

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### **2.2.2. Chez le sujet obèse**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## **- Objectifs -**

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

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

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

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

# **- Méthodologie générale -**

## **Préambule**

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

# **I. Populations**

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

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

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

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

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

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

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

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

## **II. Méthodologie**

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

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

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

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

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

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

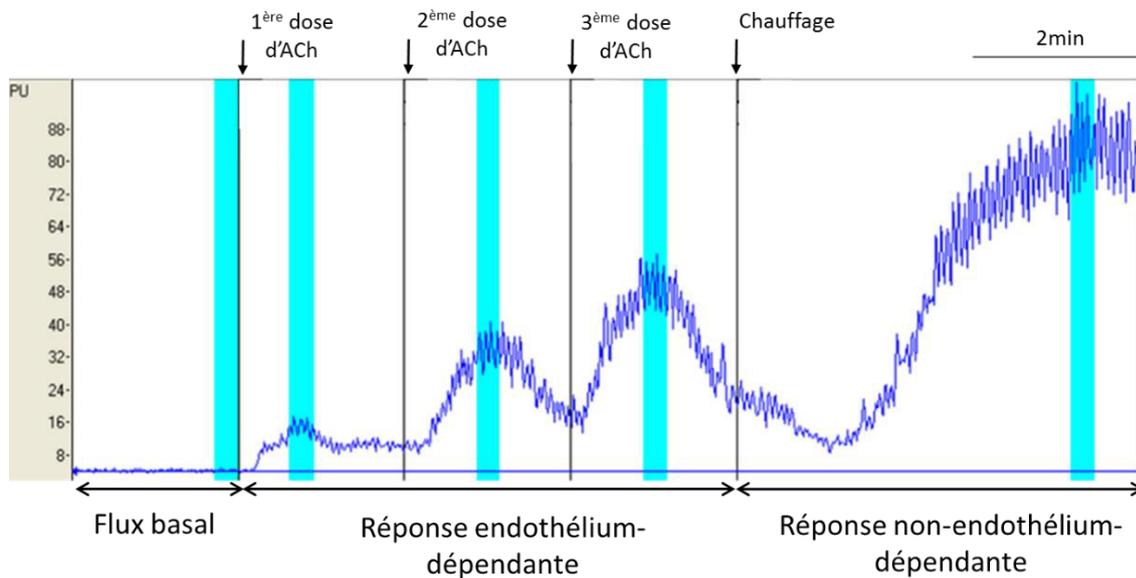


Figure 14 : Protocole d'exploration de la fonction endothéliale par débitmétrie laser doppler couplée à l'iontophorèse

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

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

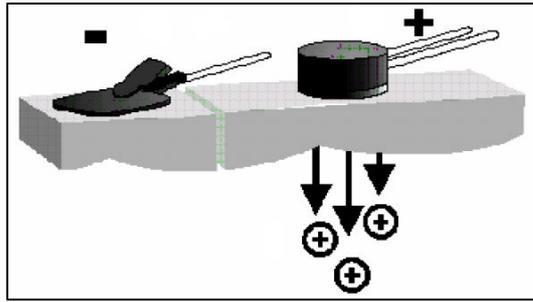


Figure 15 : Couplage laser doppler-iontophorèse au niveau anodal. L'ACh chargé positivement est diffusé à travers la peau au niveau de l'anode (+). La cathode (-) est fixée sur un patch de référence placé à distance. La sonde laser doppler est placée sur l'anode

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### ***5.1. Récupération des MPs***

