

Étude n°4 :

**Effets de l'exercice physique sur la
microcirculation du tissu adipeux chez la souris
normopondérée :**

Implication de l'axe Mdm2-FoxOs

1) But de l'étude :

Lors de ce travail de thèse, nous avons également voulu, en dernier lieu, appréhender les effets de l'exercice sur la microcirculation du tissu adipeux chez la souris normopondérée. Nous avons cherché à savoir si, dans un environnement tissulaire différent du contexte pathologique retrouvé chez l'obèse, l'exercice pouvait également constituer un stimulus pro-angiogénique, capable d'induire un processus de croissance vasculaire au sein des tissus adipeux blancs et bruns. En condition physiologique, la balance angio-adaptative est dans un état d'équilibre dynamique permettant d'assurer la maintenance d'un réseau capillaire structuré, en adéquation avec les besoins métaboliques et en oxygène du tissu adipeux. Si l'exercice physique est en mesure de modifier l'homéostasie vasculaire du tissu adipeux chez la souris saine, par quels mécanismes moléculaires cela peut-il être expliqué? Et quelles conséquences cela peut-il avoir sur les fonctions endocrines et métaboliques du tissu adipeux ?

Pour répondre à toutes ces interrogations, nous avons utilisé des souris soumises à régime alimentaire standard et à un protocole d'exercice physique volontaire de 7 semaines, identique au protocole utilisé chez les souris HFS. À la fin des 7 semaines, nous avons évalué les effets de l'exercice sur : 1) la masse et la taille adipocytaire des tissus adipeux blancs épидидymal et sous-cutané, ainsi que du brun interscapulaire ; 2) la microcirculation du tissu adipeux estimée via un immuno-marquage au CD31 sur des coupes de tissu adipeux épидидymal (EWAT), sous-cutané (ScWAT) et brun (BAT) ; 3) l'équilibre de la balance angio-adaptative en mesurant l'expression du niveau messager et protéique des facteurs angiogéniques VEGF-A et TSP-1 dans ces tissus adipeux ; 4) l'implication des protéines Mdm2 et FoxOs dans la régulation de cette balance angio-adaptative ; 5) l'expression des adipokines, des gènes de l'adipogénèse et de la thermogénèse dans les différents tissus adipeux.

Figure 35

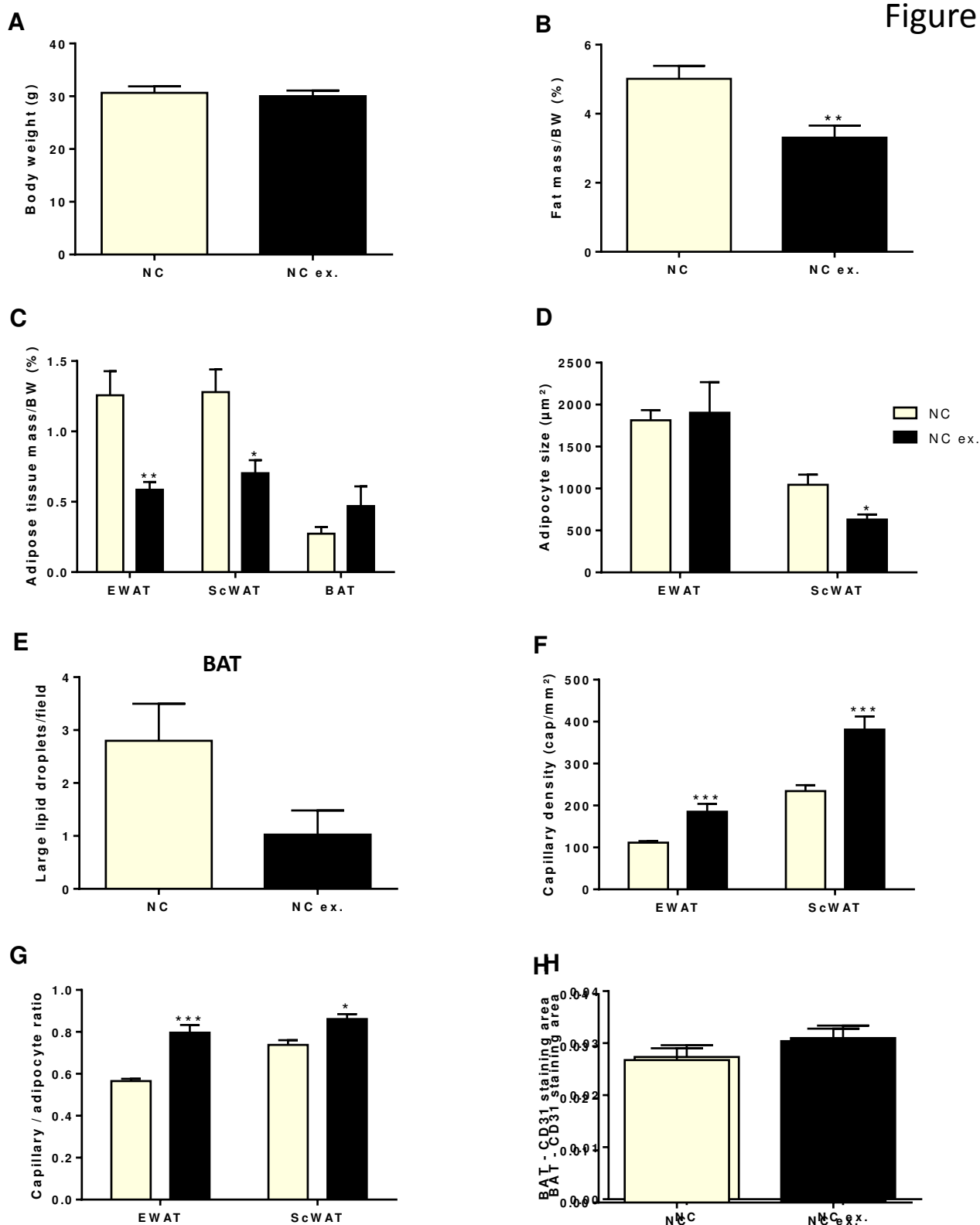


Figure 35: Effets de l'exercice physique volontaire sur la masse et la microcirculation des tissus adipeux chez la souris. Masse corporelle (A), pourcentage de masse grasse totale (B) et des tissus adipeux viscéral (EWAT), sous-cutané (ScWAT) et brun (BAT) (C) chez les souris contrôles sédentaires (NC) et contrôles après 7 semaines d'exercice physique volontaire (NC ex.). (D) Évaluation de la taille moyenne des adipocytes après marquage H&E sur coupe de EWAT et ScWAT. (E) Présence de larges gouttelettes lipidiques sur les coupes de BAT. Après marquage immuno-histochimique au CD31 sur

coupes de tissu adipeux, mesure de la densité capillaire (F) et du ratio capillaire par adipocyte (G) dans le EWAT et ScWAT, ainsi que l'aire de marquage au CD31 dans le BAT (H). Données exprimées en moyenne $\pm$ SEM (n=5 par groupe). * P<0.05 ** P<0.01, *** P<0.005 (relatif aux NC). Test-T de Student non-apparié.

