

EXERCICE PHYSIQUE ET ATHEROSCLEROSE.

Quels sont les mécanismes physiologiques et moléculaires de l'exercice qui préviennent et protègent de l'athérosclérose ?
Approche chez un modèle expérimental d'athérosclérose:
La souris génétiquement dépourvue en apolipoprotéine E (apoE^{-/-})

THESE

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR en Sciences de la Vie et de la Santé de L'UNIVERSITE DE FRANCHE-COMTE
Spécialité: Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives
(Thèse n° 25-08-07)

Et du grade de
DOCTEUR ès sciences de la vie de L'UNIVERSITE DE LAUSANNE

Présentée et soutenue publiquement par

Maxime PELLEGRIN

Le 24 novembre 2008

JURY

Mr le Professeur Pascal Laurant (directeur de thèse), Université de Franche-Comté
Mme le Docteur Lucia Mazzolai (directeur de thèse), Université de Lausanne
Mr le Professeur Alain Berthelot (codirecteur de thèse), Université de Franche-Comté
Mr le Professeur Jürg Nussberger (codirecteur de thèse), Université de Lausanne
Mr le Professeur Daniel Hayoz (rapporteur), Université de Fribourg
Mr le Professeur Philippe Obert (rapporteur), Université d'Avignon

RESUME

L'athérosclérose, pathologie inflammatoire artérielle chronique, est à l'origine de la plupart des maladies cardiovasculaires qui constituent l'une des premières causes de morbidité et mortalité en France. Les études observationnelles et expérimentales montrent que l'exercice physique prévient la mortalité cardiovasculaire. Cependant, les mécanismes précisant les bénéfices cliniques de l'exercice sur l'athérosclérose sont encore largement inconnus. Le but général de ce travail a donc été d'explorer, en utilisant un modèle expérimental d'athérosclérose, la souris hypercholestérolémique génétiquement dépourvue en apolipoprotéine E (apoE^{-/-}), les mécanismes athéro-protecteurs de l'exercice. La dysfonction endothéliale, généralement associée aux facteurs de risque cardiovasculaire, serait l'une des étapes précoces majeures de l'athérogenèse. Elle est caractérisée par une diminution de la biodisponibilité en monoxyde d'azote (NO) avec la perte de ses propriétés vasculo-protectrices, ce qui favorise un climat pro-athérogène (stress oxydatif, adhésion et infiltration des cellules inflammatoires dans la paroi artérielle...) conduisant à la formation de la plaque athéromateuse. L'objectif de notre premier travail a donc été d'explorer les effets de l'exercice d'une part, sur le développement des plaques athéromateuses et d'autre part, sur la fonction endothéliale de la souris apoE^{-/-}. Nos résultats montrent que l'exercice réduit significativement l'extension de l'athérosclérose et prévient la dysfonction endothéliale. L'explication pharmacologique montre que l'exercice stimule la fonction endothéliale via, notamment, une plus grande sensibilité des récepteurs endothéliaux muscariniques, ce qui active les événements signalétiques cellulaires récepteurs-dépendants à l'origine d'une bioactivité accrue de NO. Les complications cliniques graves de l'athérosclérose sont induites par la rupture de la plaque instable provoquant la formation d'un thrombus occlusif et l'ischémie du territoire tissulaire en aval. L'objectif de notre deuxième travail a été d'examiner l'effet de l'exercice sur la qualité/stabilité de la plaque. Nos résultats indiquent que l'exercice de longue durée stabilise la plaque en augmentant le nombre de cellules musculaires lisses et en diminuant le nombre de macrophages intra-plaques. Nos résultats montrent aussi que la phosphorylation de la eNOS (NO Synthase endothéliale) Akt-dépendante n'est pas le mécanisme moléculaire majeur à l'origine de ce bénéfice. Enfin, dans notre troisième travail, nous avons investigué l'effet de l'exercice sur le développement de la plaque vulnérable. Nos résultats montrent, chez un modèle murin de plaque instable (modèle d'hypertension rénovasculaire à rénine et angiotensine II élevés) que l'exercice prévient l'apparition de la plaque vulnérable indépendamment d'un effet hémodynamique. Ce bénéfice serait associé à une diminution de l'expression vasculaire des récepteurs AT1 de l'Angiotensine II. Nos résultats justifient l'importance de l'exercice comme outil préventif des maladies cardiovasculaires.

Mots clés : exercice, souris apoE^{-/-}, athérosclérose, dysfonction endothéliale, plaque instable.

ABSTRACT

Atherosclerosis, a chronic inflammatory disease, is one of the main causes of morbidity and mortality in France. Observational and experimental data indicate that regular physical exercise has a positive impact on cardiovascular mortality. However, the mechanisms by which exercise exerts clinical benefits on atherosclerosis are still unknown. The general aim of this work was to elucidate the anti-atherosclerotic effects of exercise, using a mouse model of atherosclerosis: the apolipoprotein E-deficient mice (apoE^{-/-} mice). Endothelial dysfunction, generally associated with cardiovascular risk factors, has been recognized to be a major and early step in atherogenesis. Endothelial dysfunction is characterized by Nitric Oxide (NO) bioavailability reduction with loss of NO-mediated vasculoprotective actions. This leads to vascular effects such as increased oxidative stress and increased adhesion of inflammatory cells into arterial wall thus playing a role in atherosclerotic plaque development. Therefore, one of the objective of our study was to explore the effects of exercise on atherosclerotic plaque extension and on endothelial function in apoE^{-/-} mice. Results show that exercise significantly reduces plaque progression and prevents endothelial dysfunction. Pharmacological explanation indicates that exercise stimulates endothelial function by increasing muscarinic receptors sensitivity which in turn activates intracellular signalling receptor-dependent events leading to increased NO bioactivity. The clinical manifestations of atherosclerosis are the consequences of unstable plaque rupture with thrombus formation leading to tissue ischemia. The second aim of our work was to determine the effect of exercise on plaque stability. We demonstrate that long-term exercise stabilizes atherosclerotic plaques as shown by decreased macrophage and increased Smooth Muscle Cells plaque content. Our results also suggest that the Akt-dependent eNOS phosphorylation pathway is not the primary molecular mechanism mediating these beneficial effects. Finally, we assessed a putative beneficial effect of exercise on vulnerable plaque development. In a mouse model of Angiotensin II (Ang II)-mediated vulnerable atherosclerotic plaques, we provide first evidence that exercise prevents atherosclerosis progression and plaque vulnerability. The beneficial effect of swimming was associated with decreased aortic Ang II AT1 receptor expression independently from any hemodynamic change. These findings suggest clinical benefit of exercise in terms of cardiovascular event protection.

Key words : exercise, apoE^{-/-} mice, atherosclerosis, endothelial dysfunction, unstable plaque.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au sein de deux équipes de recherche dans le cadre d'une cotutelle de thèse entre l'Université de Franche-Comté et l'Université de Lausanne. La première partie de mon travail a été réalisée au sein de l'Equipe Optimisation Métabolique et cellulaire (EA-3921) (dirigée par le Pr A. Berthelot) (cette équipe est aujourd'hui devenue l'Equipe Sciences Séparatives Biologiques et Pharmaceutiques, 2SBP/EA-4267 dirigée par le Pr YC. Guillaume), dans le Groupe Physiologie et Biologie de la Cellule Sportive (dirigé par le Pr P. Laurant) (aujourd'hui devenu Département de Recherche en Prévention, Innovation et Veille Technico-Sportive) de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Besançon. La deuxième partie de ce travail a été réalisée dans le Service d'Angiologie (dirigé par le Dr L. Mazzolai), Département de Médecine Interne au Centre Hospitalier Universitaire Vaudois.

Au Professeur Pascal Laurant et au Docteur Lucia Mazzolai, mes deux directeurs de thèse,

Mon grand-père me dit toujours : "Les bons chefs font les bons ouvriers"...

Je tiens à vous remercier tout particulièrement pour m'avoir initié à la recherche scientifique. Votre passion et votre enthousiasme pour la recherche sont contagieux. J'ai toujours eu conscience de ma chance d'avoir des "chefs" disponibles, à mon écoute, qui ont su me motiver et m'encourager. Mes "chefs" sont de "grandes" personnes, mêlant qualités humaines et professionnelles qui forcent mon admiration. Vous êtes pour moi bien plus que des directeurs de thèse.

Trouvez ici l'expression de ma sincère gratitude et de mon profond respect.

Aux Professeurs Alain Berthelot et Jürg Nussberger, mes deux co-directeurs de thèse,

Merci pour avoir assuré pleinement la codirection de ma thèse et pour m'avoir prodigué de nombreux conseils.

Que cette thèse soit pour moi l'occasion de vous exprimer toute ma reconnaissance.

Aux rapporteurs, les professeurs Daniel Hayoz et Philippe Obert,

Merci d'avoir accepté de donner de votre temps pour critiquer et juger ce travail. Vos remarques et analyses seront pour moi des plus enrichissantes.

Veillez recevoir l'expression de mon profond respect.

A tous les membres et anciens membres de l'équipe de recherche de Besançon,

Céline, Hélène, Isabelle, Maude, Sylvie, Teddy, Vincent...Un grand merci !

Une mention spéciale pour mes amis Fayçal, Florent, Manu, Najim, Saber et Yannick...

Merci pour les moments de rigolade...

A tous les membres de l'équipe de recherche de Lausanne,

Jean-François (le roi de l'expérimentation animale !), Karima (la reine de la biologie moléculaire !), Alice, Pascale... Quelle chance pour moi d'avoir pu compter sur leur aide et leur écoute. Que vous dire à part merci !

A toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à ce travail,

Je pense particulièrement à Christophe Houdayer, Chantale Ferniot, au Dr Valérie Deckert, aux Dr Isabelle Lascombe et Sylvie Fauconnet,...

Une mention particulière à Dominique Paris, témoin rigolard de mes expériences. Tu es devenu mon ami.

A mes parents, grand-parents et à mon frère,

Votre soutien tant moral que financier a été déterminant pour l'aboutissement de ce travail.

Et enfin à Raphaëlla,

Tu m'as donné le plus beau des cadeaux : l'amour avec un grand A. Cet amour s'est rapidement (!) concrétisé pour donner naissance cet été à un merveilleux petit garçon nommé Aidan. Vous êtes mes sources de bonheur et de motivation.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE	12
REVUE DE LITTERATURE	15
Première partie: l'athérosclérose	16
1. Définition générale	16
2. Un problème de santé publique majeur	16
3. Une étape clé: la dysfonction de l'endothélium	17
3.1 Fonction endothéliale et monoxyde d'azote (NO)	17
3.1.1 Contrôle de la vasomotricité	18
3.1.2 Propriétés anti-athérogènes	20
3.2 Caractéristiques de la dysfonction endothéliale	21
3.2.1 Causes et mécanismes biologiques de la dysfonction endothéliale	21
3.2.2 Evaluation de la dysfonction endothéliale	23
4. Athérogenèse et formation de la plaque d'athérosclérose	26
4.1 Initiation des lésions athéroscléreuses	27
4.2 Progression des lésions et formation de la plaque d'athérome	28
4.3 Plaque instable et maladie athéro-thrombotique	29
Deuxième partie: exercice physique comme outil préventif de choc contre l'athérosclérose	33
1. Prévention primaire et secondaire: données observationnelles et expérimentales récentes	34
2. Les mécanismes athéro-protecteurs de l'exercice physique	35
2.1 Effets bénéfiques sur les facteurs de risque cardiovasculaire	36
2.2 Effets bénéfiques sur la fonction/dysfonction endothéliale	37
2.2.1 Données expérimentales récentes	37
2.2.2 Les mécanismes moléculaires sous-jacents	38
• Sur-expression de la eNOS	38
- Stimulation transcriptionnelle et traductionnelle de la eNOS	38

- Modifications post-traductionnelles	39
• Diminution de la dégradation du NO	40
- Augmentation des défenses anti-oxydantes	40
- Diminution des enzymes pro-oxydantes	40
• Autres mécanismes: Système Rénine-Angiotensine (RAS)	41
2.2.3 Effets sur les autres marqueurs de la dysfonction endothéliale	41
2.3 Prévention de l'extension de l'athérosclérose	42
2.4 Autres mécanismes	42
OBJECTIFS EXPERIMENTAUX	44
1. Les objectifs généraux	45
2. Description de notre modèle expérimental: la souris ApoE ^{-/-}	46
TRAVAUX EXPERIMENTAUX	47
Première partie: Exercice physique, prévention des plaques d'athérosclérose et de la dysfonction endothéliale chez la souris apoE ^{-/-}	48
1. But de l'étude	48
2. Méthode	48
3. Résultats principaux et conclusion	50
Deuxième partie: Exercice physique, qualité / stabilité de la plaque et voie Akt-eNOS phosphorylée	59
1. But de l'étude	59
2. Méthode	59
3. Résultats principaux et conclusion	60
Troisième partie: Exercice physique et prévention de la plaque instable	83
1. But de l'étude	83
2. Méthode	83
3. Résultats principaux et conclusion	84
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	113

BIBLIOGRAPHIE	117
ANNEXES: AUTRES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	124

Glossaire

Ach : acétylcholine

ADP : adénosine diphosphate

Akt : protéine kinase B

ATP : adénosine triphosphate

Ang II : angiotensine II

BH₄ : tétrahydrobioptérine

BK : bradykinine

CNP : peptide natriurétique de type C (*C-type natriuretic peptide*)

EDHF : facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (*endothelium-derived hyperpolarizing factors*)

ET-1 : endothéline-1

eNOS : NO synthase endothéliale (*endothelial nitric oxide synthase*)

CMLV : cellule musculaire lisse vasculaire

EDV : vasorelaxation endothélium-dépendante (*endothelium-dependent vasorelaxation*)

GMPC : guanosine monophosphate cyclique

GTP : guanosine triphosphate

HDL-c : cholestérol des lipoprotéines de haute densité (*High density lipoprotein cholesterol*)

ICAM-1 : molécule d'adhésion intracellulaire-1 (*intercellular adhesion molecule-1*)

l'IFN- γ : interféron- γ

IMC : indice de masse corporelle (Kg/m²)

LDL-c : cholestérol des lipoprotéines de faible densité (*low density lipoprotein-cholesterol*)

LDL-r : récepteur des LDL (*low density lipoprotein-receptor*)

LRP : protéine associée au récepteur des LDL (*low density lipoprotein-receptor-related-protein*)

L-NMMA : L-N-monométhyl arginine

L-NAME : N-nitro-L-arginine méthyl ester

MAP-kinase : protéine-kinase activée par les mitogènes (*mitogen-activated protein kinase*)

M-CSF : facteur de stimulation de colonies de monocytes (*monocyte-colony stimulating factor*)

MCP-1 : protéine chémoattractante de monocytes de type 1 (*monocyte chemoattractant protein-1*)

MET : équivalent métabolique (*metabolic equivalents*)

MMP-2 : métalloprotéinases 2

MMP-9 : métalloprotéinases 9

NADPH oxydase : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase

NO: monoxyde d'azote (*nitric oxide*)

O_2^- : anion superoxyde

ONOO⁻ : anion peroxydite

oxLDL : LDL oxydés (*oxylized LDL*)

PAI-1 : inhibiteur de l'activateur du plasminogène (*plasminogen activator inhibitor-1*)

p-Akt : Akt phosphorylée sur la sérine en position 473

PDGF : facteur de croissance dérivé des plaquettes (*platelet derived growth factor*)

p-eNOS : eNOS phosphorylée sur la sérine en position 1177

PGI₂ : prostacycline

RAS : système rénine-angiotensine (*renin angiotensin system*)

ROS : radicaux libres oxygénés (*reactive oxygen species*)

RT-PCR : réaction en chaîne de la polymérase en temps réel (*Real Time-Polymerase Chain Reaction*)

sGC : guanylate cyclase soluble

Shear stress : forces de cisaillement

SNP : nitroprussiate de sodium

SOD : superoxyde dismutase

TNF- α : Facteur de nécrose tumorale (*tumor necrosis factor- α*)

tPA : activateur tissulaire du plasminogène (*tissular plasminogen activator*)

TXA₂ : thromboxane A₂

VCAM-1 : molécule d'adhésion vasculaire-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*)

VLDL : lipoprotéine de très faible densité (*very low density lipoprotein*)

VO₂max : consommation maximale d'oxygène (mL/min/Kg)

INTRODUCTION GENERALE

Les maladies cardiovasculaires, au premier rang desquelles figurent les cardiopathies et accidents vasculaires de toutes origines, constituent l'une des premières causes de mortalité et de morbidité en France. L'organisation mondiale de la santé prédit qu'elles constitueront aussi la première raison de handicap et de décès dans de très nombreux pays à la fin de la décennie.

L'athérosclérose est la principale cause de survenue des maladies cardiovasculaires. Fléau des temps modernes, l'athérosclérose est une pathologie inflammatoire artérielle chronique. La dysfonction endothéliale est impliquée de façon précoce dans la physiopathologie de l'athérosclérose. Dans les conditions physiologiques normales, l'endothélium, interface entre le sang circulant et la paroi artérielle, joue un rôle déterminant dans l'homéostasie vasculaire de part ses nombreuses propriétés vasorelaxantes et vasoprotectrices. La fonction endothéliale peut être altérée par les facteurs de risque cardiovasculaire favorisant ainsi un milieu propice à l'apparition et au développement des plaques athéromateuses. Celles-ci peuvent devenir instables et se rompre avec pour conséquence les complications thrombo-emboliques graves que l'on connaît (infarctus du myocarde, accident vasculaire cérébral, artériopathie périphérique, mort subite d'origine cardiovasculaire).