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

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

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

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

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

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

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

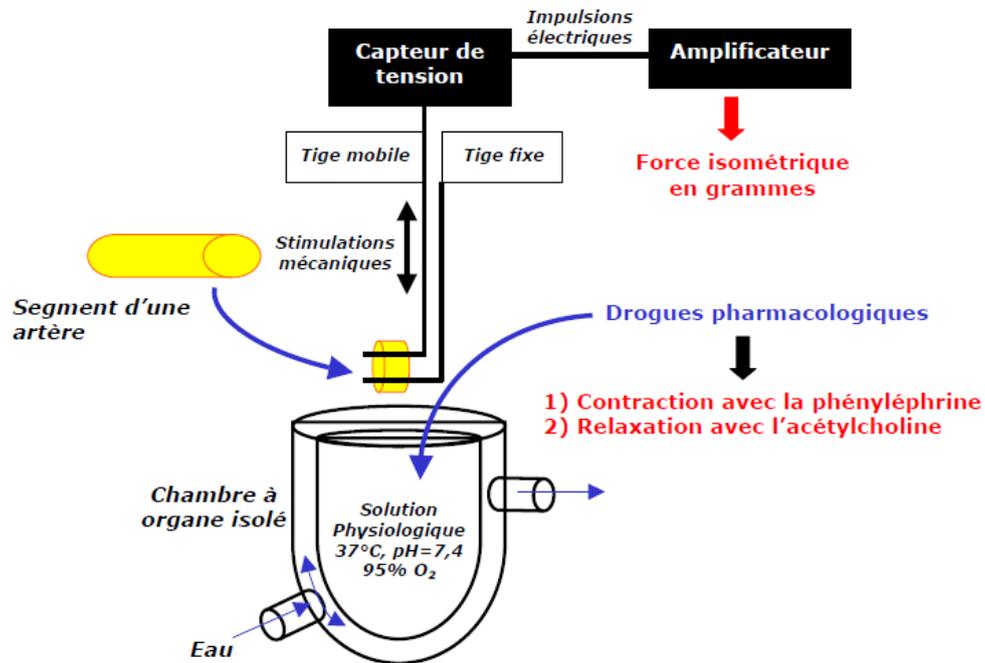


Figure 16: Principe de l'exploration ex vivo de la fonction endothéliale sur des anneaux d'aorte en chambre à organe isolé

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

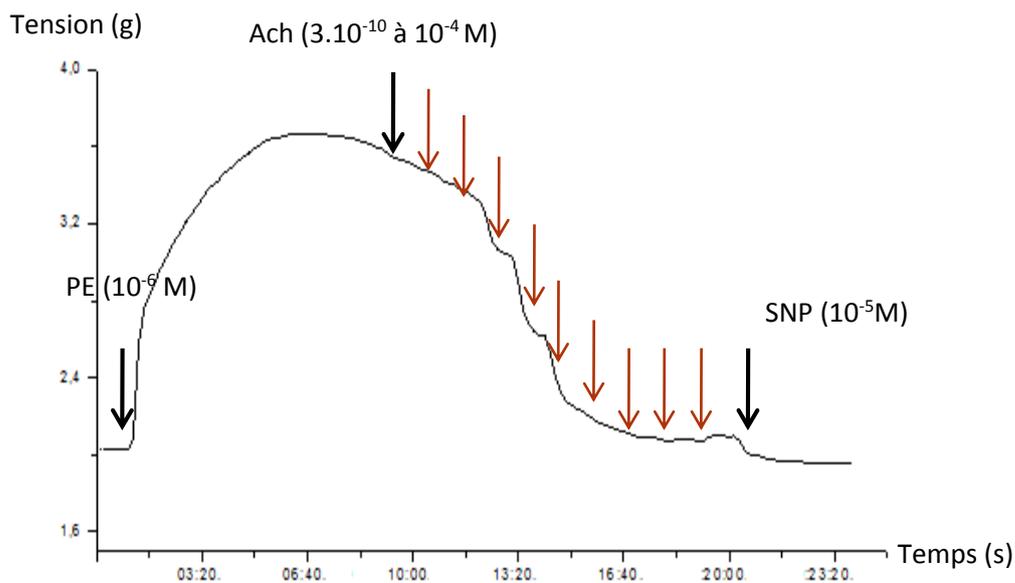


Figure 17 : Protocole de mesure de la réactivité vasculaire des anneaux d'aorte de rat suite à des stimuli chimiques (PE, Ach en concentrations croissantes puis SNP)

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

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

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

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

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

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

### **5.4.3. Western immunoblotting**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## 7. Traitement statistique

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

## **- Résultats -**

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

## **But de l'étude**

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

## **Méthodologie**

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

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

# Résultats

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

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

## 2. Mesures anthropométriques

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

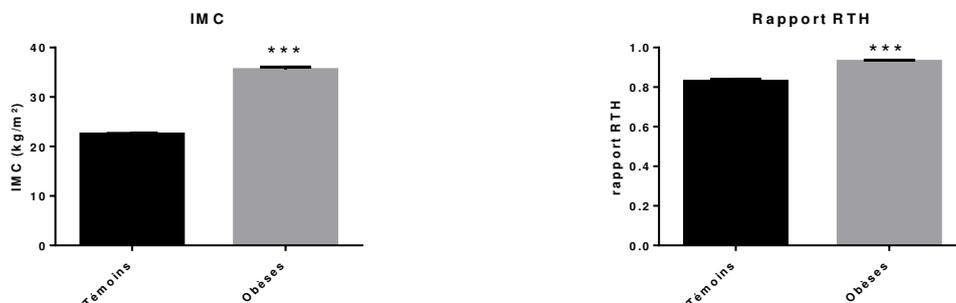


Figure 18 : Paramètres anthropométriques chez les sujets obèses et contrôles. \*\*\*p<0.001