Figure 36

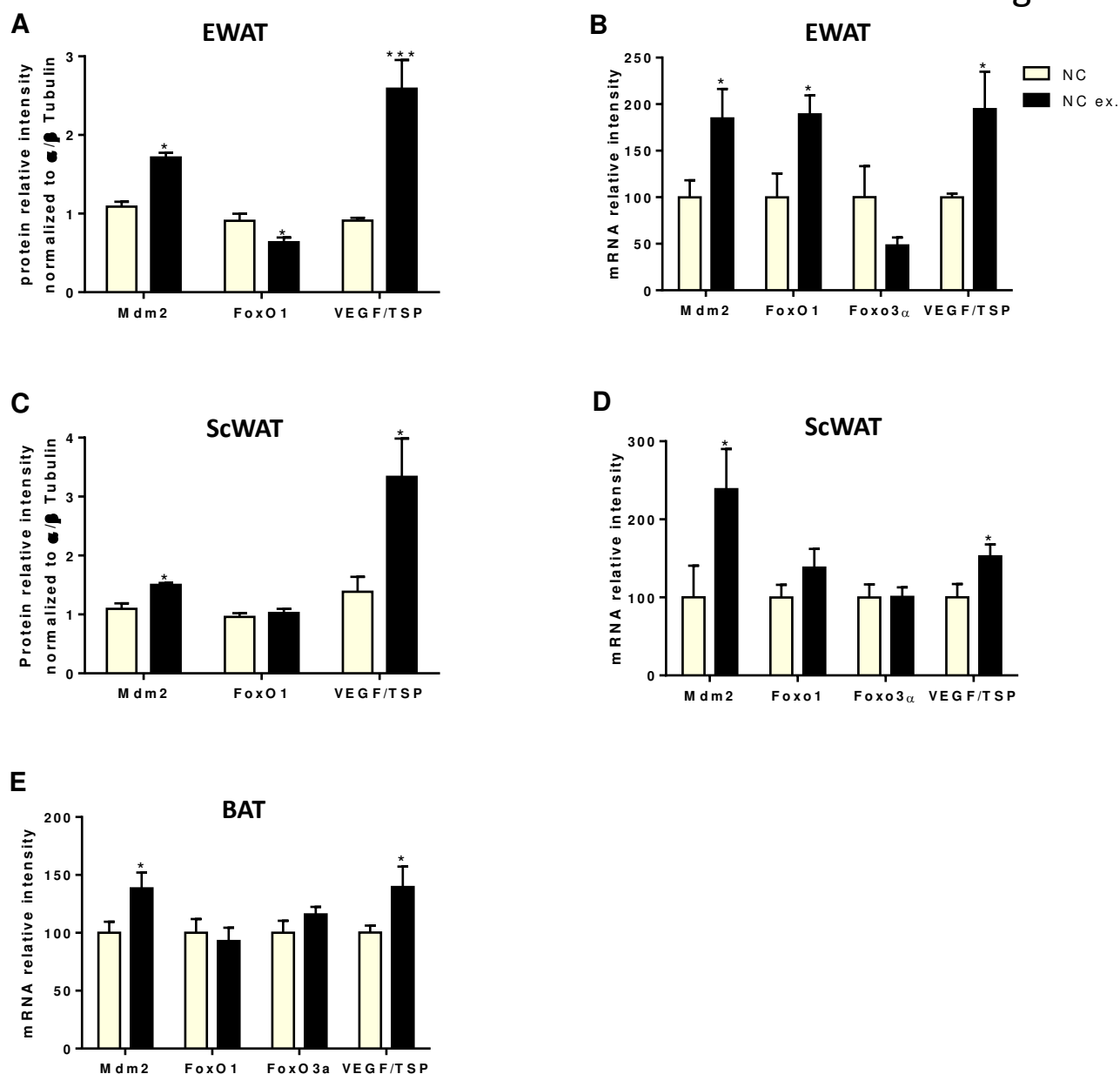


Figure 36: Expression de Mdm2, FoxOs et des facteurs angiogéniques dans les tissus adipeux de la souris après exercice volontaire. Les protéines et les ARN messagers ont été extraits des tissus adipeux viscéral (EWAT), sous-cutané (ScWAT) et brun (BAT) provenant des souris contrôles sédentaires (NC) et entraînées 7 semaines (NC ex.). Les niveaux protéiques de Mdm2, FoxO1, VEGF-A et TSP-1 dans l'EWAT (A) et le ScWAT (C) ont été analysés par Western Blot. Les blots ont été lavés et réincubés pour l' α/β tubuline, utilisée comme protéine de référence (NC: n=5 ; NC ex. : n=3). Les niveaux messagers de Mdm2, FoxO1, FoxO3α, VEGF-A et TSP-1 dans l'EWAT (B), le ScWAT (D) et le BAT (E) ont été analysés par PCR quantitative en temps réel. Les valeurs ont été normalisées avec l'ARNm de la protéine ribosomale 18S et exprimées en ratio d'expression des souris contrôles sédentaires (NC)

(n=5 par groupe). Données exprimées en moyenne $\pm$ SEM. * $P < 0.05$, *** $P < 0.005$ (relatif aux NC). Test-T de Student non-apparié.