En France, les dépenses médico-économiques annuelles propres aux maladies cardiovasculaires athéro-thrombotiques sont estimées à 19 billions d'euros (Leal *et al.*, 2006). La sédentarité, dont la prévalence ne cesse d'augmenter dans notre société, est aujourd'hui reconnue comme un facteur de risque cardiovasculaire indépendant au même titre, par exemple, que l'hypertension, l'hypercholestérolémie ou le diabète. Les études chez l'homme et l'animal montrent clairement que la sédentarité accélère le développement de l'athérosclérose (Laufs *et al.*, 2005; Leon, 2005). A l'inverse, il est bien démontré dans la littérature qu'une activité physique pratiquée régulièrement contribue à la prévention primaire et secondaire des maladies cardiovasculaires (Bassuk & Manson, 2005; Casillas *et al.*, 2007; Gaesser, 2007; Pedersen & Saltin, 2006; Vuori I, 2007; Warburton *et al.*, 2006). Lutter contre la sédentarité en vulgarisant la pratique d'une activité physique au plus grand nombre d'entre nous permettrait de réduire fortement l'incidence des événements cardiovasculaires liés à l'athérosclérose. D'autre

part, l'activité physique, contrairement aux traitements pharmacologiques (hypocholestérolémiants, anti-hypertenseurs...), est une mesure de prévention peu onéreuse qui prend tout son sens dans un système de santé "meurtri" par un déficit budgétaire des plus conséquents.

Si les bienfaits de l'exercice sur la prévention de l'athérosclérose sont bien établis à l'heure actuelle, l'approche expérimentale apparaît nécessaire pour en comprendre les mécanismes physiopathologiques et moléculaires afin de sensibiliser davantage l'opinion et les pouvoirs publics sur l'intérêt sanitaire de la pratique physique et sportive.

Les travaux scientifiques ont bien démontré les effets favorables de l'exercice sur les facteurs de risque inhérents aux maladies cardiovasculaires. Toutefois, de nombreux mécanismes athéro-protecteurs précisant les bienfaits de l'exercice physique sont encore inconnus.

L'objectif de notre projet d'étude est donc double:

- 1. Démontrer que l'activité physique enrayer certaines étapes clés de l'athérosclérose à l'origine de ses complications cliniques graves.**
- 2. Identifier les mécanismes biologiques anti-athérogènes de l'exercice physique.**

Nous supposons que l'exercice est capable de prévenir la dysfonction endothéliale, de ralentir le développement des plaques athéroscléreuses, d'améliorer leur qualité et de prévenir leur instabilité.

REVUE DE LITTERATURE

PREMIERE PARTIE: L'ATHEROSCLEROSE

1. Définition générale

L'athérosclérose est la composante-clé des maladies cardiovasculaires. Elle est considérée comme une inflammation chronique de l'intima des vaisseaux. Cette pathologie des larges et moyennes artères (aorte, artères carotidiennes, coronaires, iliaques et fémorales) trouve son origine dans l'interaction entre les LDL-c (cholestérol des lipoprotéines de faible densité), les cellules inflammatoires et les éléments de la paroi artérielle (cellules musculaires lisses vasculaires: CMLV). La dysfonction endothéliale, caractérisée par la perte des propriétés vasculo-protectrices endothélium-dépendantes comme nous le décrirons ultérieurement, prédispose les artères au développement de l'athérosclérose. Débutant comme une petite strie lipidique, cette maladie évolue sur plusieurs décennies en lésions complexes qui peuvent progresser en lésions stables ou instables (vulnérables), susceptibles de se rompre et former une thrombose artérielle. Les présentations cliniques de la maladie athéromateuse sont multiples et fonctions de l'artère touchée. L'angine de poitrine et l'infarctus du myocarde (atteintes des coronaires) dominant par leur fréquence et leur sévérité, suivis de près par les atteintes carotidiennes et les accidents vasculaires cérébraux. Le processus athéroscléreux peut aussi affecter les artères irriguant les membres inférieurs (artères iliaques et fémorales) donnant lieu à la maladie artérielle périphérique (claudication oblitérante des membres inférieurs). Cependant, la maladie reste souvent silencieuse et le patient le plus souvent asymptomatique.

Nous expliquerons les étapes physiopathologiques majeures de l'athérosclérose.

2. Un problème de santé publique majeur

Les maladies cardiovasculaires constituent la première cause de mortalité dans le monde (16.2 millions de décès en 2003, soit 29% de la mortalité totale) (World Health Organization, 2003). Le constat pour 2010 est alarmant: on estime que les maladies cardiovasculaires seront aussi la première cause de mortalité dans les pays en voie de développement, jusque-là protégés du mode de vie occidental (industrialisation, urbanisation, "malbouffe"...) et de ses facteurs de risques inhérents (hypertension,

hypercholestérolémie, diabète, obésité, sédentarité...). Les maladies cardiovasculaires sont à l'origine de 1.9 millions de décès annuels dans l'union européenne, soit près de la moitié de la mortalité totale (42%) (Petersen, 2005). En France, les maladies cardiovasculaires ont tué en 2007 environ 147 000 personnes, ce qui représente environ 29% de la mortalité totale (bulletin épidémiologique hebdomadaire de l'Institut de veille sanitaire du 18 septembre 2007).

3. Une étape clé: la dysfonction de l'endothélium

La dysfonction endothéliale serait inévitablement une étape clé et un facteur prédictif des événements cardiovasculaires. Plus qu'une simple "blessure" vasculaire localisée, la dysfonction endothéliale peut être regardée comme un véritable syndrome affectant de nombreux territoires vasculaires. Pour comprendre les mécanismes par lesquels la dysfonction endothéliale favorise la survenue de l'athérosclérose et de la thrombose artérielle, il est important préalablement de décrire la nature et la fonction de l'endothélium sain.

3.1 Fonction endothéliale et monoxyde d'azote (NO)

Les vaisseaux sanguins sont constitués de trois tuniques morphologiquement distinctes, de l'extérieur vers l'intérieur du vaisseau: l'adventice, la média et l'intima. L'adventice se compose essentiellement de tissu conjonctif et permet la fixation des artères aux tissus du voisinage. La média est la tunique la plus épaisse. Elle se compose de fibres élastiques, de collagène et de CMLV disposées en anneaux autour de la lumière des vaisseaux. Sa composition lui confère deux propriétés essentielles: élasticité et contractilité artérielle. Enfin, l'intima regroupe l'endothélium qui tapisse la face interne des vaisseaux et l'espace sous-endothélial.

De par sa position privilégiée entre le sang et la paroi artérielle, l'endothélium module l'homéostasie des vaisseaux et les protège du risque athérogène. La plupart des propriétés de l'endothélium sont médiées par le NO.

3.1.1 Contrôle de la vasomotricité

L'endothélium contrôle le tonus vasculaire et le débit de perfusion en synthétisant et en libérant de nombreuses substances vasorelaxantes ou vasoconstrictrices qui diffusent vers les CMLV sous-jacentes. Les facteurs endothéliaux vasorelaxants comprennent le monoxyde d'azote (NO), la prostacycline (PGI₂), le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF), la bradykinine (BK) ou le peptide natriurétique de type C (CNP). Les facteurs endothéliaux qui provoquent la contraction des CMLV sont l'endothéline-1 (ET-1), le thromboxane A₂ (TXA₂), l'angiotensine II (Ang II) ou les radicaux libres oxygénés (ROS). Dans les conditions physiologiques, il existe un équilibre permanent entre les substances endothéliales vasodilatatrices et vasoconstrictrices avec prédominance des premières sur les secondes.

Parmi les substances délivrées par l'endothélium, le NO est probablement la molécule la mieux connue. C'est un gaz liposoluble, avec une demi-vie courte, constitué par un atome d'oxygène et un atome d'azote. Le précurseur de sa synthèse est un acide aminé: la L-arginine qui, sous l'action catalytique d'une enzyme constitutive, la NO synthase endothéliale (eNOS), avec la présence de cofacteurs comme la tétrahydrobioptérine (BH₄), va libérer le NO et la L-citrulline. La localisation de la eNOS est membranaire. A ce niveau, elle est en contact avec une protéine, la cavéoline, qui exerce une activité inhibitrice sur l'enzyme. L'activation de la eNOS nécessite une élévation de la concentration en calcium libre intracellulaire lequel, en se complexant à la calmoduline, déplace la liaison inhibitrice entre la cavéoline et la eNOS et active cette dernière. Le NO a la particularité de traverser les membranes et de diffuser très rapidement dans la circulation sanguine ou dans les CMLV sous-jacentes. Dans celles-ci, le NO active la guanylate cyclase soluble (sGC), à l'origine de la production de guanosine monosphosphate 3,5 cyclique (GMPc) qui relaxe la CMLV et induit une vasorelaxation. Cette vasorelaxation qui nécessite un endothélium présent et fonctionnel est appelée vasorelaxation endothélium-dépendante (EDV). De très nombreux facteurs neuro-humoraux circulants ou libérés localement (acétylcholine : Ach, BK, ADP : adénosine diphosphate, ATP : adénosine triphosphate) produisent une vasorelaxation de cette façon (activation chimique de l'endothélium). Par exemple, l'Ach, en se fixant sur des

récepteurs endothéliaux qui lui sont spécifiques (récepteurs muscariniques), induit un processus de transduction du signal qui active de nombreuses voies de signalisation intracellulaires, principalement calcium-dépendantes, capables de stimuler la eNOS et par conséquent la production de NO (Figure 1).

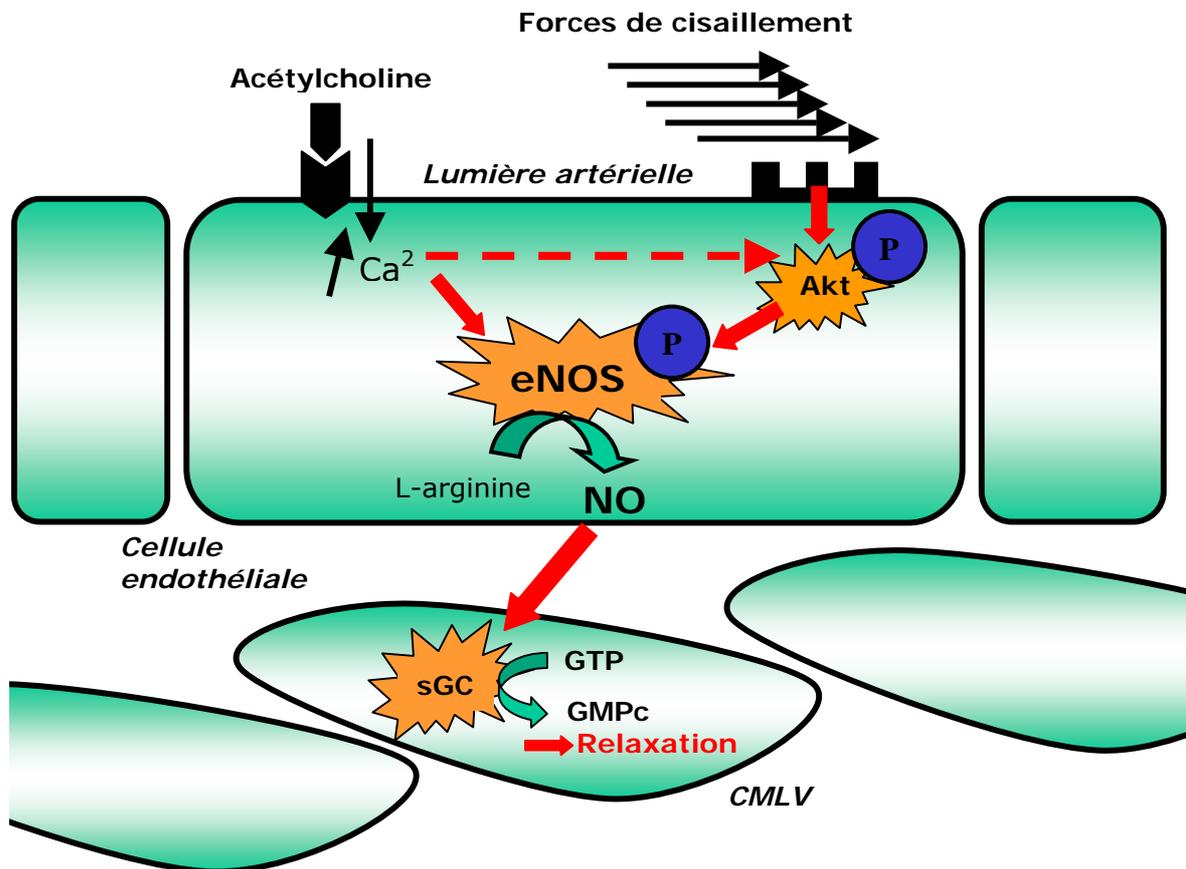


Figure 1. Biosynthèse du NO. L'Ach (stimulus chimique) stimule la eNOS principalement par un mécanisme calcium-dépendant. L'activation de la eNOS par les forces de cisaillement (stimuli mécaniques) est dépendante de sa phosphorylation qui est induite par l'activation/phosphorylation de la protéine kinase Akt (protéine kinase B) via un mécanisme calcium-indépendant. Le NO ainsi produit diffuse dans la cellule musculaire lisse sous-jacente, active la sGC à l'origine de la production de GMPc qui relaxe les CMLV et induit une vasorelaxation. Cette vasorelaxation est dite endothélium- et NO-dépendante. Le NO diffuse aussi dans le lumière artérielle où il prodigue ses effets vasculo-protecteurs.

Le stimulus physiologique de la libération endothéliale de NO le plus important est probablement mécanique: les forces de frottement ou de cisaillement (shear stress) que le déplacement du sang exerce sur l'endothélium. Ces forces orientées longitudinalement varient avec le débit sanguin local et les conditions d'écoulement. Les forces de

cisaillement stimulent des récepteurs membranaires sensibles à l'étirement de la cellule: les mécanosenseurs ainsi activés conduisent à des changements fonctionnels dans la cellule endothéliale, notamment une induction de l'expression du gène eNOS. Les forces de cisaillement activent la eNOS par un mécanisme calcium-indépendant qui nécessite la phosphorylation de la eNOS (Figure 1). Cette modification post-traductionnelle survient sur le résidu sérine en position 1177 de la eNOS et est médiée par la phosphorylation de la protéine kinase Akt (protéine kinase B) sur le résidu sérine en position 473. La voie de signalisation de l'Akt joue donc un rôle majeur dans l'activation de la eNOS en réponse aux forces de cisaillement. Il est à noter que les stimuli chimiques tels que l'Ach peuvent également activer la eNOS via cette voie.

En réponse à une augmentation des forces de cisaillement (augmentation de débit à diamètre constant), l'endothélium augmente la libération de NO pour provoquer, par une rétro-action, une vasodilatation débit- et NO-dépendante afin d'atténuer les forces de cisaillement. Ce contrôle local du débit sanguin, permet d'adapter à tout moment le calibre des artères, notamment les artérioles, en fonction des variations locales de débit. Ainsi, lors d'un exercice physique, l'élévation du débit cardiaque et de la vitesse de l'écoulement sanguin dans le système artériel, en stimulant la vasodilatation débit- et NO-dépendante induite par l'élévation des forces de cisaillement sur l'endothélium, contribue, en partie, à expliquer l'élévation de la perfusion sanguine des muscles en activité.

3.1.2 Propriétés anti-athérogènes

Comme nous l'avons mentionné auparavant, le NO endothélial est également libéré dans la circulation sanguine ou il génère des effets vasculo-protecteurs. Le NO est impliqué, par exemple, dans l'inhibition de multiples étapes de l'athérogenèse et de la thrombogenèse (Tableau 1) qui seront détaillées ultérieurement.

Effet anti-oxydant

Effet anti-inflammatoire

Inhibition de l'adhésion et de la migration des leucocytes

Inhibition de la prolifération et de la migration des CMLV

Inhibition de l'activité des facteurs de croissance

Inhibition de l'agrégation et de l'adhésion plaquettaire

Effet anti-coagulant

Effet pro-fibrinolytique

Tableau 1. Les actions anti-athérogènes du NO.

Ainsi, l'endothélium sain, via ses effets vasorelaxants et anti-athérogènes NO-dépendants, est gage d'un fonctionnement vasculaire optimal. Malheureusement, dans les conditions physiopathologiques, la fonction endothéliale est généralement altérée avec, pour conséquence, une aggravation du risque athérogène.

Quelles sont les caractéristiques de la dysfonction endothéliale?

3.2 Caractéristiques de la dysfonction endothéliale

3.2.1 Causes et mécanismes biologiques de la dysfonction endothéliale

L'existence d'une dysfonction endothéliale est généralement associée à la présence de facteurs de risque cardiovasculaire et est observée à un stade précoce de la plupart des pathologies atteignant le système circulatoire. Ainsi, l'altération de la fonction endothéliale, évaluée le plus souvent par des méthodes pharmacologiques et biologiques comme nous l'expliquerons ultérieurement, a été largement démontrée chez les fumeurs chroniques, chez les personnes avec une hypercholestérolémie (principalement une augmentation des LDL-c), un diabète, une hypertension, une obésité ou ayant un mode de vie sédentaire. Les conditions hémodynamiques locales déterminent aussi fortement la "santé" endothéliale. Ainsi, les territoires artériels où les forces de cisaillement sont faibles ou perturbées (notamment au niveau des bifurcations)

sont des régions propices à un dysfonctionnement de l'endothélium contrairement aux régions où les forces de cisaillement sont élevées (Chatzizisis *et al.*, 2007).