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

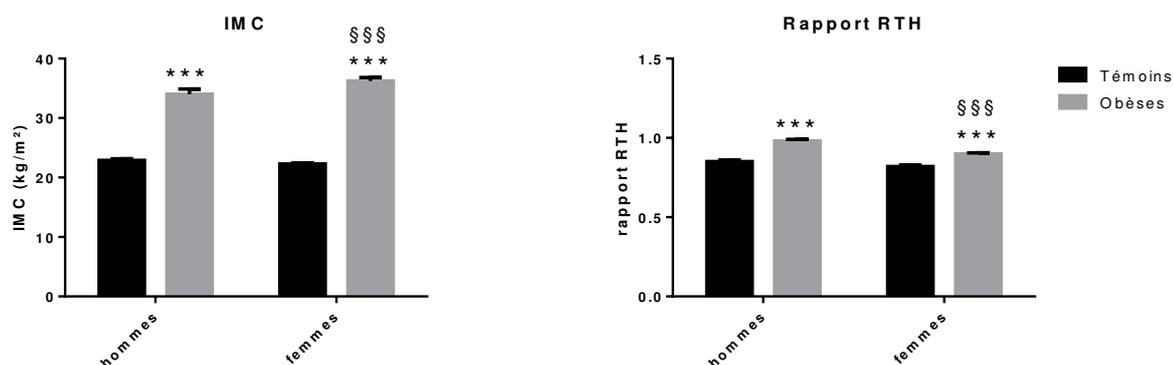


Figure 19: Paramètres anthropométriques des sujets obèses et contrôles en fonction du sexe  
\*\*\* $p < 0.001$  ; §§§ $p < 0.001$  femmes versus hommes