Figure 37

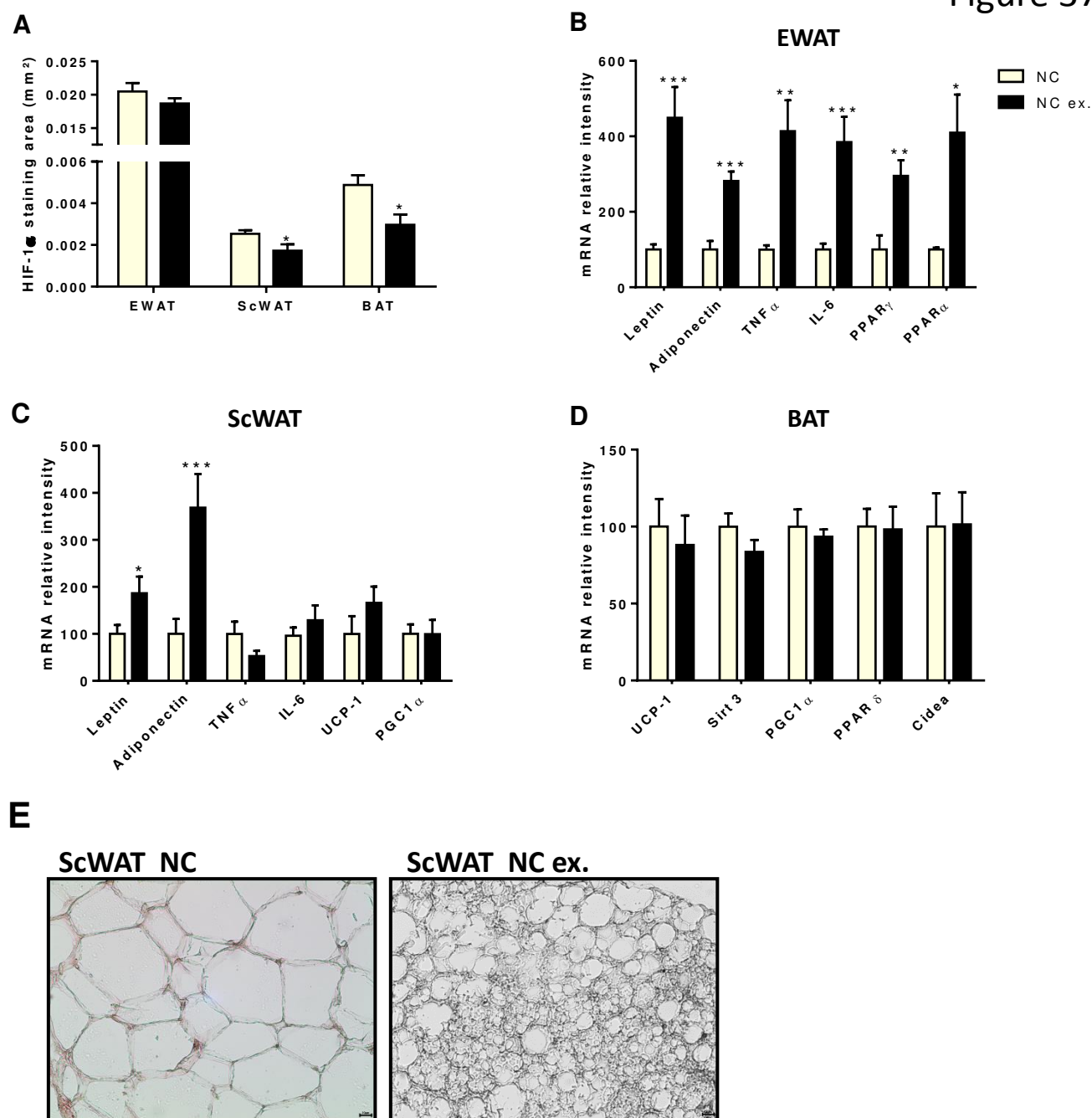


Figure 37: Effets de l'exercice physique volontaire sur l'hypoxie, les adipokines et l'activité métabolique des tissus adipeux de la souris. Après marquage immuno-histochimique à l'anticorps HIF-1 α sur coupe de tissu adipeux, l'aire de marquage à HIF-1 α a été évaluée dans l'EWAT, le ScWAT et le BAT des souris contrôles sédentaires (NC) et entraînées 7 semaines (NC ex.) (A). Les ARN messagers (ARNm) ont été extraits des tissus adipeux viscéral (EWAT), sous-cutané (ScWAT) et brun (BAT) provenant des souris NC et NC ex.. Les niveaux messagers de la leptine, de l'adiponectine, du TNF, de l'IL-6, de PPAR, d'UCP-1, PGC1, Sirt3, cidea dans l'EWAT (B), le ScWAT (C) et le BAT (D) ont été analysés par PCR quantitative en temps réel. (E) Images représentatives de tissu adipeux sous-cutané de souris contrôles sédentaires (NC) et entraînée (NC ex.). Les valeurs ont été normalisées avec l'ARNm de la

protéine ribosomale 18S et exprimées en ratio d'expression des souris contrôles sédentaires (NC). Données exprimées en moyenne $\pm$ SEM (n=5 par groupe). * $P<0.05$ ** $P<0.01$, *** $P<0.005$ (relatif aux NC). Test-T de Student non-apparié.

2) Résultats

Les résultats de cette étude montrent que les souris entraînées ne présentent pas de perte de poids après 7 semaines d'exercice volontaire (Figure 35A). Elles réduisent en revanche leur pourcentage de masse grasse (-26% ; Figure 35B). La réduction du pourcentage de masse grasse s'explique par une réduction significative de la masse des tissus adipeux blancs viscéral épидидymal (-52%) et sous-cutané (-44%), alors que la masse de tissu adipeux brun est augmentée (+65% ; Figure 35C). Au niveau cellulaire, la réduction de la masse adipeuse chez les souris entraînées ne se traduit pas dans le tissu adipeux épидидymal par une réduction de la taille moyenne des adipocytes, alors que dans le sous-cutané cette taille moyenne est significativement diminuée de 40% (Figure 35D). Dans le tissu adipeux brun, la taille des adipocytes n'a pu être évaluée de par l'architecture très étriquée du tissu. Mais la présence des gouttelettes lipidiques de grande taille dans les adipocytes bruns est réduite (-61%, non significatif) chez les souris entraînées en comparaison des souris saines sédentaires (Figure 35E). L'évaluation du réseau capillaire dans les tissus adipeux grâce au marquage au CD31 a permis de mettre en évidence une densité capillaire augmentée de 76% dans le tissu adipeux épидидymal et de 69% dans le tissu sous-cutané des souris entraînées (Figure 35F). Dans ces mêmes tissus, le ratio capillaire par adipocytes est également significativement augmenté de respectivement 37% et 14% (Figure 35G). Dans le tissu adipeux brun, les 7 semaines d'exercice volontaire ont légèrement augmenté (+16%) l'aire marquée au CD31 chez les souris entraînées (Figure 35H).

La mesure des facteurs angiogéniques a été réalisée dans l'ensemble des tissus adipeux. Elle met en lumière une augmentation significative du ratio VEGF-A/TSP-1 dans le tissu adipeux viscéral épидидymal (+172% au niveau protéique et +90% au niveau messager ; Figure 36A et B), le tissu adipeux sous-cutané (+110% au niveau protéique et 43% au niveau messager ; Figure 36C et D) et le tissu adipeux brun (+42% au niveau messager ; Figure 36E) des souris entraînées. Si l'expression de FoxOs n'est pas affectée par les 7 semaines d'exercice volontaire dans le tissu adipeux sous-cutané (Figure 36C et D) et brun interscapulaire (Figure

36E), celle de FoxO1 est augmentée au niveau messager (+75% ; Figure 36B) et diminuée au niveau protéique (-32% ; Figure 36A) dans le tissu adipeux épидидymal. En revanche, il est observé une augmentation de l'expression du messager et de la protéine de Mdm2 dans l'ensemble des tissus adipeux (de respectivement 50% et 73% dans l'EWAT ; 33% et 120% dans le ScWAT ; +40% du messager dans le BAT).

Le marquage immuno-histologique de HIF-1 α démontre une réduction significative de son expression dans les tissus adipeux sous-cutané (-18%) et brun (-39%) des souris entraînées, alors qu'elle reste inchangée dans le tissu adipeux épидидymal (Figure 37A). Dans les tissus adipeux blancs épидидymal et sous-cutané des souris entraînées, l'expression des messagers de la leptine et de l'adiponectine est significativement augmentée (respectivement +350% et 190% dans l'EWAT (Figure 37B) ; +85% et 256% dans le ScWAT (Figure 37C)). Dans le tissu adipeux viscéral, l'expression du TNF α et de l'IL-6 est également augmentée au niveau messager chez les souris entraînées (respectivement +302% et +282% ; Figure 37B), tout comme les gènes de l'adipogenèse PPAR γ et α (+206% et 299 respectivement ; Figure 37B). Les 7 semaines d'exercice physique volontaire n'ont pas eu d'effet, en revanche, sur l'expression des gènes thermogéniques, tels qu'UCP-1 ou PGC1 α dans les tissus adipeux sous-cutané et brun (Figure 37C et D). Dans le tissu adipeux sous-cutané de ces souris, des adipocytes présentant une multitude de gouttelettes lipidiques de petites tailles ont été observés (Figure 37E).

3) Discussion/conclusions

L'absence de perte de masse corporelle couplée à une diminution du pourcentage de masse grasse chez les souris entraînées, sous entend qu'une augmentation de la masse maigre est retrouvée chez ces souris, et notamment une augmentation de la masse musculaire. Une hypertrophie des muscles squelettiques a déjà été démontré chez des souris soumises à 4 semaines de protocole d'exercice physique volontaire avec une roue (Harrison *et al.* 2002). La réduction du pourcentage de masse grasse chez nos souris entraînées est expliquée par une fonte importante de la masse des tissus adipeux blancs viscéral et sous-cutané. L'hypertrophie du tissu adipeux brun chez les souris entraînées n'est pas accompagnée d'une présence accrue de

larges gouttelettes lipidiques, ce qui semble attester d'un accroissement du nombre d'adipocytes bruns fonctionnels dans ce tissu. De tels effets avaient déjà été démontrés chez le rat soumis à un exercice physique de course sur tapis roulant (Wickler *et al.* 1987b). En plus d'induire une perte de masse grasse, l'exercice physique volontaire permet également d'induire l'angiogenèse des tissus adipeux blancs, avec une densité capillaire et un nombre de capillaires pour chaque adipocyte augmentés dans les tissus adipeux viscéral et sous-cutané des souris entraînées. Dans le tissu adipeux brun, par contre, aucun processus de croissance vasculaire n'a été significativement mis en évidence chez la souris entraînée. La mise en place d'un protocole de 1 et 6 semaines d'entraînement sur tapis roulant, avait pourtant permis une augmentation de la vascularisation dans le tissu brun de rats sains (De Matteis *et al.* 2013).