La caractéristique principale de la dysfonction endothéliale est une réduction de la biodisponibilité en NO (c'est à dire une perte quantitative de NO biologiquement actif) avec la perte de ses propriétés anti-athérogènes et anti-thrombotiques (Raij, 2006). Les origines de la dysfonction endothéliale sont complexes et multifactorielles: "découplage" de la eNOS (en l'absence du substrat L-arginine ou du cofacteur BH₄), réduction de l'expression et/ou de l'activité de la eNOS, augmentation de la dégradation du NO ou encore altération de la transmission des événements signalétiques médiés par le NO (Braam & Verhaar, 2007). Néanmoins, les deux principales causes aboutissant à la baisse de la biodisponibilité en NO seraient premièrement, la réduction de l'expression de la eNOS et/ou de l'activité eNOS à l'origine d'une moindre production ou bioactivité du NO; et deuxièmement, l'augmentation de sa dégradation. Les mécanismes relatifs à la baisse de la bioactivité du NO sont nombreux : (1) altération des récepteurs endothéliaux (diminution de leur nombre ou de leur sensibilité) qui perturbent la liaison des agonistes (i.e., Ach) à leur récepteur, (2) diminution de l'expression de l'ARNm et/ou de la protéine eNOS et (3) altération de la voie de signalisation de l'Akt avec pour conséquence une moindre phosphorylation de la eNOS. Les causes de l'augmentation de la dégradation du NO résultent, quant à elles, en grande partie à sa capture par l'anion superoxide (O₂⁻) qui appartient à la famille des ROS. Dans les conditions physiologiques normales, les O₂⁻ sont produits en petites quantités au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale comme résidus de la réduction imparfaite de l'oxygène ou au cours du fonctionnement de certaines enzymes. Il existe alors un équilibre entre la génération des radicaux libres pro-oxydants et leur destruction par les défenses enzymatiques anti-oxydantes (superoxydes dismutases, glutathione peroxidase et catalase) qui protègent de ce fait les cellules des effets toxiques des ROS. Dans les conditions physiopathologiques, il se produit un stress oxydant, délétère pour les cellules, caractérisé par un déséquilibre de la balance pro-oxydants/anti-oxydants en raison d'une sur-production de O₂⁻. Les O₂⁻ vont alors rapidement se combiner au NO pour former l'anion peroxynitrite (ONOO⁻) qui possède de nombreux effets pro-athérogènes comme l'oxydation des LDL-c qui est l'un des

événements initiateurs majeurs de l'athérosclérose comme nous le décrivons ci-après. Plusieurs sources enzymatiques de production de ROS ont été identifiées au sein de la vascularisation: la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase (NADPH oxydase) qui est le système oxydatif majeur, la xanthine oxydase, la eNOS elle-même lorsqu'elle est découplée et les ROS d'origines mitochondriales (Braam & Verhaar, 2007).

"Agressée" par les facteurs de risque cardiovasculaire, l'endothélium va perdre ses propriétés vasculo-protectrices et favoriser, par conséquent, un "climat" pro-athérogène marqué, entre autres, par une expression des molécules d'adhésion endothéliale qui vont initier l'infiltration des cellules inflammatoires dans l'intima à l'origine de la genèse de la plaque d'athérome.

Etant donné le rôle majeur de la dysfonction endothéliale dans la pathologie cardiovasculaire, il semble important de pouvoir évaluer l'activité et l'intégrité de l'endothélium afin de dépister un éventuel dysfonctionnement néfaste pour le vaisseau. Quelles sont les méthodes permettant l'évaluation de la fonction/dysfonction endothéliale ?

3.2.2 Evaluation de la dysfonction endothéliale

La fonction endothéliale peut être évaluée chez l'homme et l'animal par des techniques *in vivo* ou *in vitro*. Le plus souvent, elle est mise en évidence par la mesure du degré de relaxation endothélium-dépendante de l'artère en question.

Chez l'homme, la fonction endothéliale peut-être évaluée par méthodes fonctionnelles en réponse à des stimuli pharmacologiques ou physiologiques. Les épreuves pharmacologiques sont réalisées principalement au niveau coronaire ou musculaire périphérique (avant-bras) et sont généralement utilisées pour l'étude des artères de résistance. Elles reposent sur l'administration locale de substances telles que l'Ach qui exerce une action vasodilatatrice endothélium-, récepteur- et NO-dépendante comme nous l'avons vu précédemment et sur la mesure par pléthysmographie ou Doppler, des changements concomitants du débit sanguin. Cette réponse vasomotrice est comparée à celle obtenue après administration d'un donneur exogène de NO comme le

nitroprussiate de sodium (SNP) qui agit directement sur les CMLV (vasodilatateur endothélium-indépendant). Les épreuves physiologiques sont utilisées pour l'étude des artères de conductance. Elles reposent sur l'évaluation de l'augmentation endothélium-dépendante, du diamètre de l'artère (généralement l'artère brachiale) en réponse à l'augmentation du débit régional. Cette dilatation débit-dépendante est obtenue en réponse le plus souvent à une hyperémie post-ischémique. Le diamètre artériel est alors mesuré par angiographie quantitative, échographie haute résolution ou echotracking. Il est possible de mesurer les réponses dilatatrices en présence d'inhibiteurs de la synthèse de NO (L-NMMA : L-N-monométhyl arginine, L-NAME: N-nitro-L-arginine méthyl ester...).

Chez l'animal, l'exploration de la capacité de relaxation nécessite le plus souvent des techniques *in vitro* d'artères isolées en chambre d'organe. Il est possible, grâce à ces techniques, d'utiliser des segments d'artères de conductance (aorte thoracoabdominale, carotide, artère brachiale, artère fémorale...) et/ou d'artères de résistance (coronaire, mésentérique...). Les capacités de relaxation ou de dilatation sont évaluées en injectant dans le bain d'organe des concentrations croissantes de vasodilatateurs endothélium-dépendants ou endothélium-indépendants sur des segments artériels pré-contractés par un vasoconstricteur comme la noradrénaline ou la phényléphrine (Figure 2).

Par ces techniques, la dysfonction endothéliale a largement été observée, soit chez l'homme présentant un facteur de risque cardiovasculaire tel que l'hypertension ou l'hypercholestérolémie (Buus *et al.*, 2007; Karasek *et al.*, 2006), soit chez le modèle animal correspondant (Graham & Rush, 2004; Malakul *et al.*, 2008). Cette atteinte endothéliale se manifeste par une diminution de la vasodilatation endothéliale en réponse à des agonistes tels que l'Ach. Par contre, la vasodilatation indépendante de l'endothélium n'est généralement pas modifiée. Ces indications supportent l'hypothèse que l'altération de la vasodilatation artérielle a une origine endothéliale (et non musculaire vasculaire) et implique une baisse de la biodisponibilité vasculaire en NO.

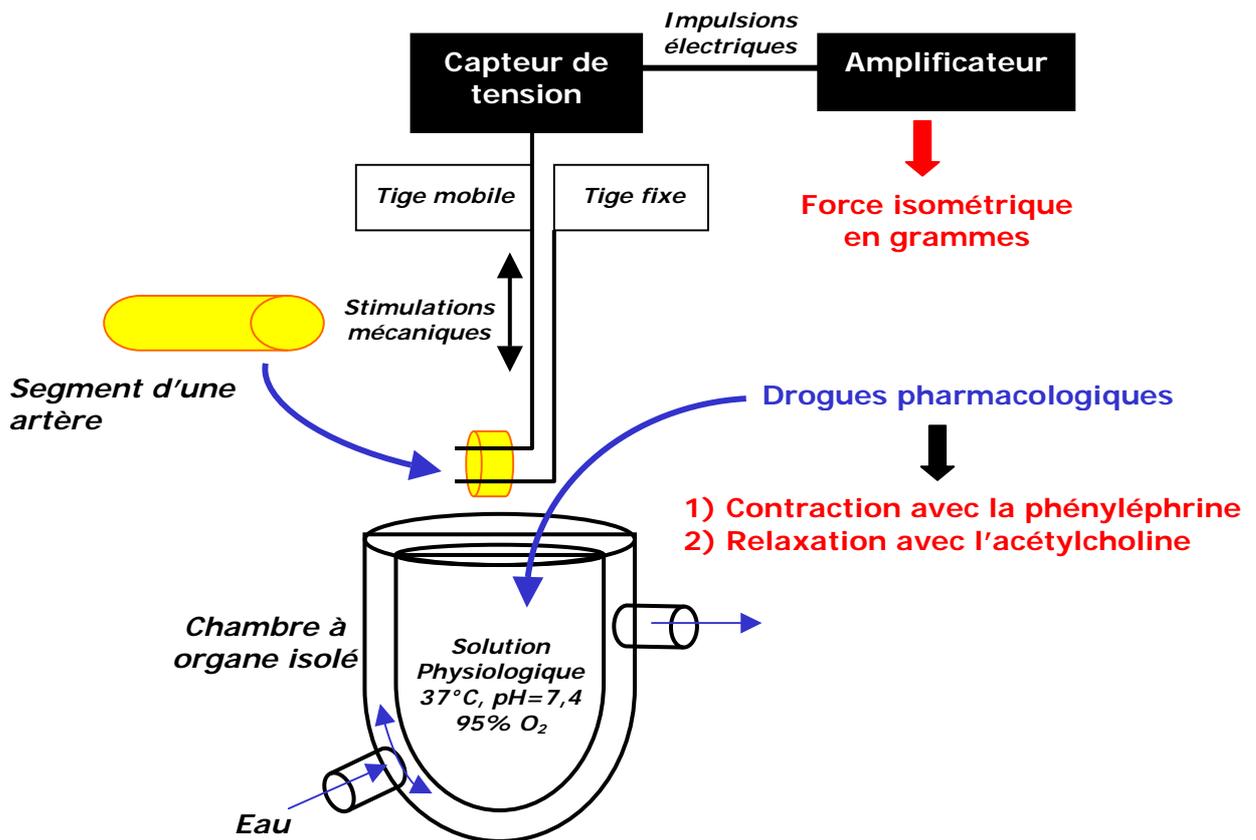


Figure 2. Mesure *in vitro* de la fonction endothéliale et évaluation de la relaxation artérielle endothélium- et NO-dépendante. Les segments artériels prélevés sont placés entre deux tiges métalliques, dont l'une est fixe et l'autre reliée à un capteur de tension. Pendant toute l'expérimentation, le segment artériel baigne dans une solution physiologique contenue dans la cuve à organe isolé. La tension isométrique (en grammes) est mesurée en utilisant la force de déplacement à laquelle est soumise la tige mobile lorsque le segment artériel se contracte ou se relâche. La vasorelaxation endothélium-, récepteur- et NO-dépendante est déterminée en mesurant la capacité de l'artère à se relâcher en injectant dans la cuve des doses croissantes d'Ach (le segment artériel étant préalablement contracté par un agoniste comme la phényléphrine).

En plus des méthodes fonctionnelles, la dysfonction endothéliale peut-être évaluée par des méthodes biologiques (Brevetti *et al.*, 2008; Joannides *et al.*, 2006). Il s'agit généralement de dosages plasmatiques de différents marqueurs endothéliaux qui interviennent dans la maladie athéro-thrombotique comme nous le verrons ci-après, tels que les marqueurs de l'inflammation, plus particulièrement les molécules d'adhésion cellulaire (ICAM-1: molécule d'adhésion intracellulaire-1, VECAM-1: molécule d'adhésion vasculaire-1), E- et P-sélectine), les cytokines pro-inflammatoires (IL-8: interleukine-8, TNF- α : facteur de nécrose tumorale) ou des marqueurs de l'hémostase (tPA: activateur tissulaire du plasminogène, PAI-1: inhibiteur de l'activateur du plasminogène,

thrombomoduline). La production de NO peut également être évaluée biologiquement par le dosage plasmatique des nitrites/nitrates.

Ainsi, l'homme à risque cardiovasculaire ou avec une maladie cardiovasculaire déclarée présente le plus souvent un taux plasmatique de ces marqueurs augmenté par rapport à des sujets sains (Chironi *et al.*, 2006; Garanty-Bogacka *et al.*, 2005; Nakase *et al.*, 2008). Cependant, ces méthodes biologiques apportent une information générale sur la fonction endothéliale, non spécifique d'un territoire artériel contrairement aux méthodes fonctionnelles qui permettent une caractérisation directe. C'est pourquoi la mesure de la relaxation endothélium-dépendante est la méthode la plus pertinente pour le diagnostic et la prise en charge précoce de la dysfonction endothéliale.

La dysfonction endothéliale constitue un marqueur de risque, prédictif du développement de l'athérosclérose. Quelles sont les étapes pathophysiologiques majeures de l'athérosclérose ?

4. Athérogenèse et formation de la plaque d'athérosclérose

Les connaissances accumulées ces dernières années ont considérablement élargi l'horizon des mécanismes responsables de la maladie athéromateuse. Nous savons aujourd'hui que l'accumulation de cholestérol dans la paroi des vaisseaux ne peut être seule responsable de la maladie; la réponse inflammatoire locale et systémique fait partie intégrante du processus. Les acteurs jouant un rôle dans la genèse de la plaque sont maintenant connus : les LDL-c, les cellules inflammatoires (macrophages dérivés des monocytes circulants et lymphocytes T), et les éléments cellulaires de la paroi artérielle (CMLV...). Nous verrons comment ces cellules interagissent au cours du processus athéroscléroseux.

4.1 Initiation des lésions athéroscléreuses

Durant la phase la plus précoce de l'athérogenèse, des LDL-c s'amassent dans l'intima des artères. On comprend d'emblée pourquoi l'hypercholestérolémie est un facteur de risque majeur de l'athérosclérose. Cette phase d'infiltration lipidique est suivie de leur oxydation (oxLDL). Ces LDL-c modifiés, qui représentent des composés cytotoxiques, déclenchent alors une réponse inflammatoire locale caractérisée par l'expression *de novo* de molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales qui permettront l'invasion de l'intima par des leucocytes (monocytes et lymphocytes T) du sang circulant. Les monocytes sont, dans un premier temps, immobilisés à la paroi artérielle suite à leur interaction avec les molécules d'adhésion telles que P- et E-sélectine, VECAM-1 et/ou ICAM-1. Dans un deuxième temps, les facteurs chimioattractants, notamment le MCP-1 (protéine chémoattractante de monocytes de type 1), initient l'extravasation des monocytes adhérents dans l'espace sous-endothélial. Les monocytes infiltrés se différencient en macrophages sous l'action du M-CSF (facteur de stimulation de colonies de monocytes) qui internalisent les oxLDL de façon non régulée. En conséquence, la quantité d'oxLDL accumulée à l'intérieur des macrophages dépasse la capacité de ces derniers à les dégrader. Ces macrophages se transforment alors en cellules spumeuses dans l'intima pour former les stries lipidiques qui constituent le premier stade des lésions athéroscléreuses (Figure 3). Ultérieurement, les cellules spumeuses constitueront le noyau lipidique de la plaque d'athérome. En parallèle, toujours sous l'action du M-CSF, les macrophages activés sécrètent de nombreuses cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α , les interleukines IL-1 β , IL-8 ou encore l'IL-12 qui perpétuent le processus athérogénique en amplifiant le recrutement des monocytes sur le site inflammatoire par la stimulation de la libération de MCP-1 par les CMLV et les cellules endothéliales (Glorian & Limon, 2007).

Les lymphocytes T, principalement des lymphocytes T CD4+, jouent un rôle aggravant lors de l'athérogenèse. Classiquement, les lymphocytes sont classés en deux sous-populations aux fonctions opposées, les lymphocytes Th1 pro-inflammatoires et les lymphocytes Th2 anti-inflammatoires. Dans le processus athéroscléreux, la cytokine IL-12 produite par les macrophages, oriente la polarisation des lymphocytes T vers la voie de

différenciation Th1. Ces cellules vont alors sécréter des cytokines pro-athérogènes comme l'IFN- γ (interféron- γ) qui perpétuent l'activation des macrophages et contribuent fortement à la progression de la plaque (Groyer *et al.*, 2006).

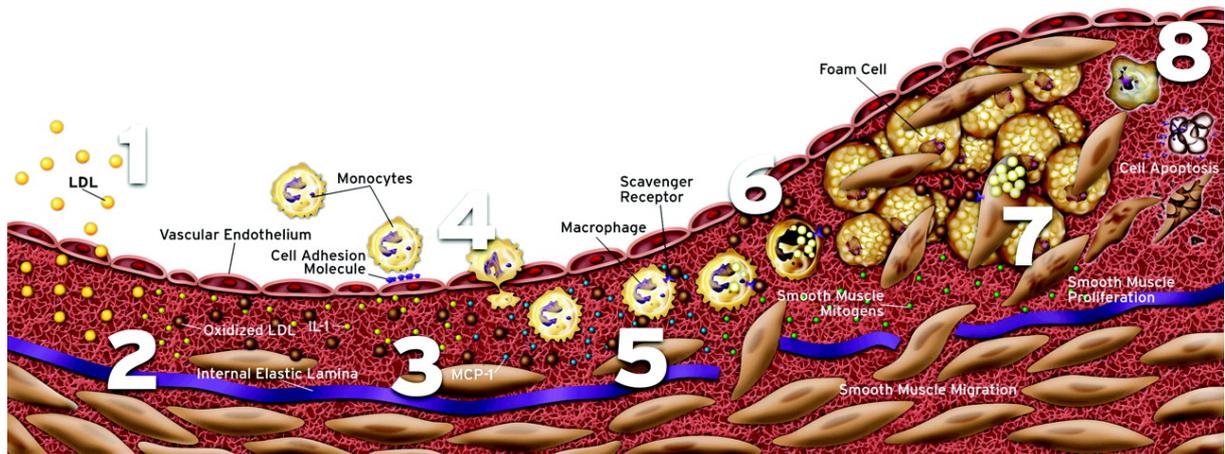


Figure 3. Formation des lésions athérosclérotiques (striations lipidiques). 1 et 2: infiltration et oxydation des LDL-c dans l'espace sous-endothélial; 3 et 4: synthèse de facteurs de croissance qui attirent les monocytes. 6,7 et 8: transformation des macrophages gorgés de cholestérol en cellules spumeuses (Faxon *et al.*, 2004).

