patients BPCO, ainsi que l'effet de facteurs circulants sur les déterminants de la couverture péricytaire. Nous avons ainsi montré un défaut d'adaptation de la couverture péricytaire durant l'angiogenèse induite par le REE après 10 semaines de REE chez des patients BPCO par rapport à des CSS. De plus, nous avons pu observer que le sérum des patients BPCO perturbait le recrutement péricytaire *in vitro*. Dans une troisième étude, nous avons étudié l'expression de la voie PGC1- α musculaire et de ses effecteurs pro-angiogéniques, en réponse à une stimulation par l'exercice, chez des patients BPCO et des CSS. Grâce à l'isolement, la différenciation et la stimulation de cellules souches musculaires issues de muscles de patients BPCO et de CSS, nous avons démontré une altération de l'expression de PGC1- α dans les cellules musculaires de patients BPCO sous l'effet d'une stimulation électrique par impulsion. Une réduction de la production de SPP1 par ces cellules a également été trouvée, limitant leur capacité d'orchestration de la maturation capillaire. Dans une quatrième étude nous nous sommes intéressés aux déterminants cliniques, fonctionnels, cellulaires et moléculaires impliqués dans le défaut de réponse de la vasoréactivité artérielle au REE chez le patient BPCO. Pour cela, nous avons mis au point un protocole d'étude clinique multicentrique et démontré sa faisabilité. Au final, ces travaux de thèse ont permis une meilleure compréhension des mécanismes de l'atteinte capillaire et de l'angiogenèse émoussée du patient BPCO. Alors que l'altération du nombre de capillaires sanguins musculaires semblait être un processus tardif, nous avons montré un défaut inédit et précoce de couverture péricytaire chez ces patients. De plus, nous avons pu identifier certains acteurs potentiellement à l'origine de cette altération : les facteurs circulants délétères de la maladie et des anomalies de la cellule musculaire. La perspective de cette thèse sera de mieux comprendre les causes et les conséquences du défaut de couverture péricytaire durant l'angiogenèse musculaire chez le patient BPCO.

Mots-clés : BPCO, Réentrainement à l'effort, capillaires musculaires, muscle squelettique, péricytes, cellule endothéliale

Abstract

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a chronic respiratory disease associated with exercise intolerance and cardiovascular comorbidities. These elements appear to be closely linked to the structure and function of muscle capillaries but also of upstream arteries. Although exercise training (ET) provide a beneficial effect on vascular function in healthy subjects, this effect appears to be blunt in COPD patients. The aim of this thesis work was thus to understand the impairments of the vascular adaptations to ET in COPD patients. In a first study, we analysed capillary ultrastructure during muscle angiogenesis in COPD patients and healthy sedentary control (HSC) subjects during an ET and demonstrated disturbances in pericyte/capillary interactions in patients. In a second study, we looked for abnormalities of pericyte coverage adaptations during ET-induced angiogenesis in COPD patients, as well as the effect of circulating factors on the determinants of pericyte coverage. We have thus shown a lack of pericyte coverage adaptation during ET-induced angiogenesis after 10 weeks of ET in COPD patients. In addition, we were able to observe that COPD patient's serum disturbed pericyte recruitment *in vitro*. In a third study, we investigated the PGC1- α pathway expression and its proangiogenic effectors in the skeletal muscle stimulated with exercise, in patients with COPD and HSC. Through the isolation, differentiation and stimulation of muscle stem cells from muscles of COPD and HSC patients, we have demonstrated an impairment of the raise of PGC1- α expression under electrical pulse stimulation in muscle cells of COPD patients. A reduction in the production of SPP1 by these cells has also been found, limiting their ability to orchestrate capillary maturation. In a fourth study, we were interested in the clinical, functional, cellular and molecular determinants involved in the lack of response of arterial vasoreactivity to ET in COPD patients. To address these questions, we have developed a multicenter clinical study protocol and demonstrated its feasibility. To conclude, this thesis work provided a better understanding of the mechanisms of capillary impairments and blunted angiogenesis in COPD patients. While the alteration in the muscle capillary number appeared to be a late process, we showed a novel and early lack of pericyte coverage in these patients. In addition, we were able to identify some actors potentially at the origin of this impairment: the deleterious circulating factors of the disease and some abnormalities of the skeletal muscle cell. The perspective of this thesis will be to better understand the causes and consequences of the pericyte coverage defect during the skeletal muscle angiogenesis in COPD patients.

Keywords: COPD, exercise training, muscle capillaries, skeletal muscle, pericytes, endothelial cell.