Les processus angiogéniques dans les tissus adipeux épидидymal et sous-cutané sont corrélés avec la survenue d'un microenvironnement tissulaire pro-angiogénique, représenté par l'augmentation du ratio de l'expression du VEGF-A sur la TSP-1. Une augmentation de vascularisation associée à une augmentation de l'expression du VEGF-A a déjà été montrée dans le tissu adipeux viscéral de souris normopondérées (Hatano *et al.* 2011). Une réduction de l'expression de la TSP-1 avec l'exercice n'a en revanche jamais été mise en évidence dans le tissu adipeux. Néanmoins, une réduction de l'expression du messenger de la TSP-1 est observée dans le muscle squelettique de souris après exercice physique (Olfert *et al.* 2006). Dans le tissu adipeux brun, l'augmentation de ce ratio est également retrouvée au niveau messenger, indiquant qu'un protocole d'exercice volontaire plus long pourrait permettre de retrouver une augmentation significative de la vascularisation au sein de ce tissu. Dans l'ensemble des tissus adipeux, il est observé une augmentation significative de l'expression protéique et du messenger de Mdm2. Ce résultat suggère que la réponse pro-angiogénique de l'exercice physique chez la souris normopondérée serait dépendante de Mdm2. L'augmentation de Mdm2 pourrait être à l'origine de l'augmentation de l'expression du VEGF-A chez nos souris entraînées (Zhou *et al.* 2011). Contrairement à ce qui a été visualisé chez nos souris obèses entraînées, l'augmentation de l'expression de Mdm2 chez les souris normopondérées entraînées n'est pas associée à une réduction de l'expression des facteurs FoxOs dans les tissus adipeux sous-cutané et brun. Dans le tissu adipeux épидидymal des souris entraînées, il est retrouvé de façon intéressante, une augmentation de l'expression du messenger de FoxO1 alors que son expression au niveau protéique est réduite. Ce résultat sous-entend une importante régulation négative post-transcriptionnelle de FoxO1 dans le tissu adipeux viscéral, une activité inhibitrice dont Mdm2 pourrait être à l'origine (Fu *et al.* 2009; Milkiewicz *et al.* 2011).

La réduction de la taille des adipocytes et l'augmentation de la vascularisation dans le tissu adipeux sous-cutané des souris entraînées s'accompagnent d'une réduction significative de l'hypoxie, représentée par la diminution du marquage pour HIF-1 α . Cette réduction de l'hypoxie, n'avait pas été détectée dans le tissu adipeux sous-cutané de rats sains entraînés 8 semaines sur tapis (Disanzo & You 2014a). Les résultats de ce marquage, obtenus dans les autres tissus adipeux sont plus surprenants. Alors qu'un accroissement du matériel vasculaire est détecté dans le tissu adipeux épидидymal, aucune réduction de l'hypoxie tissulaire n'est observée dans ce tissu. Le fait que la taille des adipocytes viscéraux reste importante chez les souris entraînées peut éventuellement expliquer cette susceptibilité accrue de ce tissu à l'hypoxie. Une susceptibilité d'autant plus préjudiciable au cours du développement de l'obésité où l'apparition d'une hypoxie viscéral semble précoce (García-Fuentes *et al.* 2015). Inversement, même si aucun processus de croissance vasculaire significative n'est détecté dans le tissu adipeux brun, il est observé dans ce tissu une réduction de l'hypoxie et du marquage HIF-1 α . La réduction de la présence de larges gouttelettes lipidiques peut potentiellement être à l'origine d'une meilleure diffusion de l'oxygène dans les adipocytes bruns et ainsi d'une réduction de la stabilisation de HIF-1 α dans ce tissu (Shimizu *et al.* 2014).

Les 7 semaines d'exercice physique volontaire ont induit au sein des tissus adipeux blancs épидидymal et sous-cutané de nos souris une augmentation importante de l'expression de la leptine et de l'adiponectine. Si l'association entre l'élévation de l'adiponectine et l'exercice physique a déjà été établie chez l'homme et la souris (Kriketos *et al.* 2004; Simpson & Singh 2008), l'expression de la leptine est généralement diminuée à l'exercice (Kraemer *et al.* 2002). Dans le tissu adipeux viscéral des souris entraînées, l'augmentation du niveau des adipokines est associée également à une élévation de l'expression des adipocytokines telles que le TNF α et l'IL-6. L'exercice physique est associé généralement à une diminution du niveau de TNF α dans le tissu adipeux, hormis lors d'un exercice intense de longue durée (Lira *et al.* 2010). L'augmentation de l'IL-6 et de son signal a déjà été observée dans le tissu adipeux épидидymal de souris saines entraînées (Castellani *et al.* 2015). Classiquement considérée comme une cytokine pro-inflammatoire, de plus en plus d'éléments montrent que l'IL-6 serait impliquée dans la mise en place d'une réponse cellulaire anti-inflammatoire (Kraakman *et al.* 2013). Dans le muscle squelettique, l'action anti-inflammatoire de l'IL-6 dans la réponse à l'exercice est d'ailleurs démontrée (Fischer 2006). Le changement des fonctions endocrines adipeuses suggère la survenue d'une réaction inflammatoire au sein des tissus adipeux blancs des souris entraînées. Cette réaction n'est pas associée à l'hypoxie et semble différente de l'inflammation

retrouvée dans le tissu adipeux chez l'obèse. Elle pourrait être la résultante de phénomènes intenses de remodelage tissulaire au sein des tissus adipeux blancs. En effet, la taille des adipocytes est presque diminuée de moitié dans le tissu adipeux sous-cutané. Dans le tissu adipeux viscéral, le processus d'adipogénèse semble fortement activé, comme le suggère l'augmentation de l'expression des gènes du métabolisme lipidique PPAR γ et α (Farmer 2005; Siersbaek *et al.* 2010; Goto *et al.* 2011). La réaction inflammatoire post-remodelage dans le tissu adipeux de nos souris entraînées rappelle celle retrouvée au sein du muscle squelettique afin de réparer les dégâts fibrillaires et cellulaires provoqués par l'exercice (Malm 2001; Clarkson & Hubal 2002).

Enfin, les 7 semaines d'exercice physique volontaire n'ont pas été en mesure d'induire un changement dans l'expression des gènes de la thermogénèse dans le tissu adipeux brun et sous-cutané de nos souris. L'absence d'effet de l'exercice, notamment sur UCP-1, a déjà été observée par le passé dans le tissu adipeux brun d'animaux entraînés (Richard *et al.* 1987; Wickler *et al.* 1987a; Boss *et al.* 1998). En revanche, l'exercice physique est associé à un processus de *browning* au sein du tissu adipeux sous-cutané et qui comporte l'augmentation de l'expression des gènes du métabolisme et de la thermogénèse (Trevellin *et al.* 2014; Wu *et al.* 2014; Nakhuda *et al.* 2016). L'expression de UCP-1 mériterait donc d'être évaluée au niveau protéique dans le tissu adipeux sous-cutané de nos souris entraînées, d'autant plus qu'il a été observé dans ce tissu lors, de notre analyse histologique, des plages d'adipocytes beiges multiloculaires qui témoignent de la survenue d'un processus de *browning*. Au vu de nos résultats, les effets de l'angiogenèse sur les fonctions endocrines et métaboliques du tissu adipeux chez la souris entraînée méritent une étude plus approfondie.

Pour conclure, les résultats qui viennent d'être décrits sont préliminaires, mais démontrent la capacité de l'exercice physique volontaire à induire l'angiogenèse du tissu adipeux chez la souris normopondérée. L'activité pro-angiogénique de l'exercice se traduit au niveau tissulaire par l'apparition d'un microenvironnement pro-angiogénique où le signal du VEGF-A prend nettement le dessus sur celui de la TSP-1. Si le lien entre FoxOs et l'équilibre de la balance VEGF-A/TSP-1 n'est pas clairement établi dans cette étude, l'augmentation de Mdm2 est, quant à elle, retrouvée dans l'ensemble des tissus adipeux des souris entraînées. Mdm2 pourrait donc être un élément moléculaire majeur formant l'interface entre le stimulus exercice et ses effets biologiques sur l'angio-adaptation du tissu adipeux chez l'obèse, comme chez l'individu sain.