4.2 Progression des lésions et formation de la plaque d'athérome

En réponse au PDGF (facteur de croissance dérivé des plaquettes), sécrété par les macrophages et les cellules endothéliales, les CMLV migrent de la media vers l'intima et y prolifèrent. Le PDGF induit également un changement phénotypique des CMLV qui adoptent un phénotype sécrétoire et non plus contractile. Les CMLV synthétisent des protéines matricielles telles que le collagène et l'élastine. Il se forme alors une chape fibreuse qui, progressivement, entoure le noyau lipidique formé par les cellules spumeuses (Figure 4). La progression de la plaque d'athérosclérose se déroule sur de nombreuses années sans manifestations cliniques majeures. Plus que sa taille, c'est essentiellement le phénotype de la plaque (stable ou instable) qui lui donne sa gravité.

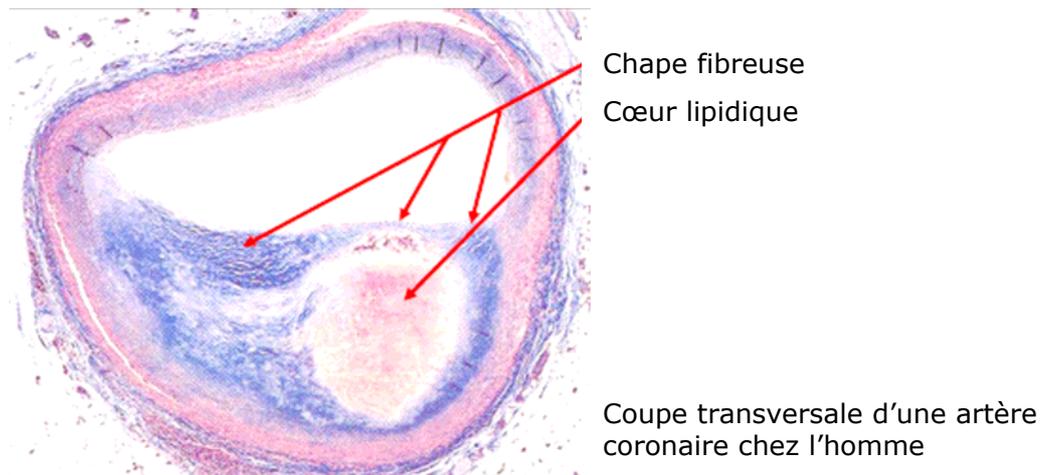


Figure 4. La plaque d'athérome se compose de deux parties principales: le cœur lipidique formé essentiellement de cellules spumeuses riches en cholestérol et de la chape fibreuse composée principalement de CMLV avec synthèse de matrice extracellulaire.

4.3 Plaque instable et maladie athéro-thrombotique

La plaque d'athérosclérose peut donc évoluer vers deux phénotypes:

- Un phénotype dit **stable** non dangereux dans la mesure où l'épaisseur de la chape fibreuse consolide la plaque et où il se produit un remodelage artériel correspondant à une augmentation du diamètre préservant une lumière suffisante pour permettre la circulation sanguine malgré la sténose. Une lumière de taille normale est donc tout à fait compatible avec l'existence de plaques très volumineuses. Toutefois, lorsque le remodelage compensateur a atteint son maximum, toute augmentation de la taille de plaque retentit sur la lumière artérielle, la sténose devient alors sévère et symptomatique.

- Un phénotype dit **instable** ou **vulnérable** qui caractérise la plaque dangereuse. Dès lors, la gravité de l'athérosclérose tient essentiellement au risque d'accident aigu qui fait suite à la rupture de plaque et qui fait intervenir un processus thrombotique. La rupture se situe au niveau de la chape fibreuse et met en contact le sang avec les éléments du centre lipidique; la conséquence en est un phénomène de thrombose (implication des plaquettes puis du système de la coagulation). Dans de nombreux cas,

le processus thrombotique est spontanément résolutif sans survenue de symptômes ischémiques. Parfois, le thrombus rétrécit significativement la lumière artérielle sans être toutefois totalement occlusif: dans le territoire coronaire, le syndrome résultant est l'angine de poitrine instable. Malheureusement, la thrombose se développe assez souvent jusqu'à occlure complètement l'artère, conduisant à une ischémie aiguë du territoire aval (infarctus du myocarde au niveau des coronaires) (Figure 5). On parle alors de maladie athéro-thrombotique. Le thrombus formé peut aussi se désolidariser de la paroi et migrer dans la circulation, provoquant ainsi une embolie dans le territoire en aval. La rupture de plaque peut s'expliquer par des facteurs extrinsèques comme par exemple, une poussée hypertensive ou un effort important. Les facteurs intrinsèques relatifs à la structure et à la composition de la plaque sont toutefois les plus importants. Le plus simple indicateur de vulnérabilité d'une plaque concerne la taille relative du noyau lipidique et de la chape fibreuse. Ainsi, les plaques stables se caractérisent par un cœur lipidique de petite taille et une chape fibreuse épaisse (présence de nombreuses CMLV qui reflètent une matrice extracellulaire abondante assurant la solidité de la chape), contrairement aux plaques instables où le cœur lipidique est volumineux (plus de 50% de la surface totale de la plaque) et la chape fibreuse fine (contenu faible en CMLV et en matrice extracellulaire fragilisant la chape fibreuse). La faible épaisseur de la chape fibreuse dans les plaques instables pourrait s'expliquer par une inhibition de la production de la matrice par certaines cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN- γ (produite par les lymphocytes Th1). La fragilité de la chape fibreuse pourrait être aussi la conséquence de la dégradation de la matrice par les métalloprotéinases (notamment les MMP-2 et MMP-9), produites principalement par les macrophages. Dès lors, le contenu de la plaque en cellules inflammatoires (macrophages et lymphocytes T) est aussi un signe de plaque instable. D'autres caractéristiques morphologiques indiquent également un phénotype instable telle que la présence de cellules spumeuses en-dehors du cœur lipidique, une inflammation de l'adventice ou encore la présence d'une dégénérescence de la média (invasion de la média par des éléments de la plaque, rupture de la limitante élastique qui sépare l'intima de la média, atrophie de la média) (Mazzolai *et al.*, 2004).

Les mécanismes qui expliquent comment une plaque avec un phénotype stable se transforme en une plaque instable ne sont pas encore totalement connus. Le système rénine-angiotensine (RAS) pourrait avoir un rôle déterminant dans l'induction de la plaque vulnérable. Le RAS, et en particulier son peptide actif Ang II, joue un rôle majeur dans l'homéostasie de la pression artérielle et dans l'athérosclérose. L'Ang II favorise l'élévation de la pression artérielle par plusieurs mécanismes, principalement via une vasoconstriction des artérioles et aussi via une stimulation de la sécrétion d'aldostérone, une hormone sécrétée par les glandes surrénales qui provoque une augmentation de la volémie par réabsorption de sodium et d'eau au niveau des reins. L'ang II est également impliqué dans les nombreuses étapes physiopathologiques qui initient l'apparition et la croissance de la plaque athéromateuse: dysfonction endothéliale, stress oxydant (augmentation de l'activité de la NADPH oxydase, des ROS), inflammation (production des médiateurs de l'adhésion leucocytaire : ICAM-1 et VECAM-1, des cytokines : IL-1 et TNF- α ...) (Schmieder *et al.*, 2007). Récemment, l'équipe du Dr Mazzolai a montré pour la première fois que l'Ang II est un médiateur de la vulnérabilité de la plaque (Mazzolai *et al.*, 2004). L'ensemble des effets hypertenseurs et pro-athérogènes de l'Ang II serait médié par le récepteur AT1.

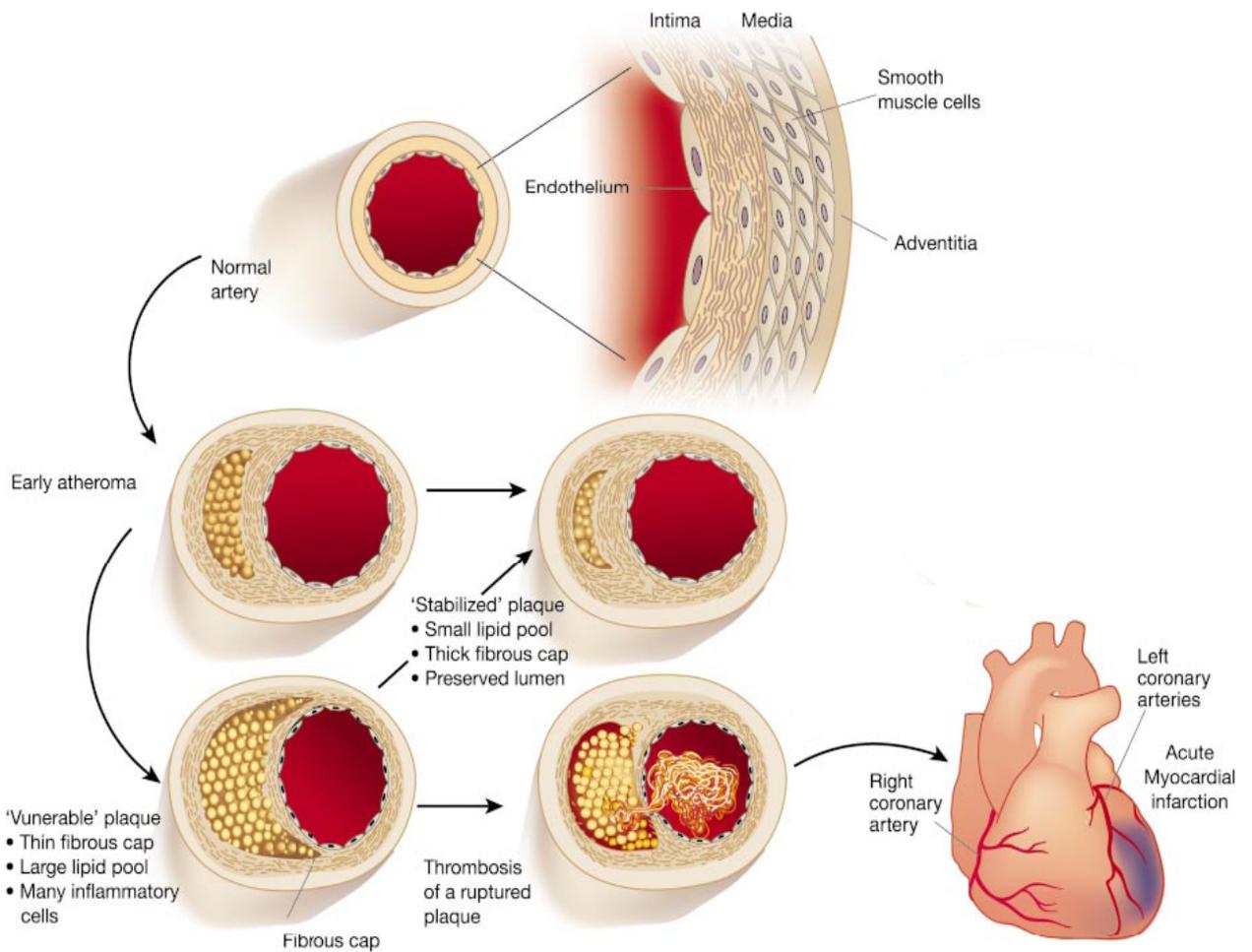


Figure 5. Plaque stable et instable. L'endothélium normal assure un bon fonctionnement vasculaire et protège de l'athérosclérose. Les facteurs de risque cardiovasculaire initient une dysfonction endothéliale pro-athérogène. Les lésions athéroscléreuses se développent progressivement et évoluent en plaque stable ou instable. La plaque stable se caractérise par un cœur lipidique petit, une chape fibreuse épaisse. A l'inverse, la plaque instable, susceptible de se rompre et entraîner un événement thrombo-embolique (infarctus du myocarde au niveau du territoire coronaire), se compose d'un cœur lipidique volumineux, d'une chape fibreuse fine et contient de nombreuses cellules inflammatoires (majoritairement des macrophages) (adapté de (Libby, 2002).

DEUXIEME PARTIE: EXERCICE PHYSIQUE COMME OUTIL PREVENTIF DE CHOC CONTRE L'ATHEROSCLEROSE

L'activité physique au sens large inclut tout mouvement corporel produit par la contraction des muscles squelettiques entraînant une augmentation significative de la dépense énergétique. Elle inclut des activités professionnelles, des déplacements dans la vie de tous les jours et des activités de loisir. L'exercice ou pratique sportive ou entraînement physique est un sous-ensemble de l'activité physique. Il sous-entend une activité physique planifiée, structurée, répétée dont le but est d'améliorer les capacités physiques d'un individu. Les principales caractéristiques de l'activité ou de l'exercice physique sont le type (exercice en endurance qui fait intervenir la filière énergétique aérobie ou exercice en résistance faisant intervenir la filière anaérobie), la durée, l'intensité et la fréquence. L'intensité de l'exercice est exprimée en pourcentage de la VO_2max ou d'équivalent métabolique (MET). La VO_2max (exprimée en mL/min/Kg) correspond à la quantité maximale de consommation d'oxygène. Un MET correspond à une dépense énergétique de 1 Kcal/h/Kg ou à une consommation d'oxygène de 3.5 mL/min/kg. Habituellement, un exercice réalisé à une intensité modérée correspond à un effort réalisé à 40-60% de la VO_2max ou comprise entre 3 et 6 METS. Au-dessus de ces valeurs, l'intensité de l'exercice est considérée comme vigoureuse. Généralement, pour obtenir un bénéfice optimal au niveau cardiovasculaire, il est recommandé de pratiquer régulièrement un exercice aérobique (30 min par jour, 5 fois/semaine à intensité moyenne ou 20 min à intensité forte, 3 fois/semaine) (Haskell *et al.*, 2007;Leitzmann *et al.*, 2007) et la majorité des études cliniques citées ci-dessous suivent ces recommandations.

Ainsi, la plupart des études montrent incontestablement que l'activité physique prévient la mortalité cardiovasculaire tant en prévention primaire que secondaire (Bassuk & Manson, 2005;Casillas *et al.*, 2007;Gaesser, 2007;Pedersen & Saltin, 2006;Vuori I, 2007;Warburton *et al.*, 2006). La prévention primaire s'adresse aux sujets porteurs d'un ou plusieurs facteurs de risque, donc susceptibles de développer de l'athérosclérose, mais indemnes de toute pathologie cardiovasculaire cliniquement

décelable. Elle a pour objectif d'éviter la survenue d'accidents athéro-thrombotiques. La prévention secondaire concerne les sujets ayant déjà présenté un accident cardiovasculaire et a pour but d'en éviter la récurrence ultérieure. Il existe également une prévention tout à fait en amont qui concerne les individus sains, dont l'objectif est de prévenir l'installation des facteurs de risque. Dans ce travail, nous citerons les données de la littérature les plus récentes pour souligner le rôle clé de l'exercice dans la prévention primaire et secondaire des événements cardiovasculaires. Nous expliciterons aussi les mécanismes de l'exercice qui régissent ce bénéfice.

1. Prévention primaire et secondaire: données observationnelles et expérimentales récentes

L'activité physique, indépendamment de l'âge et du sexe, est fortement et inversement associée avec le risque de maladies cardiovasculaires en général et avec le risque d'événements coronariens, en particulier. Par exemple, dans une étude américaine portant sur 88393 femmes de 34 à 59 ans, suivies 20 ans en moyenne, la pratique d'au moins 3h30 d'exercice aérobique par semaine chez les femmes obèses (indice de masse corporel (IMC) ≥ 30 kg/m²) est associée à une diminution significative du risque d'événements coronariens par rapport aux femmes obèses pratiquant moins de 1h d'exercice aérobique par semaine (Li *et al.*, 2006). De même, une récente étude prospective, réalisée chez des sujets fumeurs âgés de 50 à 71 ans, a observé une diminution du risque de mortalité cardiovasculaire d'environ 40% chez les sujets ayant suivi un entraînement selon les recommandations citées préalablement (exercice aérobique, 30 min par jour 5 fois/semaine à intensité moyenne ou 20 min à intensité forte 3 fois/semaine) (Leitzmann *et al.*, 2007). Chez les personnes diabétiques de type 2, 3 à 4 heures d'exercice par semaine permettent de diminuer le risque de mortalité cardiovasculaire de 31 à 50% (Hu *et al.*, 2004). Chez l'animal à risque cardiovasculaire, l'exercice en endurance prévient aussi la mortalité cardiovasculaire. Par exemple, Napoli *et al.* ont observé un taux de survie trois fois supérieur chez des souris hypercholestérolémiques qui ont suivi un protocole de nage pendant 18 semaines (5 fois/semaine, 1 heure par séance, 2 séances/jour) comparativement aux souris contrôles

sédentaires (Napoli *et al.*, 2006). De même, l'exercice en endurance sur tapis roulant (3 fois/semaine, 45 minutes/jour) retarde fortement la mortalité cardiaque chez le rat sévèrement hypertendu (Chicco *et al.*, 2008).