### 3. Paramètres lipidiques et glycémie

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

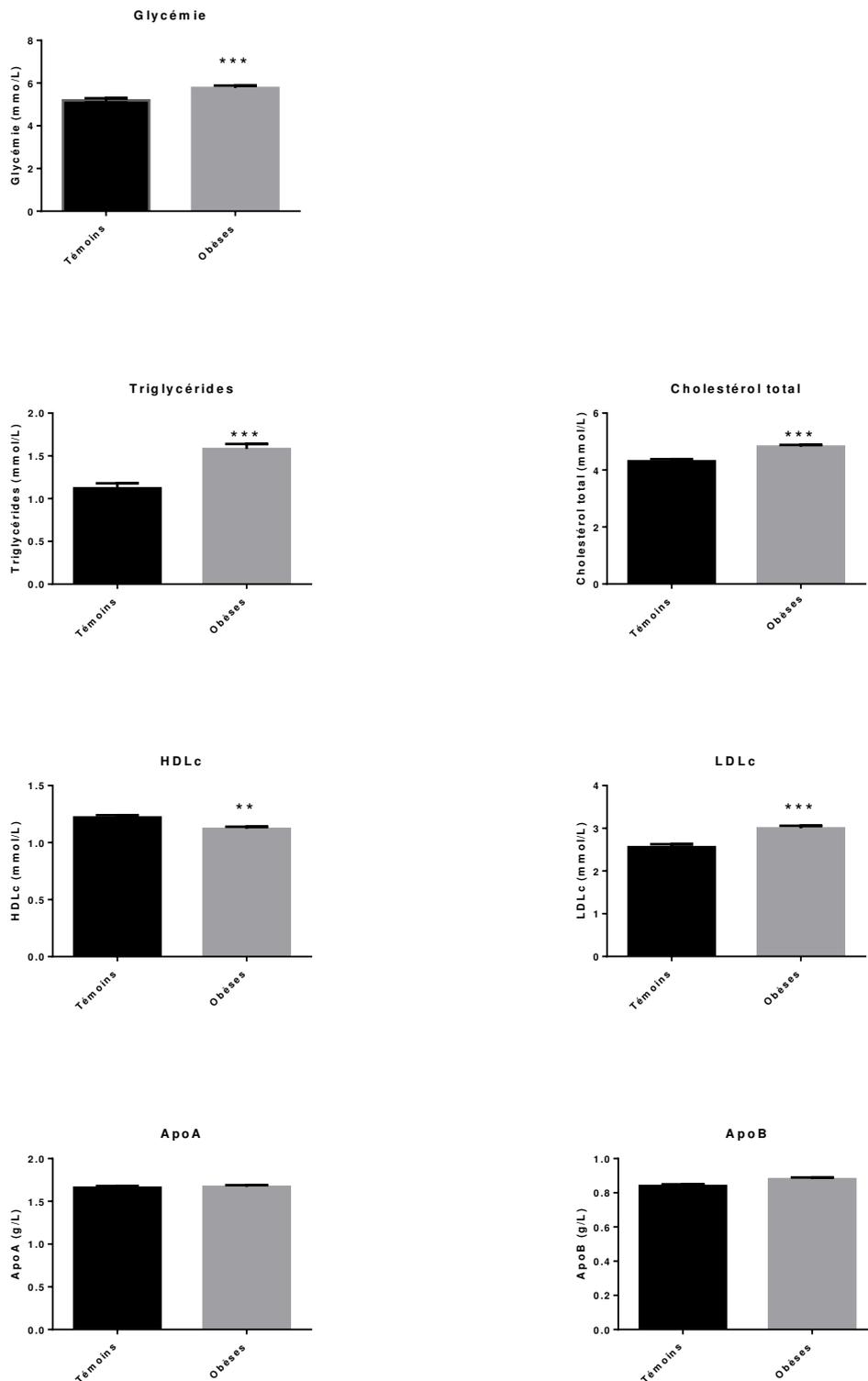


Figure 20: Paramètres lipidiques et glycémie chez les sujets obèses et contrôles.  
 \*\*\* $p < 0.001$

#### 4. Paramètres inflammatoires

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

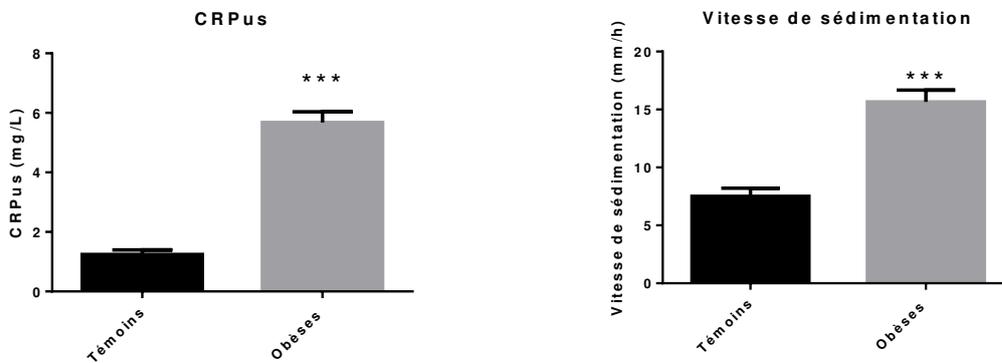


Figure 21 : Marqueurs inflammatoires chez les sujets obèses et contrôles. \*\*\* $p < 0.001$

#### 5. Evaluation du stress oxydant

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

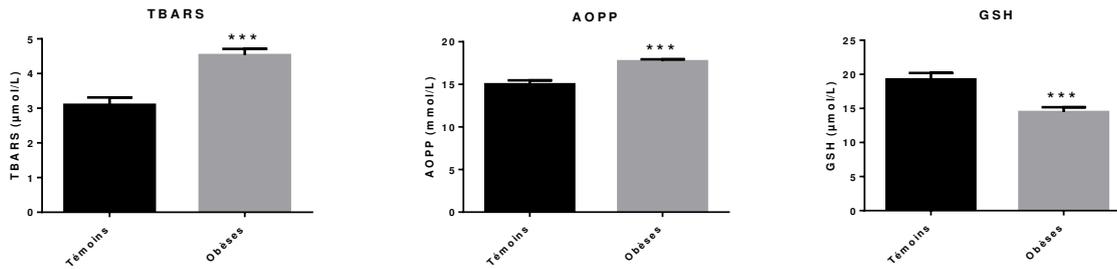


Figure 22: Paramètres du stress oxydant au niveau plasmatique chez les sujets obèses et contrôles. De gauche à droite : Marqueur de la peroxydation lipidique (TBARS) ; Marqueur de l'oxydation des protéines (AOPP) ; GSH plasmatique. \*\*\* $p < 0.001$

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

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

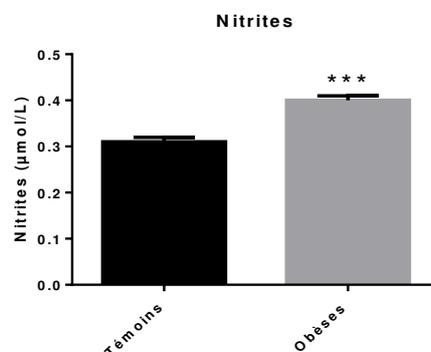


Figure 23 : Taux de nitrites plasmatique chez les sujets obèses et contrôles. \*\*\* $p < 0.001$

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

## **Discussion**

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

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

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

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