DISCUSSION GÉNÉRALE

Ce travail de thèse avait pour objectif de déterminer les effets de l'obésité sur la vascularisation des différents tissus adipeux et les mécanismes moléculaires sous-jacents permettant cette régulation. À travers ce travail, nous avons également cherché à comprendre dans quelle mesure la modulation du réseau microcirculatoire participait aux dysfonctions des différents tissus adipeux à l'obésité.

Il a été observé, auprès de la population de souris obèses, une accumulation intense de graisses au niveau des différents dépôts adipeux, avec des masses de tissus adipeux viscéral (épididymal), sous-cutané et brun interscapulaire très significativement augmentées. L'expansion du tissu adipeux sous-cutané est tout particulièrement significative. Alors qu'il ne représente que 20% de la masse grasse chez la souris contrôle, il constitue presque 50% du tissu adipeux total chez la souris obèse, un chiffre toutefois inférieur à celui trouvé chez l'Homme (Lafontan & Berlan 2003). Cette élargissement tissulaire se traduit par une hypertrophie des cellules adipeuses (Spalding *et al.* 2008), avec une multiplication par cinq et quatre, respectivement, de la taille moyenne des adipocytes dans le tissu adipeux viscéral et sous-cutané. La structure cellulaire du tissu adipeux brun n'a pas permis une analyse histologique précise de la taille des adipocytes bruns des souris, néanmoins la présence accrue de gouttelettes lipidiques de grande taille dans le tissu brun des souris obèses laisse supposer une hypertrophie des adipocytes bruns comme déjà évoquée dans la littérature (Shimizu *et al.* 2014). De plus, l'hypertrophie adipocytaire est couplée à un phénomène de raréfaction capillaire avec une réduction de la densité capillaire et du nombre de capillaire par adipocyte retrouvée dans les trois différents dépôts adipeux des souris obèses, ceci corroborant des études antérieures (Pasarica *et al.* 2009a; Gealekman *et al.* 2011; Shimizu *et al.* 2014).

Les processus de prolifération, de migration, de senescence ou d'apoptose de la cellule endothéliale, ainsi que les modifications de la matrice extracellulaire et les mouvements des cellules péri-endothéliales, sont sous le contrôle de facteurs pro- et anti-angiogéniques qui forment la balance angio-adaptative (Olfert & Birot 2011). La balance angio-adaptative, dont les mouvements en condition physiologique accompagnent les processus de croissance, stabilisation ou régression du tissu (Potente *et al.* 2011), semble altérée dans le tissu adipeux des souris obèses. En effet, alors que les tissus adipeux sont en phase de croissance avec une hyperplasie et une hypertrophie des adipocytes, il est retrouvé au sein de ces derniers, un microenvironnement angiostatique avec la prédominance du signal TSP-1 anti-angiogénique sur celui du VEGF-A pro-angiogénique. L'expression du VEGF-A, chez les souris obèses, est diminuée dans le tissu adipeux sous-cutané et le brun, alors qu'elle reste inchangée dans le tissu

adipeux viscéral. Ces divergences de résultat ont déjà été observées dans d'autres études, menées chez l'Homme comme le rongeur (Voros *et al.* 2005b; Pasarica *et al.* 2009a; Miranda *et al.* 2010; He *et al.* 2011). Néanmoins, il a été démontré qu'une réduction de l'expression du VEGF-A était associée à une diminution néfaste de la densité capillaire du tissu adipeux (Sung *et al.* 2013). Le déséquilibre de la balance angio-adaptative en faveur du signal anti-angiogénique est à mettre principalement à l'actif d'une forte augmentation de TSP-1 dans tous les dépôts adipeux. Cette molécule, fortement exprimée et sécrétée par les adipocytes et les cellules endothéliales à l'obésité (Stenina 2003; Varma *et al.* 2008), va être en mesure, par ses interactions avec le VEGF-A, le TGF β 1 et les complexes CD36/47 de la cellule endothéliale - d'inhiber la prolifération et la migration des cellules endothéliales ainsi que de nombreuses étapes de l'angiogenèse (Lawler 2002; Bornstein 2009; Sweetwyne & Murphy-Ullrich 2012; Chu *et al.* 2013; Gao *et al.* 2016).

Si l'hyperglycémie et l'hyperleptinémie peuvent expliquer en partie cette augmentation de l'expression de TSP-1 dans le tissu adipeux des souris obèses (Raman *et al.* 2011; Chavez *et al.* 2012; Sahu *et al.* 2016), FoxO1 semble être un régulateur majeur de l'expression de cette protéine (Roudier *et al.* 2013a). L'expression des facteurs de transcription FoxO1 et 3 α est significativement augmentée chez nos souris obèses, en adéquation avec l'augmentation de la TSP-1, dans l'ensemble des tissus adipeux. Cette surexpression de FoxO1 à l'obésité a déjà été démontrée dans le muscle cardiaque et squelettique où elle était corrélée à une diminution de la densité capillaire de ces tissus (Battiprolu *et al.* 2012; Qi *et al.* 2015; Nwadozi *et al.* 2016). La surexpression génétiquement induite de FoxOs dans les cellules endothéliales est également à l'origine d'une forte réduction du processus angiogénique (Paik *et al.* 2007; Wilhelm *et al.* 2016). En plus d'augmenter la transcription de la TSP-1, les facteurs FoxOs jouent un rôle angiostatique puissant en stimulant la sénescence des cellules endothéliales, l'expression du gène TGF β 1 et en inhibant l'expression du VEGF-A (Fu & Tindall 2008; Lee *et al.* 2008b; Shikatani *et al.* 2012; Roudier *et al.* 2013b). La surexpression de FoxO1 à l'obésité est également retrouvée dans les adipocytes où elle semble induire une réduction de l'adipogénèse, favorisant ainsi l'hypertrophie des adipocytes préexistant (Nakae *et al.* 2008).

L'augmentation de FoxOs chez la souris obèse, pourrait donc être à l'origine du déséquilibre de la balance angio-adaptative qui conduit à la raréfaction capillaire, et qui pourrait également favoriser l'hypertrophie des adipocytes dans les tissus adipeux blancs et bruns. Le principal régulateur de l'expression de FoxOs est la protéine Akt qui, une fois active, est en mesure de phosphoryler FoxOs, induisant sa dégradation par ubiquitinylation (Milkiewicz *et*

al. 2011). Or, il a été démontré une activation d'Akt réduite à l'obésité. Cette inactivation pourrait avoir comme origine l'altération de la voie PI3-K/Akt, induite par la perte de sensibilité des récepteurs à l'insuline (Swarbrick *et al.* 2009; Wang *et al.* 2014a), mais également par FoxO1 lui-même. Il a en effet été démontré, une boucle de régulation négative, où suite à une activation prolongée d'Akt, FoxO1 inhibait la voie Pi3K-Akt en amont, en contrecarrant la phosphorylation d'IRS-1 (Battiprolu *et al.* 2012). Dans la cellule endothéliale, cette altération de l'activation d'Akt pourrait être encore plus précoce. En effet, il est retrouvé à l'obésité une augmentation de l'activité d'ECSCR, une protéine membranaire majoritairement endothélium spécifique (Akakabe *et al.* 2013). ECSCR est en mesure de fixer l'enzyme PTEN, induisant l'inactivation d'Akt (Koide *et al.* 2011b; Pal *et al.* 2012). L'activation d'ECSCR passe par des processus intracellulaire de glycosylation, qui sont de façon générale augmentés à l'obésité avec l'hyperglycémie (Gafoor 2013). Du reste, il a été démontré que FoxO1 pouvait également être glycosylé, ce qui pourrait augmenter son activité transcriptionnelle (Kuo *et al.* 2008).