L'activité physique est aussi utilisée en prévention secondaire comme outil de réhabilitation chez des patients ayant connu une atteinte cardiovasculaire (Koutroumpi *et al.*, 2008; Milani & Lavie, 2007). Par exemple, chez des patients coronariens entraînés pendant 12 semaines (3 fois/semaine ; 30-50 min/séance), Adams *et al.* ont estimé que leur taux de mortalité serait diminué de 33 à 44% dans les 5 ans suivant l'arrêt de l'entraînement par rapport aux patients coronariens sédentaires (Adams *et al.*, 2008). La mortalité cardiovasculaire est aussi significativement diminuée chez des patients atteints de claudication oblitérante des membres inférieurs ayant une activité physique quotidienne. L'exercice a également amélioré les distances de marche (sans douleurs) de ces patients (Garg *et al.*, 2006).

Comme nous venons de le souligner, l'exercice prévient la mortalité cardio- et vasculo-ischémique induite par l'athérosclérose tout en améliorant la qualité de vie du patient. Ces bénéfices sous-entendent que l'exercice active des mécanismes capables de retarder le développement de l'athérosclérose. Quels sont les mécanismes athéro-protecteurs de l'exercice ?

2. Les mécanismes athéro-protecteurs de l'exercice physique

L'exercice prévient la mortalité liée à l'athérosclérose à travers plusieurs mécanismes : une modification favorable des facteurs de risque et surtout une amélioration de la fonction/dysfonction endothéliale. Ces bénéfices vont freiner le processus athérosclérotique et donc prévenir la mortalité cardiovasculaire

2.1 Effets bénéfiques sur les facteurs de risque cardiovasculaire

Les effets favorables de l'exercice sur les facteurs de risque cardiovasculaire sont largement connus (Bassuk & Manson, 2005; Pedersen & Saltin, 2006; Sasaki & dos Santos, 2006). Toutefois, ce bénéfice ne serait pas le mécanisme athéro-protecteur majeur de l'exercice puisqu'il a été démontré que l'exercice pouvait prévenir la mortalité indépendamment de toute amélioration du risque coronarien (Blair *et al.*, 1996). De ce fait, les effets de l'exercice sur les facteurs de risque cardiovasculaire ne seront pas détaillés dans ce travail.

Brièvement, l'exercice peut améliorer de manière spécifique et/ou systémique l'ensemble des facteurs de risque. A titre d'exemple, il est montré que l'exercice abaisse la pression artérielle chez l'animal/homme hypertendu (Fagard, 2006; Zhang *et al.*, 2006), améliore le profil lipidique chez l'animal/homme hypercholestérolémiant (Napoli *et al.*, 2004; Varady *et al.*, 2005) ou encore améliore la sensibilité à l'insuline chez l'animal/homme diabétique (de Lemos *et al.*, 2007; De *et al.*, 2006). L'effet systémique de l'exercice sur les facteurs de risque cardiovasculaire est bien démontré dans l'étude de Meyer *et al.* qui a analysé l'effet d'un programme d'exercice de 6 mois chez de jeunes sujets obèses (Meyer *et al.*, 2006). Ses résultats montrent que l'exercice, en plus de réduire significativement le poids corporel des sujets, diminue aussi significativement la pression artérielle moyenne, la résistance à l'insuline, les triglycérides, les LDL-c ainsi que le ratio LDL-c/HDL-c.

L'exercice a également un effet systémique sur les facteurs de risque chez le patient coronarien. Par exemple, Peschel *et al.* ont montré une amélioration du profil lipidique, de la pression artérielle et de l'indice de masse corporel suite à un entraînement spécifique de 4 semaines (6 séances quotidiennes de 15 min d'exercice aérobique plus 1h par semaine de sport collectif) (Peschel *et al.*, 2007).

2.2 Effets bénéfiques sur la fonction/dysfonction endothéliale

Etant donné le rôle majeur de la dysfonction endothéliale dans la maladie athéro-thrombotique, on comprend pourquoi elle est rapidement apparue comme une cible préventive et thérapeutique prioritaire. L'amélioration de la fonction endothéliale en réponse à l'exercice serait l'un des mécanismes-clés responsable de la diminution de la mortalité cardiovasculaire observée avec l'exercice.

2.2.1 Données expérimentales récentes

Les données expérimentales indiquent que l'exercice est capable de stimuler la fonction endothéliale, sous-entendu la relaxation endothélium-dépendante, chez les animaux/sujets à risque cardiovasculaire et/ou l'homme coronarien. Ces effets se produisent dans les différents territoires vasculaires (artères de conductance et de résistance) impliqués ou non dans la réalisation de l'exercice.

Chez l'animal, en particulier le porc, Woodman *et al.* ont montré que 16 semaines d'exercice d'endurance sur tapis roulant atténuent les effets délétères de l'hypercholestérolémie sur la relaxation endothélium-dépendante au niveau de l'artère brachiale (Woodman *et al.*, 2003) et des artères coronaires (Woodman *et al.*, 2004). Ces effets préventifs de l'exercice sont également observés au niveau de l'aorte chez la souris hypercholestérolémique (Laufs *et al.*, 2005), diabétique (Moien-Afshari *et al.*, 2008) ou encore chez le rat hypertendu (Graham & Rush, 2004). La fonction endothéliale est aussi améliorée au niveau des artérioles mésentériques de résistance du rat diabétique (Chakraphan *et al.*, 2005). Ces observations chez l'animal ont été confirmées chez l'homme. En effet, il a été montré que 8 semaines d'exercice prévenaient l'altération de la fonction endothéliale de l'artère brachiale observée chez de jeunes sujets obèses par rapport à des sujets avec un poids corporel normal (Watts *et al.*, 2004b). L'exercice prévient aussi la dysfonction endothéliale chez l'homme coronarien (Walsh *et al.*, 2003). L'exercice a également un rôle thérapeutique puisqu'il peut corriger partiellement ou totalement l'altération de la vasorelaxation dépendante de l'endothélium chez l'homme à risque cardiovasculaire ou déjà atteint de la maladie

coronarienne (De *et al.*, 2006;Hambrecht *et al.*, 2000;Meyer *et al.*, 2006;Walsh *et al.*, 2003;Watts *et al.*, 2004a). Par exemple, la vasoconstriction coronarienne paradoxale en réponse à l'Ach est réduite de 54% chez le patient coronarien entraîné pendant 4 semaines (Hambrecht *et al.*, 2000).

Quels sont les mécanismes biologiques moléculaires à l'origine du bénéfice de l'exercice sur la vasorelaxation endothélium-dépendante ?

2.2.2 Les mécanismes moléculaires sous-jacents

L'exercice régulier peut donc améliorer la fonction endothéliale, prévenir et même normaliser la dysfonction endothéliale. Les mécanismes biologiques protecteurs précisant les bienfaits de l'exercice sur la dysfonction endothéliale restent encore largement inconnus. Cependant, les travaux expérimentaux semblent démontrer que l'exercice activerait la voie eNOS/NO soit en augmentant la production de NO (augmentation de l'expression du gène codant pour la eNOS) et/ou soit en diminuant son inactivation (augmentation des enzymes anti-oxydantes et diminution des enzymes pro-oxydantes). De part ces mécanismes, l'exercice augmente la biodisponibilité en NO et en prévient, par conséquent, sa diminution qui est, rappelons-le, la caractéristique principale de la dysfonction endothéliale.

- Sur-expression de la eNOS

Les données de la littérature indiquent que l'exercice, via l'élévation des forces de cisaillement, stimule les facteurs transcriptionnels, traductionnels et post-traductionnels impliqués dans la régulation du gène codant pour la eNOS.

- *Stimulation transcriptionnelle et traductionnelle de la eNOS*

L'exercice, via l'augmentation des forces de cisaillement, est capable d'augmenter directement la quantité d'ARNm et donc de stimuler l'activité transcriptionnelle du gène de la eNOS. Uematsu *et al.* ont été les premiers à montrer que l'application *in vitro* de forces de cisaillement à des cellules endothéliales aortiques bovines ou humaines en culture, augmentait le taux d'ARNm de l'eNOS (Uematsu *et al.*, 1995). Cette augmentation a également été rapportée chez la souris hypercholestérolémique au

niveau de l'aorte (Laufs *et al.*, 2005). Ces résultats ont été confirmés en clinique puisque Hambrecht *et al.* ont relevé une expression de l'ARNm-eNOS augmentée de 96% chez des patients coronariens entraînés pendant 4 semaines par rapport aux patients restés sédentaires (Hambrecht *et al.*, 2003).

En réponse à l'exercice, l'élévation du taux d'ARNm-eNOS est généralement accompagnée d'une sur-expression de la protéine. Cette augmentation de la traduction de la eNOS comme adaptation aux forces de cisaillement est aussi bien décrite chez l'animal à risque cardiovasculaire et l'homme coronarien (Graham & Rush, 2004;Hambrecht *et al.*, 2003;Laufs *et al.*, 2005;Moien-Afshari *et al.*, 2008).

- *Modifications post-traductionnelles*

La eNOS est sujette à de nombreux modes de régulation post-traductionnels (phosphorylation, nitrosylation et acylation) interactifs qui interviennent dans la stimulation ou l'inhibition de l'activité enzymatique (Dudzinski & Michel, 2007). Nous avons vu, dans la première partie de notre revue de littérature, que la phosphorylation de la eNOS via la voie signalétique de l'Akt est un mécanisme-clé de son activation en réponse aux forces de cisaillement. Cependant, si cette voie Akt/eNOS phosphorylée est bien démontrée dans les études *in vitro* réalisées sur des cellules endothéliales en culture, rares sont les études expérimentales à avoir exploré cette voie chez l'animal et l'homme. Tout récemment, Moien-Afshari *et al.* ont montré une augmentation de la forme phosphorylée de l'eNOS dans l'aorte de souris diabétique soumise à un exercice sur tapis roulant pendant 7 semaines (Moien-Afshari *et al.*, 2008). Chez l'homme, seule l'étude de Hambrecht *et al.* a montré, à notre connaissance, une augmentation de l'expression des formes phosphorylées de l'Akt et de la eNOS après 4 semaines d'exercice chez le patient coronarien au niveau de l'artère mammaire interne (Hambrecht *et al.*, 2003).

La stimulation des facteurs transcriptionnels, post-transcriptionnels et traductionnels de la eNOS serait le mécanisme majeur par lequel l'exercice augmente la

production du NO et prévient la dysfonction endothéliale. Néanmoins, les mécanismes à l'origine de la dégradation du NO peuvent également être impliqués.

- Diminution de la dégradation du NO

- *Augmentation des défenses anti-oxydantes*

L'exercice serait capable de stimuler conjointement ou spécifiquement la plupart des enzymes anti-oxydantes comme la superoxide dismutase (Cu/Zn-SOD, Mn-SOD et la SOD extracellulaire), la glutathion peroxidase et la catalase. *In vitro*, l'élévation des forces de cisaillement sur des cellules endothéliales aortiques augmente la quantité d'ARNm de la Gpx (Takeshita *et al.*, 2000). L'exercice stimule les défenses anti-oxydantes chez l'animal présentant un facteur de risque cardiovasculaire. Par exemple, l'étude de Moien-Afshari *et al.* précédemment citée a montré une augmentation significative du taux protéique Cu/Zn SOD aortique chez la souris diabétique entraînée comparativement aux animaux diabétiques sédentaires. Enfin, chez l'homme, une récente étude a observé une augmentation de 24% de l'activité enzymatique de la SOD suite à un protocole d'exercice de 6 mois (Gordon *et al.*, 2008).

Les effets anti-oxydants de l'exercice régulier sont dus non seulement à une augmentation des défenses anti-oxydantes mais aussi à une réduction des enzymes pro-oxydantes.

- *Diminution des enzymes pro-oxydantes*

Parmi les enzymes qui participent au stress oxydant, la NADP(H) oxidase représente la principale source de production d'O₂⁻ dans la paroi vasculaire. Elle se compose de cinq sous-unités majeures, à savoir deux sous-unités membranaires (gp91phox et p22phox) et trois sous-unités cytosoliques (p47phox, p67phox et Rac) (Singh & Jialal, 2006). *In vitro*, les forces de cisaillement appliquées sur des cellules endothéliales humaines de veine ombilicale (HUVEC) diminuent l'expression de la gp91phox et de la p47phox avec une baisse de la production de O₂⁻ (Duerschmidt *et al.*, 2006). Chez l'animal hypertendu, Graham & Rush (2004) ont montré que 6 semaines d'exercice aérobique diminuaient l'expression protéique de la sous-unité gp91phox au niveau de l'aorte. Chez l'homme coronarien entraîné pendant 4 semaines,

Adams *et al.* ont aussi observé une diminution significative des sous-unités gp91phox et p22phox en comparaison aux sujets sédentaires (Adams *et al.*, 2005).

- Autres mécanismes: Système Rénine-Angiotensine (RAS)

Précédemment, nous avons vu que la fixation de l'Ang II sur son récepteur AT1 provoque une vasoconstriction. L'étude de Adams *et al.* citée ci-dessous, montre également que l'exercice peut diminuer de 49% la vasoconstriction de l'artère mammaire en réponse à l'Ang II chez les patients coronariens. Pour expliquer cette observation, ils ont analysé l'expression des récepteurs AT1 et montré une baisse de leur expression. Ces résultats suggèrent une implication possible de l'Ang II et de son récepteur AT1 dans les mécanismes moléculaires protecteurs de l'exercice sur la fonction endothéliale.

2.2.3 Effets sur les autres marqueurs de la dysfonction endothéliale

En plus de l'amélioration de la relaxation endothélium-dépendante, l'exercice affecte également positivement les autres marqueurs de la dysfonction endothéliale cités préalablement. Par exemple, il a été montré, chez des patients diabétiques de type 2, que 6 mois d'exercice en endurance (2 sessions/semaine à intensité modérée) ont abaissé significativement les concentrations plasmatiques de P-sélectine et ICAM-1 (Zoppini *et al.*, 2006) ainsi que les cytokines pro-inflammatoires TNF- α et IL-18 (Kadoglou *et al.*, 2007). De même, chez des patients coronariens et/ou à fort risque cardiovasculaire, 12 semaines d'entraînement en endurance diminuent significativement le taux plasmatique de IL-8 et de MCP-1 respectivement de 21 et 5% (Niessner *et al.*, 2006). Cet effet anti-inflammatoire de l'exercice se retrouve également chez le patient souffrant d'artériopathie des membres inférieurs (Saxton *et al.*, 2008).

Nous venons de montrer le rôle bénéfique de l'exercice sur la fonction/dysfonction endothéliale. L'une des conséquences attendue de ce bénéfice est la prévention/ralentissement du développement de la plaque d'athérosclérose.

2.3 Prévention de l'extension de l'athérosclérose

Les récentes études expérimentales montrent que l'exercice est capable de freiner le développement de l'athérosclérose et même de régresser les lésions pré-existantes chez les animaux/sujets à risque cardiovasculaire.

Par exemple, il est bien démontré que l'exercice diminue la taille des plaques par rapport aux animaux sédentaires (Laufs *et al.*, 2005; Napoli *et al.*, 2004; Shimada *et al.*, 2007). Cet effet préventif de l'exercice sur l'extension de l'athérosclérose a également été observé chez l'homme à risque cardiovasculaire. Par exemple, Meyer *et al.* ont montré que 6 mois d'exercice (3 fois/semaine, 1 heure/séance) prévenaient l'augmentation de l'épaisseur carotidienne de l'intima/média (méthode clinique pour évaluer le développement de l'athérosclérose) observée chez de jeunes sujets obèses comparativement aux sujets avec un poids corporel normal (Meyer *et al.*, 2006).

Notons que l'exercice peut aussi régresser la taille des plaques pré-existantes chez la souris hypercholestérolémique (Ramachandran *et al.*, 2005). La réduction de la sténose coronarienne est également réduite chez le patient coronarien en réponse à l'exercice (Niebauer *et al.*, 1997).

Dernièrement, il a été montré que l'exercice, en plus de ralentir la progression de l'athérosclérose, pouvait également réduire la sévérité des lésions chez la souris hypercholestérolémique avec notamment une diminution du nombre de macrophages dans les plaques (Napoli *et al.*, 2006; Okabe *et al.*, 2007).

2.4 Autres mécanismes

La diminution de la mortalité athéro-thrombotique pourrait également s'expliquer par d'autres mécanismes que ceux relatifs à l'amélioration de la fonction endothéliale et de son bénéfice sur la plaque d'athérome.

L'une des pistes les plus probantes concerne le rôle des cellules endothéliales progénitrices (CEP). Ces dernières sont de véritables marqueurs du risque coronarien puisqu'une récente étude a montré que le nombre de ces cellules est inversement corrélé à la mortalité cardiovasculaire chez les patients coronariens (Werner *et al.*, 2005). Ces

cellules, produites par la moelle osseuse, s'insèrent dans la couche endothéliale du vaisseau et contribuent à sa cicatrisation, à la réparation de l'ischémie et à l'angiogenèse (Zampetaki *et al.*, 2008). Steiner *et al.* ont montré une augmentation des CEP circulants après 12 semaines d'entraînement en course à pied chez des patients coronariens (Steiner *et al.*, 2005).

