



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

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

## 6. ANALYSES HISTOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES

### 6.1. Observation de coupes histologiques

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



## 6.2. Western Blots

### 6.2.1. Extraction et préparation des échantillons

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

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

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

### 6.2.2. Dosage des protéines

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

### 6.2.3. Western Immunoblotting

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



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

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

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

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

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



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

### **6.3. Evaluation du profil des adipokines sécrétées par le tissu adipeux périvasculaire (Proteome Profiler™, RnDSYSTEMS)**

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

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

### **6.4. Évaluation du stress oxydant aortique**

#### **6.4.1. Résonance Paramagnétique Électronique (RPE).**

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

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



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

- **Protocole expérimental**

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

#### 6.4.2. Dihydroéthidium (DHE)

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



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

## 7. ANALYSES STATISTIQUES

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

# RÉSULTATS