La conséquence directe de cette raréfaction capillaire au sein du tissu adipeux est la survenue d'une hypoxie tissulaire (Hosogai *et al.* 2007), représentée auprès de la population de souris obèses par l'augmentation de la stabilisation de HIF-1 α dans les 3 différents dépôts adipeux. Dans notre étude, comme dans d'autres précédentes réalisées chez des animaux obèses, cette augmentation de HIF-1 et de l'hypoxie ne permettent pas de stimuler l'expression du VEGF-A dans les tissus adipeux (Halberg *et al.* 2009; Corvera & Gealekman 2014). En revanche, elle est en mesure d'accentuer le phénomène d'hyperplasie des adipocytes, en inhibant la différenciation des préadipocytes (Trayhurn 2014). L'hypoxie exacerbe aussi le phénomène de raréfaction capillaire, en activant le processus de sénescence au sein des cellules endothéliales adipeuses (Villaret *et al.* 2010). L'hypoxie et la raréfaction capillaire sont à l'origine d'un phénomène de « *whitening* » du tissu adipeux brun. Ce phénomène est caractérisé par une augmentation de la production tissulaire d'adipokines (la leptine chez nos souris HFS), normalement sécrétées dans les adipocytes blancs et par une diminution de l'activité thermogénique, due à des dysfonctions mitochondriales et une réduction de l'oxydation des lipides (Shimizu & Walsh 2015; Trayhurn 2016). Paradoxalement, malgré ce *whitening*, il est constaté dans le tissu adipeux brun de nos souris obèses une augmentation de l'expression d'UCP-1. Ce résultat reste néanmoins inexplicable au vu des effets inhibiteurs de l'obésité et d'HIF-1 sur l'expression de cette molécule (Kozak & Anunciado-Koza 2008; Villarroya *et al.* 2016).

L'hypoxie va également être le point de départ du développement des dysfonctions du tissu adipeux blanc et notamment de la fibrose en provoquant, via l'action de HIF-1 dans le tissu adipeux, l'activation des gènes pro-fibrotiques (Halberg *et al.* 2009). La fibrose est caractérisée par d'importants dépôts de collagènes matriciels. Elle a été retrouvée dans le tissu adipeux viscéral de nos souris obèses, comme chez le rongeur et l'Homme obèses (Strissel *et al.* 2007; Henegar *et al.* 2008; Alkhouli *et al.* 2013). Non étudiée dans le tissu adipeux sous-cutané de nos souris, elle devrait logiquement être présente dans ce tissu qui exprime fortement les gènes des composants matriciels (McCulloch *et al.* 2015). L'augmentation de HIF-1 conduit également au sein du préadipocyte et de l'adipocyte blanc à une dérégulation de ses fonctions endocrines, en activant l'expression de la leptine, du TNF α et de l'IL-6 et en inhibant l'expression de l'adiponectine (Hosogai *et al.* 2007; Wang *et al.* 2008; Ye 2009; Nigro *et al.* 2014). Les variations d'expression de ces facteurs inflammatoires sont retrouvées dans les tissus adipeux blancs de nos souris HFS, tout comme une forte régulation positive de l'expression de MCP-1. Cette chimiokine est sécrétée par les adipocytes en réponse à l'hypoxie. Elle provoque, au même titre que la TSP-1, le recrutement des cellules immunitaires et l'infiltration des macrophages dans le tissu adipeux (Li *et al.* 2011a; O'Rourke *et al.* 2011). Il est en effet constaté dans les tissus adipeux de nos souris obèses une augmentation des monocytes et des lymphocytes T résidants, comme déjà décrit chez l'Homme et la souris (Weisberg *et al.* 2003; Wu *et al.* 2007; Lohmède *et al.* 2011). Ces cellules se sont majoritairement polarisées dans le tissu adipeux en macrophages M1 et en lymphocytes Th17, au détriment des M2 et des Treg (Shaul *et al.* 2010; Apostolopoulos *et al.* 2016). Elles sécrètent de façon importante des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF α , l'IL-1, 6, 12 et 17 (McNelis & Olefsky 2014; Apostolopoulos *et al.* 2016). Il convient de noter que certaines cytokines pro-inflammatoires sécrétées par les M1, sont en mesure de stabiliser HIF-1 α (Jung *et al.* 2003) et que ces M1 produisent également du MCP-1, ainsi que d'autres chimiokines (McNelis & Olefsky 2014). Cela laisse entrevoir la boucle de régulation positive qui pourrait lier l'hypoxie et l'inflammation du tissu adipeux.

L'hypoxie et l'inflammation contribuent à la survenue d'une perte de sensibilité à l'insuline au sein du tissu adipeux (Regazzetti *et al.* 2009; Chmelar *et al.* 2013; Trayhurn 2014). Une réduction de l'activation d'Akt dans les dépôts adipeux viscéraux et sous-cutanés de nos souris pourrait effectivement signifier une insulino-résistance de ces tissus. Il a été constaté également, chez nos souris HFS, des troubles de l'homéostasie lipidique et glucidique au niveau systémique, matérialisés par l'apparition d'une intolérance au glucose et la présence de

nombreux dépôts adipeux ectopiques dans le foie, le muscle squelettique et cardiaque. Même si ces paramètres n'ont pas été mesurés dans nos études, l'augmentation des acides gras libres, des adipokines et des adipocytokines circulants pourraient être à l'origine de ces troubles systémiques (Antuna-Puente *et al.* 2008; Cusi 2012; Muoio & Neuffer 2012). Ces perturbations homéostatiques sont fortement associées au développement du diabète de type 2 ou de maladies cardiovasculaires (Taylor 2012; Fitzgibbons & Czech 2014; Sattar & Gill 2014), comme le laisse présager l'état de pré-diabète et l'augmentation significative de la pression artérielle retrouvés chez nos souris HFS.

Le second objectif majeur de ce travail de thèse a été d'évaluer les effets de l'entraînement physique sur la vascularisation des différents dépôts adipeux. Nous avons alors exploré ses capacités, comme dans d'autres tissus, à constituer un stimulus pro-angiogénique et les voies de signalisation expliquant les effets biologiques de l'exercice sur la cellule endothéliale. Enfin nous avons mesuré, plus globalement, les effets de l'exercice sur les fonctions adipocytaires et l'homéostasie glucido-lipidique systémique de l'individu obèse.

La première observation marquante faite chez nos souris HFS entraînées est la réduction très importante de la masse grasse totale et de celles des différents tissus adipeux. Cette diminution de l'expansion tissulaire est plus particulièrement spectaculaire dans le tissu adipeux sous-cutané, dont la masse est presque réduite de moitié. Ce résultat semble logique au vue de la sensibilité accrue de ce tissu aux effets lipolytiques de l'exercice (Stallknecht *et al.* 2007). La réduction de la masse adipeuse s'accompagne, au niveau cellulaire, d'une diminution de l'hypertrophie adipocytaire, de 34% et 30% dans le tissu adipeux viscéral et sous-cutané respectivement. Ce résultat témoigne d'une augmentation accrue de la lipolyse et de la mobilisation des acides gras chez les souris HFS entraînées (Gollisch *et al.* 2009). Dans le tissu adipeux brun, la présence de larges gouttelettes dans les adipocytes bruns est réduite très largement de 85%. Une réduction similaire est observée dans le tissu brun de souris obèses présentant une surexpression du VEGF-A (Shimizu *et al.* 2014). La normalisation de la taille des adipocytes est couplée, dans l'ensemble des 3 tissus adipeux, à un processus de croissance vasculaire. Cette croissance est représentée dans notre évaluation histologique par l'augmentation de la densité capillaire et du ratio capillaire par adipocyte dans les tissus adipeux. L'exercice physique a donc stimulé l'angiogenèse du tissu adipeux blanc et brun. Ce constat, réalisé pour la première fois chez la souris obèse, a déjà été observé chez l'animal sain (Hatano *et al.* 2011; De Matteis *et al.* 2013). Les cellules endothéliales et l'angiogenèse étant

associées à l'activation des processus adipogéniques et de différenciation des préadipocytes (Hutley *et al.* 2001; Fukumura *et al.* 2003), il est probable que cette augmentation de l'angiogenèse contribue à la réduction de l'hypertrophie adipocytaire chez les souris HFS entraînées.