D'autre part, l'exercice aurait des effets hémostatiques favorables, qui pourraient réduire le risque d'une occlusion artérielle par le thrombus suite à la rupture de plaque. Chez la souris hypercholestérolémique, Pynn *et al.* ont montré que 3 semaines d'exercice, après l'induction d'une rupture de plaque au niveau de la carotide, diminuent significativement la sténose artérielle (Pynn *et al.*, 2004). Ce bénéfice s'accompagne en plus, d'une diminution de l'expression, au sein de la plaque, de certains marqueurs anti-fibrinolytiques tels que le PAI-1. Ces résultats ont été confirmés en clinique. En effet, chez des patients atteints d'artériopathie oblitérante des membres inférieurs, 6 mois d'exercice de marche améliorent significativement l'activité fibrinolytique des sujets caractérisée par une réduction de 23% de l'activité PAI-1 et une augmentation de 28% de l'activité du tPA (Killewich *et al.*, 2004).

OBJECTIFS EXPERIMENTAUX

1. Les objectifs généraux

Au regard de notre synthèse bibliographique, l'exercice prévient la mortalité cardiovasculaire induite par l'athérosclérose chez le sujet/animal à risque cardiovasculaire. Si de nombreux effets athéro-protecteurs de l'exercice ont été proposés, tous ne sont pas connus.

Bien que de nombreuses études aient observé une amélioration de la fonction endothéliale avec l'exercice, sous-entendue une amélioration de l'EDV, l'explication pharmacologique précise des mécanismes vasculaires à l'origine de ce bénéfice reste inconnue. L'objectif de notre premier travail a donc été d'examiner, à partir d'un modèle expérimental d'hypercholestérolémie et d'athérosclérose décrit ci-dessous, quels pouvaient être les mécanismes vasculaires à l'origine de la stimulation de la fonction endothéliale en réponse à l'exercice (est-ce via un plus grand nombre et/ou une plus grande sensibilité des récepteurs muscariniques à l'Ach ? Est-ce via une stimulation des signaux intracellulaires récepteurs-dépendants médiés par l'Ach ? Est-ce via une plus grande sensibilité de la CMLV au GMPc ?...).

D'autre part, si il est effectivement bien démontré dans la littérature que l'exercice inhibe la progression de l'athérosclérose chez l'homme et animal à risque cardiovasculaire, l'effet de l'exercice sur la qualité de la plaque est inconnu alors que la dangerosité de la plaque dépend plus de qualité que de sa quantité (surface). L'objectif de notre deuxième travail a donc été d'examiner si l'exercice pouvait stabiliser la plaque (diminution de la taille du cœur lipidique ? Augmentation de l'épaisseur de la chape fibreuse ? Augmentation du nombre de CMLV et diminution du nombre de macrophages ?...) et si oui, par quel(s) mécanisme(s) moléculaire(s) (est-ce à travers, entre autres, une sur-expression de la voie eNOS phosphorylée Akt-dépendante ?).

Enfin, la question de savoir si l'exercice peut prévenir la plaque instable est l'une des plus importantes en recherche cardiovasculaire puisque, rappelons-le, la rupture de la plaque instable constitue l'événement initiateur majeur des complications cliniques de l'athérosclérose. Or, aucunes données n'existent à ce jour sur ce sujet, notamment par

le fait qu'il n'existe pas de modèle expérimental de plaque instable. Ainsi, dans notre troisième partie, l'objectif principal a été de déterminer si l'exercice pouvait prévenir le développement de la plaque vulnérable. Pour cela, nous avons utilisé un modèle murin de plaque instable (modèle d'hypertension rénovasculaire à rénine et Ang II élevés) généré par l'équipe du Dr Mazzolai (Mazzolai *et al.*, 2004b). Plusieurs mécanismes moléculaires ont été explorés, notamment l'expression des récepteurs AT1 qui médient les effets pro-athérogènes de l'Ang II.

2. Description de notre modèle expérimental: la souris ApoE^{-/-}

La souris ApoE^{-/-} est le modèle expérimental de l'athérosclérose le plus communément utilisé dans la recherche scientifique.

Ce modèle murin a été généré en 1992 par l'équipe du Pr Maeda à partir de la souche C57BL/6, souris saine indemne de tout risque cardiovasculaire (Piedrahita *et al.*, 1992). L'apolipoprotéine E est synthétisée par le foie et les macrophages et possède de nombreuses fonctions anti-athérogènes. En effet, c'est un constituant des lipoprotéines plasmatiques qui sert de ligand pour les récepteurs LDL-r (récepteur des LDL) et LRP (protéine associée au récepteur des LDL). Par conséquent, l'inactivation homozygote du gène de l'apolipoprotéine E chez ces animaux induit une augmentation prononcée de la concentration plasmatique en LDL et VLDL (lipoprotéines de très faible densité) attribuable à l'échec des LDL-r et LRP à éliminer normalement ces particules. Les souris ApoE^{-/-} développent alors spontanément des plaques d'athérome avec un phénotype très semblable aux plaques humaines. Avec un régime normal, les lésions commencent à 5 ou 6 semaines avec l'adhésion et la migration des monocytes sur l'endothélium. Les stries lipidiques apparaissent vers 12 semaines alors que les plaques se développent aux alentours de 20 semaines. Le développement de l'athérosclérose chez ce modèle peut être fortement accéléré par un régime gras, riche en lipides (Kolovou *et al.*, 2008;Zadelaar *et al.*, 2007).

TRAVAUX EXPERIMENTAUX

PREMIERE PARTIE: EXERCICE PHYSIQUE, PREVENTION DES PLAQUES D'ATHEROSCLEROSE ET DE LA DYSFONCTION ENDOTHELIALE CHEZ LA SOURIS APOE^{-/-}

News insights into the vascular mechanisms underlying the beneficial effect of swimming training on the endothelial vasodilator function in apolipoprotein E-deficient mice

Maxime Pellegrin, Alain Berthelot, Christophe Houdayer, Vincent Gaume, Valérie

Deckert, Pascal Laurant

Atherosclerosis 2007 Jan;190(1):35-42 (Impact factor 2007: 4.3)

1. But de l'étude

Le but de cette étude était d'explorer les effets de l'exercice d'une part, sur l'extension des plaques athéromateuses et d'autre part, sur la fonction endothéliale chez la souris apoE^{-/-}.

Nos hypothèses étaient les suivantes : l'exercice ralentit la progression de l'athérosclérose et prévient la dysfonction endothéliale via des mécanismes vasculaires à définir.

2. Méthode

- Les souris apoE^{-/-}, nourries avec un régime enrichi en matière grasse (0.2% cholestérol) ont suivi ou non un protocole de nage pendant 9 semaines (5 fois/semaine ; 50 min/jour). Un groupe de souris normocholestérolémiques C57BL/6 ont été utilisées comme groupe contrôle.

- Evaluation de la taille des plaques au niveau de la racine aortique

- Evaluation de la fonction endothéliale. Etude *in vitro* de la vasorelaxation dépendante et indépendante de l'endothélium, de l'aorte thoracique, en réponse à l'Ach (vasodilatateur récepteur-dépendant, endothélium- et NO-dépendant), au calcium ionophore A23187 (vasodilatateur récepteur-indépendant, endothélium- et NO-

dépendant, agoniste des canaux calciques endothéliaux), au DEA-NONOate (vasodilatateur endothélium-indépendant, donneur exogène de NO) et à la papavérine (vasodilatateur endothélium-indépendant, inhibiteur non spécifique des phosphodiesterases qui inhibent la biodisponibilité du GMPc) (Figure 6). La relaxation maximale (E_{max}) et le pD_2 (indicateur de la sensibilité du vaisseau) sont mesurés pour chaque drogue.

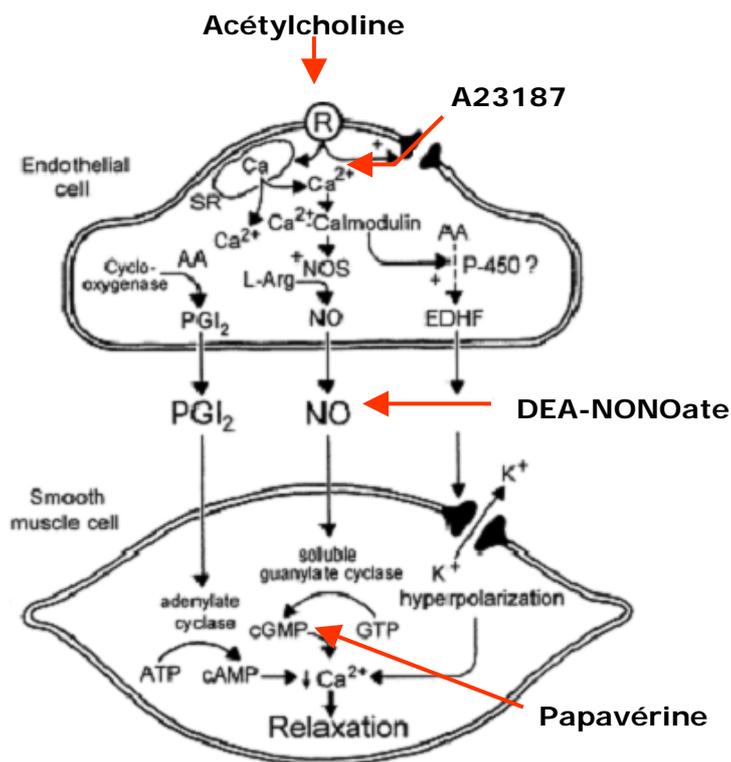


Figure 6. Effets pharmacologiques des différentes drogues (Ach, A23187, DEA-NONOate et papavérine) utilisées pour étudier les effets de l'exercice sur la fonction endothéliale de la souris $apoE^{-/-}$.

3. Résultats principaux et conclusion

- L'exercice a fortement réduit la taille des plaques chez la souris apoE^{-/-}.

- L'exercice prévient l'altération de la vasorelaxation endothélium- et NO-dépendante observée chez les souris apoE^{-/-} sédentaires. Nous apportons pour la première fois une explication pharmacologique aux mécanismes vasculaires qui médient l'amélioration de la fonction endothéliale. L'exercice stimule la fonction endothéliale via :

- 1) Une augmentation de la sensibilité et/ou du nombre des récepteurs (muscariniques) spécifiques à l'Ach.
- 2) Une activation du processus de transduction du signal récepteur-dépendant en réponse à l'augmentation de la sensibilité et/ou du nombre des récepteurs spécifiques à l'Ach avec pour conséquence une stimulation des voies de signalisations intracellulaires à l'origine d'une bioactivité accrue de NO.
- 3) Une augmentation de la sensibilité des CMLV au GMPc.

- L'exercice ne modifie pas le profil lipidique de la souris apoE^{-/-} (cholestérol total, LDL-c, HDL-c et triglycérides). Ce dernier résultat démontre que l'exercice a eu un effet protecteur direct sans modification du facteur de risque cardiovasculaire.

New insights into the vascular mechanisms underlying the beneficial effect of swimming training on the endothelial vasodilator function in apolipoprotein E-deficient mice

Maxime Pellegrin^{a,b,*}, Alain Berthelot^a, Christophe Houdayer^c,
Vincent Gaume^a, Valérie Deckert^d, Pascal Laurant^{a,b}

^a EA 3921 Optimisation Métabolique et Cellulaire, Université de Franche-Comté, UFR Médecine-Pharmacie/STAPS, place Saint Jacques, 25030 Besançon, France

^b Groupe Physiologie et Biologie de la Cellule Sportive, Université de Franche-Comté, France

^c Laboratoire de Biologie du Développement et de la Reproduction, CHU Besançon, France

^d INSERM U498, Faculté de Médecine, BP 87900, 21079 Dijon Cedex, France

Received 25 November 2005; received in revised form 2 February 2006; accepted 2 February 2006
Available online 9 March 2006

Abstract

The antiatherogenic role of exercise is poorly understood. We examined the swimming exercise-induced vascular mechanisms which enhance the endothelial vasodilator function in apoE^{-/-} mice. Male apoE^{-/-} mice treated for 9 weeks with a lipid-rich diet were divided into two groups: the exercise group (apoE^{-/-} X), which underwent a 9-week swimming protocol (50 min/day; 5 days/week) and the sedentary group (apoE^{-/-} S). C57BL/6 mice were used as the control group. Atherosclerotic lesions in the aortic roots were significantly reduced in apoE^{-/-} X compared to apoE^{-/-} S. Relaxation to acetylcholine was improved in apoE^{-/-} X as compared to apoE^{-/-} S and control mice with E_{max} and pD_2 values significantly higher. pD_2 values in response to papaverine were higher in apoE^{-/-} X than in the other groups. Relaxation in response to A23187 and DEA-NONOate were similar. These findings suggest that swimming training may increase the sensitivity of relaxation to acetylcholine, which in turn activates acetylcholine-mediated signaling pathways leading to increased NO bioactivity. Swimming may also prolong the signaling actions of NO by stimulating the sensitivity of vascular smooth muscle cells to cyclic nucleotides. These appear to be the key mechanisms underlying the improvement of the NO-cGMP pathway in exercised apoE^{-/-} mice.
© 2006 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Swimming exercise; Atherosclerotic lesions; Endothelial function; Vascular mechanistic

Endothelial dysfunction is a key early step in the development of atherosclerosis and is also involved in plaque progression and the occurrence of atherosclerotic complications [1]. The hallmark of endothelial dysfunction is impaired endothelium-dependent vasodilatation, which is mediated by NO, a powerful endothelium-derived substance. A defect in NO production or activity has been proposed as a major

mechanism of endothelial dysfunction and a contributor to atherosclerosis [2]. Endothelial function is most commonly assessed as a vasodilator response to various pharmacological agonists. Acetylcholine is the most commonly used agent to assess endothelium-mediated vasodilatation. It acts via muscarinic membrane receptors with signal transduction through G proteins to mediate the release of NO. The NO which is formed diffuses to underlying vascular smooth muscle cells, where it activates guanylate cyclase to produce cyclic GMP from GTP, inducing vascular smooth muscle cell relaxation [3]. Given the various pathophysiological actions of NO, abnormalities could occur at many of the following sites such as: (a) membrane receptors in the arterial wall that

* Corresponding author at: EA 3921 Optimisation Métabolique et Cellulaire, Groupe Physiologie et Biologie de la Cellule Sportive, Université de Franche-Comté, UFR Médecine-Pharmacie/STAPS, place Saint Jacques, 25030 Besançon, France. Tel.: +33 3 81 66 56 68; fax: +33 3 81 66 56 91.
E-mail address: maxime.pellegrin@univ-fcomte.fr (M. Pellegrin).

interact with agonists or physiological stimuli capable of generating NO; (b) NO diffusion from endothelium to vascular smooth muscle cells and (c) interaction of NO with guanylate cyclase and consequent limitation of cyclic GMP production [4]. Because of its important role in atherosclerosis, endothelial dysfunction could be considered as a primary therapeutic target. Exercise is associated with favorable modification of cardiovascular risk factors and directly affects the functional activity of the vascular endothelium [5]. In fact, exercise training plays an important role in managing cardiovascular risk factors, including elevated triglyceride levels, low HDL-cholesterol, hypertension, glucose intolerance and obesity [6]. Improved endothelium- and NO-dependent vasorelaxation after exercise training has been demonstrated in patients with coronary artery disease [7] as well as in hyperlipidemic animals models [8]. However, few studies have examined *in vitro* the vascular reactivity of apolipoprotein E-deficient mice (apoE^{-/-}), which is a very effective and practical model for the study of atherosclerosis [9], after exercise training. To our knowledge, the effect of regular exercise on the vascular sites involved in the NO-mediated pathways has not been previously examined. Therefore, the aim of this present study was to explore the vascular mechanisms which play a role in improving endothelium-dependent vasomotor function in response to swimming exercise in apoE^{-/-} mice.

1. Methods

1.1. Animals and exercise protocol

Seventeen-week-old male C57BL/6J (control) mice and homozygous apolipoprotein E-deficient mice (apoE^{-/-}) were used (Charles Rivers Laboratories, L'Arbresle, France). Animal care and experimental procedures were conducted in compliance with the European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes (European Union Directive 86/609EEC, 1986). ApoE^{-/-} mice were backcrossed to the C57BL/6 genetic background for at least eight generations. Mice were maintained on a 12 h light–dark schedule at 21 °C, and had free access to food and water through the study. After a 3-week period of acclimatization, mice were randomized into three groups and were submitted to experimental protocol for 9 weeks.

- Control group: wild-type mice (C57BL/6J; *n* = 10) on a normal mouse chow (0% cholesterol).
- Sedentary group: apoE-deficient mice (apoE^{-/-} S; *n* = 11) on the lipid-rich Western-type diet containing 0.2% cholesterol (UAR, Epinay-sur-Orge, France) to accelerate the development and progression of spontaneous atherosclerotic lesions [10].
- Exercise group: apoE-deficient mice (apoE^{-/-} X; *n* = 10) on the lipid-rich Western-type diet containing 0.2% cholesterol.

Mice in the exercise group underwent a 9-week endurance swimming program (5 days/week) in water at 35–36 °C. To allow for acclimatization, the length of swimming time was gradually increased, beginning with a 30-min training period at week 1 and ending with a 45-min training period at week 3. During weeks 4–9, mice swam continuously for 50 min. Group training was used as it promotes more vigorous exercise than when mice are allowed to swim alone [11]. Mouse was towel-dried after each training session. At the end of the experimental protocol, mice were anesthetized with sodium pentobarbital injection (60 mg/kg body weight; IP). Blood samples were drawn from the retro-orbital sinus for measurement of lipid analysis.