Au niveau moléculaire, on constate que le déséquilibre de la balance angio-adaptative en faveur du signal anti-angiogénique à l'obésité, n'est plus retrouvé dans nos souris HFS entraînées. En effet, le ratio VEGF-A/TSP-1 est significativement augmenté dans les tissus adipeux blanc et brun, suite au protocole d'exercice physique volontaire chez les souris obèses. Ce résultat est dû à l'augmentation de l'expression du VEGF-A, concomitante avec la diminution de la TSP-1. La surexpression du VEGF-A à l'exercice est retrouvée dans le tissu adipeux viscéral et sous-cutané, comme déjà décrit chez le rat obèse et la souris saine entraînée (Hatano *et al.* 2011; Disanzo & You 2014b). Dans le tissu adipeux brun, l'expression du VEGF-A ne semble pas affectée par l'exercice. En revanche, la nette diminution de l'expression de la TSP-1 est retrouvée dans l'ensemble des tissus adipeux. La réduction de l'expression des facteurs FoxOs, également mesurée dans les trois tissus adipeux de notre étude, pourrait être à l'origine du rétablissement de la balance angio-adaptative et de l'angiogenèse du tissu adipeux chez les HFS entraînées. En effet, il a été montré que la délétion de FoxO1 et 3 α , au niveau endothélial, induit une intense prolifération et réduction de l'apoptose des cellules endothéliales (Wilhelm *et al.* 2016). Chez la souris HFD, cette même délétion est associée à une augmentation de la densité vasculaire dans le muscle squelettique (Nwadozi *et al.* 2016). Dans les tissus adipeux blancs, la baisse du niveau de FoxOs est sans doute due à une augmentation de leur dégradation protéique par Mdm2, dont l'expression est significativement augmentée dans le tissu adipeux viscéral et sous-cutané des souris HFS entraînées. Cette augmentation de Mdm2 à l'exercice a déjà été démontrée dans le muscle squelettique où elle est associée à une diminution de FoxO1 et une augmentation du VEGF-A (Roudier *et al.* 2012). Mdm2 est en mesure de fixer directement FoxO1 pour induire son ubiquitylation (Fu *et al.* 2009; Milkiewicz *et al.* 2011). Il régule également positivement la balance angio-adaptative en stimulant directement l'expression du VEGF-A (Zhou *et al.* 2011).

Le lien biologique entre l'exercice et l'augmentation de Mdm2 reste à être confirmé. Notre étude montre que l'internalisation dans la cellule endothéliale du complexe ECSCR-PTEN chez les souris HFS entraînées, pourrait être à l'origine d'une augmentation de l'activation d'Akt. Cette activation d'Akt au niveau endothélial permettrait la stabilisation de Mdm2 (Zhou *et al.* 2001). L'effet inhibiteur sur FoxOs serait alors double, car en plus de Mdm2,

la phosphorylation de FoxOs par Akt provoquerait également sa dégradation (Tzivion *et al.* 2011). Il convient également de noter que l'expression de SIRT-3 est augmentée au sein des tissus adipeux blancs des souris HFS entraînées. Or, il a été démontré des effets inhibiteurs de cette famille de molécule sur l'expression de FoxOs (Oellerich & Potente 2012).

L'exercice physique, en activant les processus de lipolyse et d'angiogenèse au sein du tissu adipeux, permet donc une diminution de la taille des adipocytes et une croissance vasculaire qui sont associées à une réduction de l'hypoxie dans les différents dépôts adipeux des souris obèses entraînées. Cela avait été démontré seulement dans le tissu adipeux blanc de rats obèses (Disanzo & You 2014b). La réduction de l'expression de HIF-1 α et de la TSP-1 est corrélée à la diminution de la fibrose et de l'inflammation du tissu adipeux (Varma *et al.* 2008; Sun *et al.* 2013a). Les fonctions endocrines des tissus adipeux sont améliorées chez les souris HFS entraînées avec notamment une diminution de l'expression de la leptine et une augmentation de l'adiponectine (Golbidi & Laher 2014). De même, l'infiltration des macrophages est également significativement réduite dans les tissus adipeux blancs et bruns de ces souris. Un *switch* entre les macrophages M1/M2 et les lymphocytes Th17/Treg est même observé dans le tissu adipeux viscéral, comme déjà décrit (Kawanishi *et al.* 2010b). Il en résulte une diminution des cytokines et des chimiokines pro-inflammatoires (TNF α , IL-6, MCP-1), permettant l'amélioration de la sensibilité à l'insuline dans le tissu adipeux viscéral de nos souris obèses entraînées (Vieira *et al.* 2009a; Christiansen *et al.* 2010; Lira *et al.* 2010).

L'amélioration de la capillarisation, la réduction de l'hypoxie et de l'inflammation n'ont pas eu d'incidence sur les fonctions métaboliques du tissu adipeux brun des souris HFS entraînées. Si les effets de l'exercice sur l'activité thermogénique du tissu brun restent controversés (Boss *et al.* 1998; Xu *et al.* 2011; Wu *et al.* 2014), la disparition des larges gouttelettes lipidiques et l'augmentation de la densité capillaire attestent de la réduction du processus de *whitening* et de la normalisation des fonctions métaboliques du tissu brun (Shimizu *et al.* 2014). Dans le tissu adipeux sous-cutané, l'amélioration du microenvironnement cellulaire et des fonctions endocrines tissulaires chez les HFS entraînées est également associée à l'augmentation des fonctions métaboliques de ce tissu. La réduction de la taille des adipocytes dans ce tissu est accompagnée de l'apparition d'amas de cellules au cytoplasme plus sombre, présentant plusieurs vacuoles lipidiques en leur sein. Ce morphotype correspond à celui des adipocytes beiges, dont la présence est augmentée dans le tissu adipeux sous-cutané chez les animaux entraînées au cours du processus de *browning* (Cao *et al.* 2011; Stanford *et al.* 2015b). Les adipocytes beiges possèdent une biogenèse mitochondriale, un

génotype métabolique et une utilisation du glucose plus intense que les adipocytes blancs (Trevellin *et al.* 2014). Cela leur confère une activité thermogénique plus importante, ce qui permet d'expliquer l'augmentation de l'expression d'UCP-1 ainsi que d'autres marqueurs thermogéniques (PGC1 β , PPAR α , SIRT-3) dans le tissu adipeux sous-cutané de nos souris HFS entraînées. L'apparition du phénomène de *browning* dans le tissu adipeux blanc à l'exercice semble impliquer une activation adrénergique et la production de myokines environnantes (Boström *et al.* 2012b; Pedersen & Febbraio 2012). Néanmoins, l'augmentation de l'expression du VEGF-A dans le tissu adipeux sous-cutané, résultant de l'activation de l'axe Mdm2-FoxOs chez nos souris HFS entraînées, participerait aussi à l'activation du processus de *browning* (During *et al.* 2015).