1.2. *In vitro* vascular study

1.2.1. Vascular rings preparation

After sacrifice, the descending thoracic aorta was rapidly dissected, cleaned from loose connective tissue in the adventitia and immersed in Krebs solution composed of (mM): NaCl 118, KCl 4.7, NaHCO₃ 25, CaCl₂ 2.5, MgSO₄ 1.2, KH₂PO₄ 1.2 and glucose 11; bubbled with a mixture of 95% O₂ and 5% CO₂ at pH of 7.4. Four aortic rings (2–3 mm long) per mouse were studied in parallel (one for each drug studied as described below). The rings were then suspended horizontally between two L-shaped stainless steel hooks in organ chambers which contained 10 ml of Krebs maintained at 37 °C. Isometric tension (g) was measured using a force displacement transducer (F 60 Myograph, Narco-Biosystems) connected to the upper hook. During an equilibration period of 90 min, aortic rings were progressively stretched to their optimal passive tension (2g) as assessed by the response to 100 mM KCl. The rings were then exposed to phenylephrine (10⁻⁷ M). Endothelial integrity was confirmed before the experiment by testing acetylcholine (10⁻⁵ M)-induced relaxation under phenylephrine pre-contracted conditions. After this procedure, the rings were washed and allowed to re-equilibrate to baseline tension for 30 min.

1.2.2. Vasorelaxation studies

Endothelium-dependent relaxation was assessed by cumulative concentration–response curves to acetylcholine (ACh, 10⁻⁹ to 10⁻⁵ M) or calcium ionophore (A23187, 10⁻⁸ to 3 × 10⁻⁵ M) (receptor- and nonreceptor-mediated endothelium- and NO-dependent agonists, respectively). Endothelium-independent relaxation was evaluated by cumulative concentration–response curves for the NO donor diethylamine NONOate diethylammonium salt (DEA-NONOate, 10⁻⁷ to 10⁻⁴ M) and the nonspecific phosphodiesterase inhibitor (papaverine, 10⁻⁸ to 10⁻⁴ M). Relaxation responses to each drug were performed on one distinct aortic rings from each animal which were pre-contracted with the α₁-adrenoreceptor agonist phenylephrine (Phe, 10⁻⁷ M) that induced approximately 80% of the maximal contraction. Relaxation responses to acetylcholine,

A23187, DEA-NONOate and papaverine were expressed as percentages of the contraction to phenylephrine. Maximal relaxation values (E_{\max}) were determined for each individual-response curve by nonlinear regression analysis (SigmaPlot® 8.0). In addition, sensitivity of the vessels to different drugs (pD_2 value) was expressed as negative logarithm of the concentration required to produce half-maximal relaxation.

1.3. Lipid measurements

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

1.4. Histology and quantification of plaque size

Aortic roots were fixed in 4% paraformaldehyde and then embedded in paraffin. They were serially cut into $5\ \mu\text{m}$ sections and processed for light microscopy using standard hematoxylin-eosin staining. For quantitative analysis of atherosclerosis, five sections from each mouse were analyzed. The cross-sectional area of the intima (total area between the lumen and the internal elastic lamina) was measured by using a digitizing morphometry image-analysis system (AnalySIS®). The mean lesion area of five

sections from each mouse ($n=8-10$) was used to calculate the mean lesion area of all mice in each group of animals.

1.5. Skeletal muscle oxidative enzyme activity

Quadricep femoris samples were collected immediately after sacrifice to measure the activity of citrate synthase, a representative inducible mitochondrial enzyme, as an indicator of muscle oxidative capacity. Maximal citrate synthase activity was assayed spectrophotometrically on muscle homogenates as previously described [12].

1.6. Drugs

Acetylcholine hydrochloride, phenylephrine, papaverine and DEA-NONOate were purchased from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France). A23187 came from Acros Organics (Noisy-Le-Grand, France). Drugs were dissolved in distilled water, except for A23187, which was dissolved in DMSO. Drug concentrations were expressed as final molar concentrations in the organ bath.

1.7. Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm S.E.M. Comparisons of single means from multiple groups were made by one-way ANOVA followed by Fisher's protected LSD (least

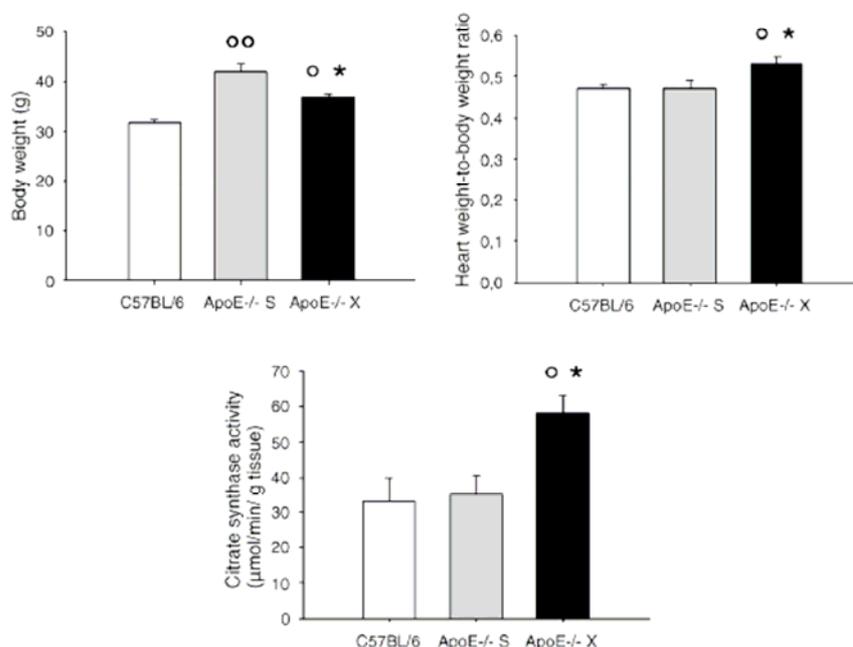


Fig. 1. Physical parameters in C57BL/6 control, in sedentary (apoE^{-/-} S) and exercised (apoE^{-/-} X) mice; $n=10-11$ per group. $^{\circ}p \leq 0.05$; $^{\circ\circ}p \leq 0.001$ vs. control $^*p \leq 0.05$ vs. apoE^{-/-} S.

significant differences). Significance was considered present when probability values were <0.05 .

2. Results

2.1. Quantification of physical activity and lipid levels

ApoE^{-/-} mice (29 weeks old at the end of the experimental protocol) were heavier compared to wild-type C57BL/6 mice (Fig. 1). However, body weight was significantly reduced by 12% in exercised apoE^{-/-} mice compared to sedentary apoE^{-/-} mice ($p < 0.05$; Fig. 1).

Aerobic work capacity may be influenced by cardiac mass. Mice in the training group exhibited greater heart weight-to-body weight ratio as compared to the two other groups (Fig. 1).

To further quantify the level of physical activity, we determined the quadriceps femoris citrate synthase activity in exercised and sedentary mice. Citrate synthase activity was significantly increased in exercised apoE^{-/-} mice (Fig. 1).

ApoE^{-/-} mice demonstrated significantly increased plasma levels of total cholesterol and HDL-cholesterol versus control group (Fig. 2). Plasma triglyceride levels were not significantly different between groups (Fig. 2). Regular physical exercise had no effect on lipid profile.

2.2. Atherosclerotic lesions

Histological examination revealed the absence of atherosclerotic lesions in the aortic roots of C57BL/6 (control) mice, whereas apoE^{-/-} mice developed atheromatous plaques. A significant 87% reduction in aortic root plaque area was observed in exercised as compared to sedentary apoE^{-/-} mice ($5679.6 \mu\text{m}^2 \pm 3445.4$ versus $44337.5 \mu\text{m}^2 \pm 10488.8$; $p < 0.05$).

2.3. Vascular reactivity study

2.3.1. Vascular contractile responses

There was no difference in aortic contraction induced by 100 mM KCl between control group ($1.18 \text{g} \pm 0.07$), sedentary apoE^{-/-} mice ($1.26 \text{g} \pm 0.09$), and exercised apoE^{-/-} mice ($1.25 \text{g} \pm 0.10$). Maximal vascular tensions in response to Phe were similar between the various groups ($0.73 \text{g} \pm 0.04$ in control group versus $0.90 \text{g} \pm 0.06$ in sedentary apoE^{-/-} mice versus $0.74 \text{g} \pm 0.07$ in exercised apoE^{-/-} mice). These findings indicate that myogenic activity of vascular smooth muscle cells was not altered by atherosclerosis or swimming.

2.3.2. Vascular relaxant responses

The endothelium- and NO-dependent relaxation to acetylcholine in apoE^{-/-} mice was markedly impaired as

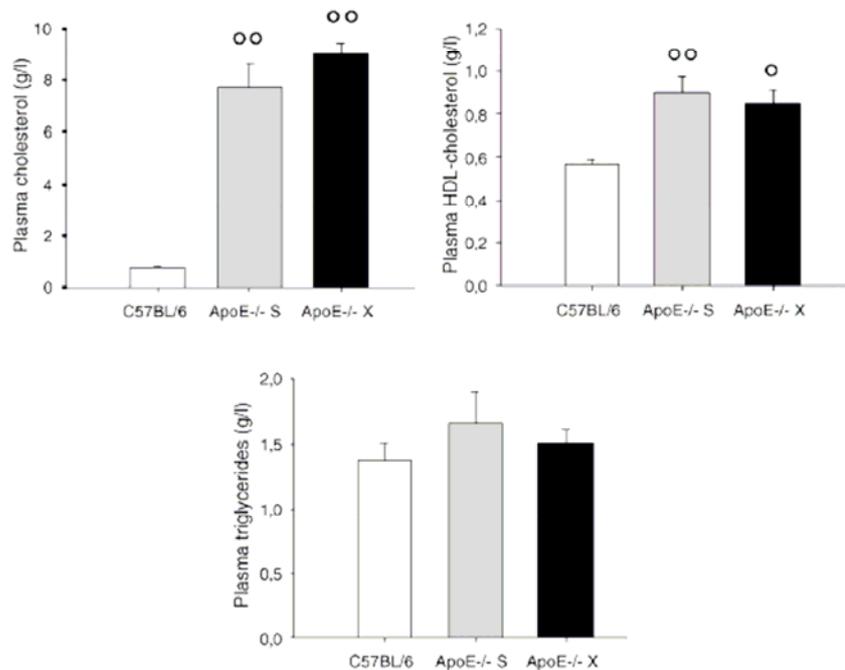


Fig. 2. Lipid profile measured in C57BL/6 control, in sedentary (apoE^{-/-} S) and exercised (apoE^{-/-} X) mice; $n = 10-11$ per group. ° $p \leq 0.05$; °° $p \leq 0.001$ vs. control.

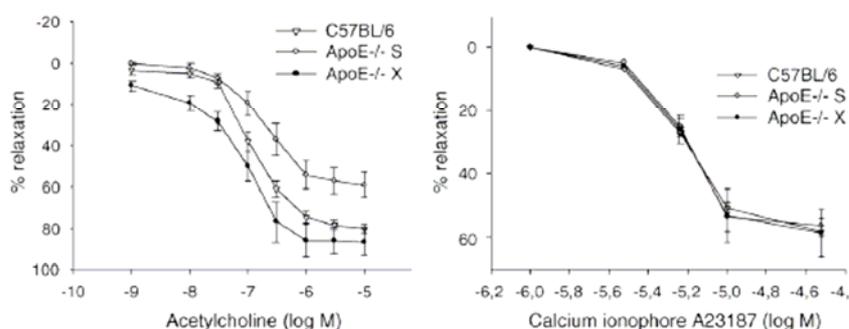


Fig. 3. Cumulative concentration–response curves to acetylcholine and calcium ionophore A23187 in phenylephrine-contracted rings of thoracic aortas from C57BL/6 control, sedentary (apoE^{-/-} S) and exercised (apoE^{-/-} X) mice. Points are mean \pm S.E.M. ($n = 10$ –11 per group).

Table 1

Maximal relaxation (E_{\max}) and pD_2 values to acetylcholine, A23187, DEA-NONOate and papaverine in aortic rings from C57BL/6 control, sedentary (apoE^{-/-} S) and exercised (apoE^{-/-} X) mice

	C57BL/6	ApoE ^{-/-} S	ApoE ^{-/-} X
E_{\max} (%)			
ACh	80.9 \pm 1.3	59.1 \pm 6.9 ^o	86.9 \pm 3.0*
A23187	64.5 \pm 5.1	59.6 \pm 1.9	54.5 \pm 7.3
DEA-NONOate	99.5 \pm 2.4	102.0 \pm 1.7	98.3 \pm 1.8
Papaverine	111.5 \pm 3.3	111.2 \pm 2.9	106.1 \pm 3.2
pD_2			
ACh	6.9 \pm 0.1	6.7 \pm 0.1	7.05 \pm 0.1*
A23187	5.1 \pm 0.1	5.0 \pm 0.1	5.1 \pm 0.1
DEA-NONOate	5.7 \pm 0.1	5.8 \pm 0.1	5.8 \pm 0.1
Papaverine	5.5 \pm 0.1	5.5 \pm 0.1	5.9 \pm 0.1 ^{o,*}

E_{\max} and pD_2 are mean \pm S.E.M. of 10–11 mice per group.

* $p < 0.05$ vs. ApoE^{-/-} S.

^o $p < 0.05$ vs. C57BL/6.

compared to the aortic relaxation of C57BL/6 control mice (Fig. 3). The E_{\max} values were significantly lower ($p < 0.05$) whereas the pD_2 values were not modified (Table 1). In the exercised apoE^{-/-} mice, vasorelaxation induced by acetylcholine was significantly improved with E_{\max} and pD_2 values significantly higher than those in the sedentary group ($p < 0.05$).

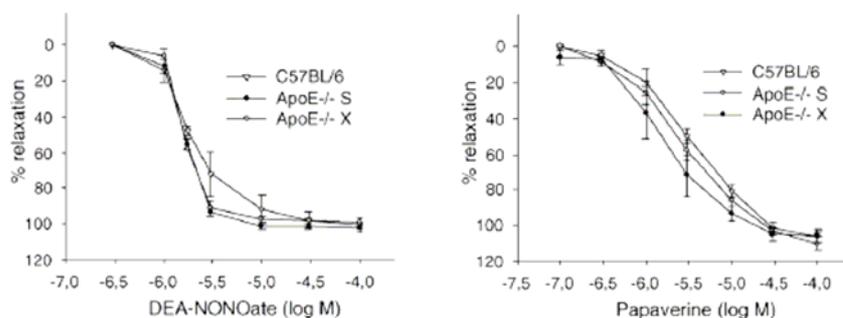


Fig. 4. Cumulative concentration–response curves to DEA-NONOate and papaverine in phenylephrine-contracted rings of thoracic aortas from C57BL/6 control, sedentary (apoE^{-/-} S) and exercised (apoE^{-/-} X) mice. Points are mean \pm S.E.M. ($n = 10$ –11 per group).

A23187 also caused an endothelium- and NO-dependent relaxation; however, no differences were found between the three groups as shown in Fig. 4. The E_{\max} and pD_2 values were similar (Table 1).

Endothelium-independent relaxation to the NO donor DEA-NONOate was also unchanged (Fig. 4). Swimming had no effect on pD_2 or E_{\max} values (Table 1). The concentration–response curve to papaverine slightly and significantly shifted to the left in apoE^{-/-} X mice in comparison to the response observed in apoE^{-/-} S and control mice (Fig. 4). The E_{\max} values to papaverine were similar. The pD_2 values were however greater in aorta from exercised apoE^{-/-} mice (Table 1).

3. Discussion

The present study demonstrated that a 9-week swimming program improved and stimulated the endothelium- and NO-mediated relaxation in response to acetylcholine in apoE^{-/-} mice fed a lipid-rich diet. This vasculo-protective effect was accompanied by a reduction in atherosclerotic lesions.

Swimming exercise reduced atherosclerotic lesion area; this concurs with data of recent studies demonstrating, after 18 weeks of a progressive swimming program [13] or a 12-

week treadmill exercise program [14], a steady regression of atherosclerotic lesions and preexisting lesions in aortas of low-density receptor-deficient mice ($LDLr^{-/-}$) subjected to a high-cholesterol diet. It has also been shown in $apoE^{-/-}$ mice that a 6-week exercise training program reduced neointimal growth and stabilized vascular lesions which developed after injury with ferric chloride, a treatment previously shown to result in lesions that exhibit several histological characteristics similar to human atherosclerotic plaque [15]. These results confirm the preventive and therapeutic action of regular exercise on the structural vascular changes that occur in atherosclerosis.

In the present study, swimming was associated with obvious training adaptations in mice. In accordance with the well-described body mass and cardiac adaptations induced by endurance training, the 9 weeks of swimming decreased mice body weight and induced cardiac hypertrophy. In addition, swimming exercise resulted in an improvement in skeletal muscle capacity as evidenced by increased citrate synthase activity. Our results are in accordance with previous studies demonstrating that in mice swimming exercise programs decrease body weight [13], increase heart weight-to-body weight ratio [16], and improve citrate synthase activity in skeletal muscle [17]. It is generally recognized that skeletal muscle oxidative capacity is increased by exercise training [18]. Therefore, these data indicate that our endurance swimming training is an efficient chronic stimulus to ameliorate muscle oxidative metabolism and to exert the effects of exercise training. It should be noted that swimming training-induced physiological responses in mice were not necessarily observed with other types of exercise such as treadmill exercise [15,19]. Differences in the acute and chronic hemodynamic responses and metabolic adaptations between swimming and treadmill exercise [20] could explain the training-induced conditioning discrepancies. Furthermore, swimming leads to different physical responses and mechanical stresses compared to running, because of the effects of water pressure, utilization of different muscles and reduced effect of gravity.