L'exercice, en stimulant la microcirculation adipeuse, a permis de réduire l'inflammation et l'insulino-résistance du tissu adipeux viscéral, d'augmenter l'activité thermogénique du tissu adipeux sous-cutané et de restaurer celle du tissu adipeux brun. L'ensemble de ces améliorations des fonctions adipeuses permet d'améliorer l'homéostasie lipidique et glucidique de l'organisme avec un stockage de graisses ectopiques réduit dans le muscle, le cœur et le foie, ainsi qu'une tolérance au glucose et une glycémie restaurée (Petersen *et al.* 2004). L'élévation de la pression artérielle, qui été retrouvée chez les souris obèses, est même abolie au sein de la population de souris HFS entraînées.

Pour résumer, l'ensemble de nos résultats suggère un rôle de l'axe Mdm2-FoxOs sur la régulation de la réponse angio-adaptative du tissu adipeux à l'obésité et à l'exercice, avec des conséquences sur la physiologie de l'individu obèse. Si le rôle de frein angiostatique de FoxOs à l'obésité a été démontré dans le tissu adipeux blanc et brun, le rôle angio-adaptatif de Mdm2 à l'exercice n'a pu être démontré que dans les tissus adipeux blancs. Il existe visiblement un autre mécanisme, induit par l'exercice, qui permet de lever l'inhibition angiostatique de FoxOs dans le tissu adipeux brun à l'obésité, mais celui-ci reste encore à déterminer. Non étudié dans nos travaux, l'activité de SIRT-1 est augmentée à l'exercice physique dans le tissu adipeux (Li 2013) et pourrait directement inhiber les facteurs FoxOs (Oellerich & Potente 2012).

La **figure 38** permet de récapituler, sous forme schématique, l'ensemble des résultats obtenus au cours de ce travail de thèse.

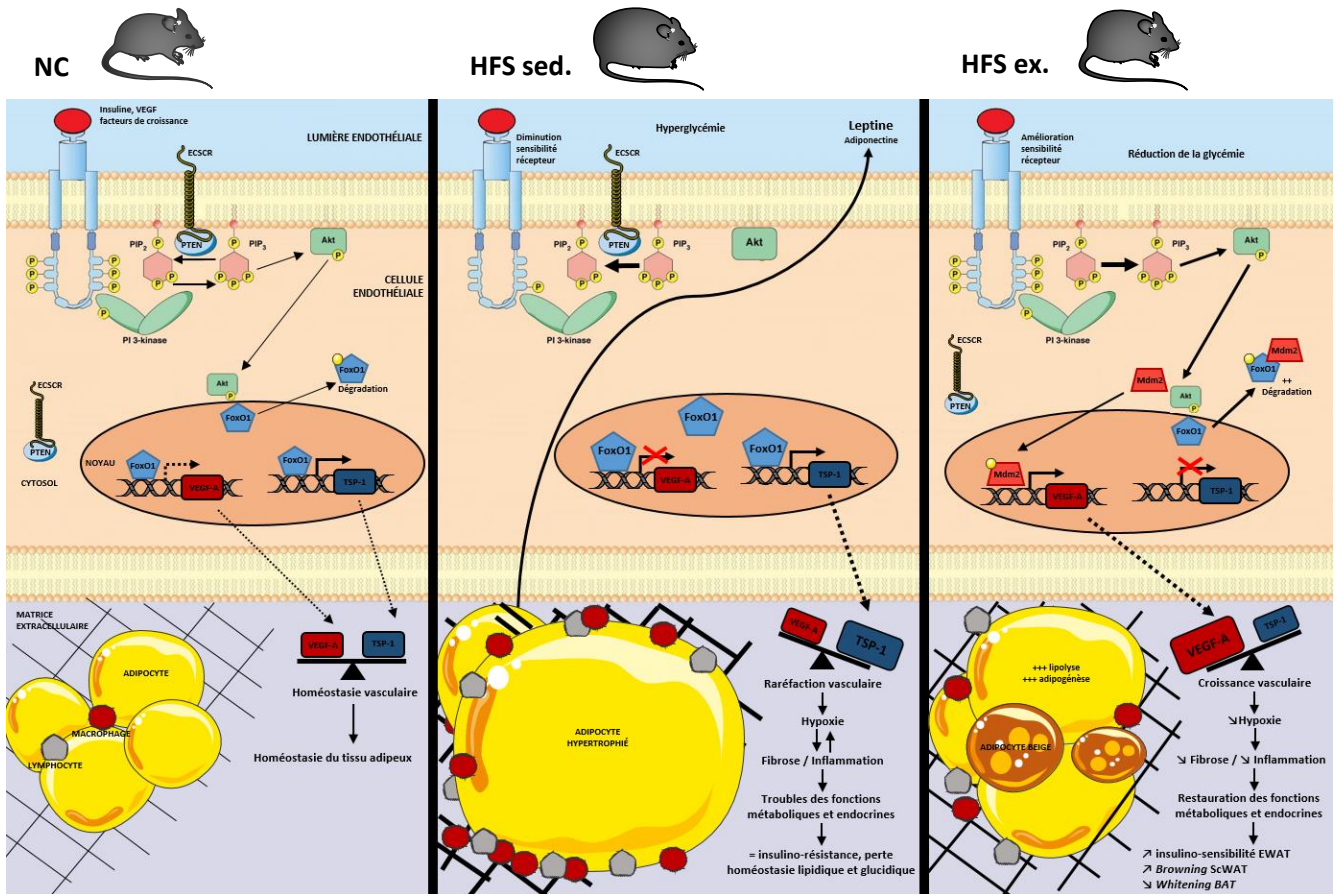


Figure 38: Schéma récapitulatif. Régulation et rôle de l'axe Mdm2/FoxOs dans l'angio-adaptation du tissu adipeux au cours de l'obésité et à l'exercice.

La principale limite de nos travaux réside dans le fait que l'ensemble des mesures d'expression protéique et messager ont été réalisées sur du tissu adipeux entier. Or, la présence de FoxO1 est retrouvée également dans l'adipocyte blanc et brun, où il joue de façon active sur la régulation des processus de lipolyse et de lipogenèse, ainsi que sur la sécrétion d'adipokines comme l'adiponectine ou le TNF α (Nakae *et al.* 2008). FoxO1 et 3 α sont également exprimés dans la cellule lymphocytaire T, retrouvée dans le tissu adipeux et particulièrement à l'obésité (Chatzigeorgiou *et al.* 2012). Dans cette cellule, les facteurs FoxOs sont en mesure de contrôler la différenciation en lymphocyte Treg, en régulant positivement le gène FoxP3 (Harada *et al.* 2010; Ouyang *et al.* 2010). Pour confirmer l'implication de l'axe Mdm2-FoxOs dans l'angio-adaptation du tissu adipeux de nos souris HFS sédentaires et entraînées, un co-marquage immunochimique fluorescent entre CD31-Mdm2 ou CD31-FoxO1 aurait pu être envisagé. La mesure de l'expression de Mdm2 et de FoxOs aurait dû également être réalisée sur des extraits

protéiques et messagers issus de cellules endothéliales, isolées des adipocytes et du reste de la fraction stromale, des tissus adipeux blancs et bruns. De plus, la détection dans ces extraits du niveau d'expression des protéines Mdm2 et FoxOs phosphorylées, ainsi que de PTEN et du ratio P-Akt/Akt, aurait permis de mieux comprendre la régulation de l'axe Mdm2-FoxOs au cours de la réponse angio-adaptative du tissu adipeux au cours de l'obésité et à l'exercice. Même si les protéines FoxOs phosphorylées sont rapidement dégradées et possèdent un faible temps de demi-vie, l'immuno-détection de P-FoxO1 par Western Blot a déjà été réalisée dans le passé (Milkiewicz *et al.* 2011). La mesure de l'activation de FoxO1 et 3 α est également réalisable en évaluant son expression dans des extraits de protéines nucléaires (Battiprolu *et al.* 2012).