Plasma cholesterol and HDL-cholesterol levels were remarkably higher in $apoE^{-/-}$ on a lipid-rich Western-type diet than in C57BL/6 control mice whereas there was no difference for triglyceride levels. These observations diverge with those of other groups, such as Barton et al. [21], who observed markedly elevated plasma triglyceride concentrations in 35-week-old $apoE^{-/-}$ treated for 30 weeks with a Western-type diet (0.15% cholesterol). Gervais et al. [22] showed that 30 weeks old $apoE^{-/-}$ mice developed severe hypercholesterolemia and hypertriglyceridemia and had a significantly lower HDL-cholesterol level (-70%) compared with the age-matched control mice. These discrepancies may be related to differences in the age of mice, in the percentage of cholesterol and length of atherosclerotic diet. It is well established that an increase in plasma cholesterol, particularly that associated with LDL, elevates the risk of developing atherosclerosis and that lowering plasma cholesterol can retard or even reverse the progression of atherosclerosis

[23]. Epidemiological studies have also shown that plasma triglycerides strongly correlated with the prevalence and incidence of cardiovascular diseases in univariate analysis [24]. Swimming over a period of 9 weeks did not significantly affect plasma lipid parameters in our study. It has been previously reported that exercise (swimming or treadmill exercise), does not lead to significant changes in lipid profile of either $apoE^{-/-}$ [15,19,25] or $LDLr^{-/-}$ mice [14]. On the contrary, in humans aerobic exercise (12 weeks) results in increased HDL-cholesterol levels with often a reduction in blood total cholesterol, LDL-cholesterol, and triglycerides [26]. Thus, swimming exercise may retard the progression of atherosclerosis in the mouse via direct vascular actions which are independent of blood lipid profile modification.

In subjects with cardiovascular risk factors such as hypercholesterolemia, hypertension or aging, endothelial dysfunction precedes the development of atherosclerosis and predisposes the subjects to the development of atherosclerotic lesions [27]. Our study and those of others [21,28], but not all studies on this subject [29], have demonstrated that endothelium-dependent relaxation to acetylcholine was impaired in the aorta of $apoE^{-/-}$ mice on a Western-type diet. Differences in diet and the age of animals may account for the disagreements between these studies.

Epidemiological data suggest that moderate intensity of physical activity reduces the incidence of clinical cardiovascular events in men and women. Cardioprotective mechanisms of physical activity have been shown to reduce adiposity, blood pressure, diabetes incidence, dyslipidemia, and inflammation, and enhance insulin sensitivity, glycemic control, fibrinolysis, and endothelial function [30]. In $apoE^{-/-}$ mice, Niebauer et al. [19] demonstrated that 4 weeks of treadmill running enhanced endothelial vasodilator function in $apoE^{-/-}$ mice on normal mouse chow but not on a high fat chow. We show for the first time that swimming was able to activate and to improve the endothelium and NO-mediated relaxation in aorta from $apoE^{-/-}$ mice treated with a lipid-rich diet. We can also provide some pharmacological mechanistic insights into the molecular mechanisms underlying the endothelial function, enhanced in response to exercise. Our results showed that pD_2 values to acetylcholine in aorta from exercised $apoE^{-/-}$ mice were higher than in sedentary $apoE^{-/-}$ mice. This finding suggests that swimming improves the sensitivity of the aortic rings to acetylcholine. In addition, our data have demonstrated that swimming improves the impaired E_{max} value in response to acetylcholine. Based on this finding, one might speculate that swimming probably stimulates specific receptor-mediated signal transduction pathways in endothelial cells leading to increased NO bioactivity. Endothelial muscarinic receptor activation by acetylcholine induces an influx of Ca^{2+} into the cytoplasm of the endothelial cell which activates endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and NO synthesis. In patients with coronary heart disease, exercise leads to an improved acetylcholine-mediated vasodilator capacity and this change is closely related to an upregulation

of the eNOS protein and phosphorylation [31]. In animal, whereas treadmill and swimming exercise have been shown to increase eNOS protein expression in the aorta of LDLr^{-/-} mice [13,32], a recent study reported that voluntary running for 12 weeks did not increase NOS activity in apoE^{-/-} mice [33]. In our study, swimming did not enhance vasorelaxation in response to calcium ionophore A23187. Given that A23187 elicits NO release by promoting calcium influx into the endothelium independently of receptor activation, our data indicate that the beneficial effects of exercise on endothelial-dependent relaxation did not extend beyond receptors in this genetic model. Thus, a selective improvement of acetylcholine-induced signaling mechanism rather than a direct increasing eNOS activation could account for the effect of swimming on endothelial-dependent relaxation in apoE^{-/-} mice. Therefore, the beneficial effect of exercise training may be due at least in part to an increased sensitivity of relaxation to muscarinic receptor agonist. Importantly, although it is generally believed that endothelium-dependent relaxation to acetylcholine is primarily mediated by NO [34], other mediators including prostacyclin and endothelium-dependent hyperpolarizing factor (EDHF) have also been proposed [35]. Thus, one cannot exclude that improved relaxation to acetylcholine also occurs via a NO-independent pathway. Relatively normal relaxation in response to the NO donor DEA-NONOate in vessels of exercised mice suggests that exercise did not enhance either responsiveness of vascular smooth muscle cells to NO or changes in activation of soluble guanylyl cyclase and the subsequent formation of cGMP. Finally, a better vasorelaxation in response to the unselective phosphodiesterase blocker papaverine in aorta from apoE^{-/-} X may confirm the effect of swimming in acetylcholine NO-mediated pathway augmentation. Phosphodiesterases are enzymes that catalyze the degradation of the cyclic nucleotide, cGMP, to the inactive corresponding 5' nucleotide monophosphates [36]. Our findings suggest that swimming increased the sensitivity of smooth muscle to relaxation which was most likely mediated by an increase of the intracellular concentration of cGMP, the major intracellular signaling messenger for most smooth muscle relaxation pathways.

As previously mentioned, significant differences between mice and humans in exercise responses, in particular exercise-induced changes in eNOS protein expression, have been observed [31,33 and the present study]. The exercise adaptations discrepancies between mice and humans could be explained by major differences in their cardiovascular system. Thus, the higher heart rate, the smaller arterial pulse pressure and the greater compliance of arteries in mice as compared to humans produce a dramatically different stress across the arterial wall which may influence expression of eNOS and other endothelial genes [37]. Although there are differences in cardiovascular structure and hemodynamics between mice and humans and that no animal model can provide direct insights into human atherosclerotic disease, it may be speculated that the vascular mechanisms responsible for

the enhancement of endothelial function in apoE^{-/-} mice may contribute to the beneficial effects of regular exercise training observed in humans with coronary vascular disease.

In conclusion, the most significant findings of the present study are that regular swimming exercise in apoE^{-/-} mice produces physiological adaptations, prevents the progression of atherosclerotic lesions and may stimulate endothelium-dependent and NO-mediated vasorelaxation. It is suggested that a swimming program probably improves NO-cGMP pathway by increasing the sensitivity of relaxation to acetylcholine, which in turn activates selective acetylcholine-mediated intracellular signaling events leading to increased NO bioactivity. Swimming may also prolong the signaling actions of NO by stimulating the sensitivity of vascular smooth muscle cells to cyclic nucleotides. These data therefore strongly support the important role of physical activity in preventing atherosclerotic cardiovascular disease.

Acknowledgements

The expert technical assistance of Florent Bernardin, Alexandre Bonnet, Delphine Montagnon, Dominique Paris and Chantale Ferniot is gratefully acknowledged. The authors are grateful to Dr. Daniel Albert for the lipid measurements and to Dr. Lucia Mazzolai for critically reading the manuscript.

References

- [1] Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115–26.
- [2] Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* 2004;109:III27–32.
- [3] Kingwell BA. Nitric oxide-mediated metabolic regulation during exercise: effects of training in health and cardiovascular disease. *FASEB J* 2000;14:1685–96.
- [4] Napoli C, Ignarro LJ. Nitric oxide and atherosclerosis. *Nitric Oxide* 2001;5:88–97.
- [5] Dimmeler S, Zeiber AM. Exercise and cardiovascular health: get active to "AKTivate" your endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 2003;107:3118–20.
- [6] Thompson PD. Exercise and physical activity in the prevention and treatment of atherosclerotic cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1319–21.
- [7] Edwards DG, Schofield RS, Lennon SL, et al. Effect of exercise training on endothelial function in men with coronary artery disease. *Am J Cardiol* 2004;93:617–20.
- [8] Woodman CR, Turk JR, Williams DP, Laughlin MH. Exercise training preserves endothelium-dependent relaxation in brachial arteries from hyperlipidemic pigs. *J Appl Physiol* 2003;94:2017–26.
- [9] Knowles JW, Maeda N. Genetic modifiers of atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2336–45.
- [10] Reddick RL, Zhang SH, Maeda N. Atherosclerosis in mice lacking apo E. Evaluation of lesion development and progression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1994;14:141–7.
- [11] Nakao C, Ookawara T, Kizaki T, et al. Effects of swimming training on three superoxide dismutase isoenzymes in mouse tissues. *J Appl Physiol* 2000;88:649–54.

- [12] Srere P. Citrate synthase. *Methods Enzymol* 1969;13:3–5.
- [13] Napoli C, Williams-Ignarro S, De Nigris F, et al. Long-term combined beneficial effects of physical training and metabolic treatment on atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:8797–802.
- [14] Ramachandran S, Penumetcha M, Merchant NK, et al. Exercise reduces preexisting atherosclerotic lesions in LDL receptor knock out mice. *Atherosclerosis* 2005;178:33–8.
- [15] Pynn M, Schafer K, Konstantinides S, Halle M. Exercise training reduces neointimal growth and stabilizes vascular lesions developing after injury in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 2004;109:386–92.
- [16] Kaplan ML, Cheslow Y, Vikstrom K, et al. Cardiac adaptations to chronic exercise in mice. *Am J Physiol* 1994;267:H1167–73.
- [17] Morifuji M, Sakai K, Sanbongi C, Sugiura K. Dietary whey protein downregulates fatty acid synthesis in the liver, but upregulates it in skeletal muscle of exercise-trained rats. *Nutrition* 2005;21:1052–8.
- [18] Siu M, Donley DA, Bryner RW, Alway SE. Citrate synthase expression and enzyme activity after endurance training in cardiac and skeletal muscles. *J Appl Physiol* 2003;94:555–60.
- [19] Niebauer J, Maxwell AJ, Lin PS, et al. Impaired aerobic capacity in hypercholesterolemic mice: partial reversal by exercise training. *Am J Physiol* 1999;276:H1346–54.
- [20] Sturek ML, Bedford TG, Tipton CM, Newcomer L. Acute cardiorespiratory responses of hypertensive rats to swimming and treadmill exercise. *J Appl Physiol* 1984;5:1328–32.
- [21] Barton M, Haudenschild CC, d'Uscio LV, et al. Endothelin ETA receptor blockade restores NO-mediated endothelial function and inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:14367–72.
- [22] Gervais M, Pons S, Nicoletti A, et al. Fluvastatin prevents renal dysfunction and vascular NO deficit in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:183–9.
- [23] Rackley CE. Cardiovascular basis for cholesterol therapy. *Cardiol Rev* 2000;8:124–31.
- [24] Duriez P, Fruchart JC. Recent developments in the treatment of hypertriglyceridemia. *Curr Atheroscler Rep* 1999;1:31–7.
- [25] Niebauer J, Maxwell AJ, Lin PS, et al. NOS inhibition accelerates atherogenesis: reversal by exercise. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;285:H535–40.
- [26] Leon AS, Sanchez OA. Response of blood lipids to exercise training alone or combined with dietary intervention. *Med Sci Sports Exerc* 2001;33:S502–15.
- [27] Flavahan NA. Atherosclerosis or lipoprotein-induced endothelial dysfunction. Potential mechanisms underlying reduction in EDRF/nitric oxide activity. *Circulation* 1992;85:1927–38.
- [28] Deckert V, Lizard G, Duverger N, et al. Impairment of endothelium-dependent arterial relaxation by high-fat feeding in ApoE-deficient mice: toward normalization by human ApoA-I expression. *Circulation* 1999;100:1230–5.
- [29] Villeneuve N, Fortuno A, Sauvage M, et al. Persistence of the nitric oxide pathway in the aorta of hypercholesterolemic apolipoprotein-E-deficient mice. *J Vasc Res* 2003;40:87–96.
- [30] Bassuk SS, Manson JE. Physical activity and cardiovascular disease prevention in women: how much is good enough? *Exerc Sport Sci Rev* 2003;31:176–81.
- [31] Hambrecht R, Adams V, Erbs S, et al. Regular physical activity improves endothelial function in patients with coronary artery disease by increasing phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 2003;107:3152–8.
- [32] Meilhac O, Ramachandran S, Chiang K, Santanam N, Parthasarathy S. Role of arterial wall antioxidant defense in beneficial effects of exercise on atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1681–8.
- [33] Laufs U, Wassmann S, Czech T, et al. Physical inactivity increases oxidative stress, endothelial dysfunction, and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:809–14.
- [34] Faraci FM, Sigmund CD. Vascular biology in genetically altered mice: smaller vessels, bigger insight. *Circ Res* 1999;85:1214–25.
- [35] Busse R, Edwards G, Feletou M, et al. EDHF: bringing the concepts together. *Trends Pharmacol Sci* 2002;23:374–80.
- [36] Francis SH, Turko IV, Corbin JD. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: relating structure and function. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 2000;65:1–52.
- [37] Peng X, Halder S, Deshpande S, Irani K, Kass DA. Wall stiffness suppresses Akt/eNOS and cytoprotection in pulse-perfused endothelium. *Hypertension* 2003;41:378–81.

DEUXIEME PARTIE: EXERCICE PHYSIQUE, QUALITE / STABILITE DE LA PLAQUE ET VOIE AKT-eNOS PHOSPHORYLEE

Long-term exercise stabilizes atherosclerotic plaque in apolipoprotein-E deficient mice

Maxime Pellegrin, Carole Miguet-Alfonsi, Karima Bouzourene, Jean-François Aubert, Valérie Deckert, Alain Berthelot, Lucia Mazzolai, Pascal Laurant

Publication soumise dans Medicine & Science in Sports & Exercise

(impact factor 2007: 2.9)

1. But de l'étude

Le but de cette étude était d'étudier les effets de l'exercice sur la qualité/stabilité de la plaque.

Nous supposons que l'exercice est capable de stabiliser la plaque athéromateuse. Nous supposons également que l'augmentation de l'expression de la phosphorylation de la eNOS Akt-dépendante pourrait expliquer, en partie, ce bénéfice.

2. Méthode

- Les souris apoE^{-/-}, nourries avec un régime riche gras (0.2% cholestérol) ont suivi ou non un protocole de nage de longue durée pendant 6 mois (5 fois/semaine ; 50 min/jour).

- Quantification de la taille et de la morphologie des plaques au niveau du sinus aortique. Evaluation de plusieurs caractéristiques de la plaque (surface du noyau lipidique, épaisseur de la chape fibreuse, présence d'une dégénérescence de la média, présence de cellules spumeuses en-dehors du noyau lipidique, contenu en CMLV et macrophages) par des méthodes morphométriques et immunohistochimiques.

- Exploration de la voie Akt-eNOS phosphorylée au niveau de l'aorte. Quantification de l'expression des protéines eNOS, eNOS phosphorylée sur la sérine en position 1177 (p-eNOS), Akt et Akt phosphorylée sur la sérine en position 473 (p-Akt) par des techniques de western blot.

3. Résultats principaux et conclusion

- L'exercice de longue durée améliore la qualité/stabilité des plaques principalement en augmentant le nombre de CMLV et en diminuant le nombre de macrophages dans la plaque.

- L'exercice ne modifie pas le taux protéique aortique de eNOS, p-eNOS, Akt et p-Akt ce qui suggère que la voie Akt-eNOS phosphorylée n'est pas le mécanisme moléculaire majeur à l'origine du bénéfice de l'exercice de longue durée sur la stabilité de la plaque. D'autres mécanismes doivent donc être impliqués, notamment ceux relatifs au stress oxydant. Pour cela, nous avons déterminé le taux protéique des sous-unités p47phox et p67phox de la NADPH oxidase. Nos résultats montrent que l'exercice ne module pas l'expression de ces protéines.

Long-term exercise stabilizes atherosclerotic plaque in apolipoprotein-E deficient mice

Maxime Pellegrin^{a,b,c}, Carole Miguet-Alfonsi^{a,b}, Karima Bouzourene^c, Jean-François Aubert^c, Valérie Deckert^d, Alain Berthelot^a, Lucia Mazzolai^c, Pascal Laurant^{a,b}

^aEA-4267/2SBP, University of Franche-Comté, Besançon, France

^bExercise Prevention Innovation and Technico-Sporting Watching Department

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

^dINSERM U866, Faculty of medicine, University of Bourgogne, Dijon, France

Abbreviated title for the running head: Exercise stabilizes atherosclerotic plaque

Corresponding author:

Maxime PELLEGRIN

Service of Vascular Medicine. CHUV

Av. Pierre Decker 5, 1011 Lausanne, Switzerland

Phone number : +41213140758

Fax number : +41213140761

E-mail: Maxime.Pellegrin@chuv.ch

Number of words: 4110 (with bibliography and figure legends); Abstract: 189 words

Number of tables and figures: 5

ABSTRACT

Exercise is known to reduce cardiovascular mortality. However, the precise mechanisms are still unknown. Because atherosclerotic plaque destabilization and rupture leads to dramatic cardiovascular events, stabilization of plaque might be regarded as an important goal of an exercise preventive therapy. The present study examined the plaque-stabilizing effect of long-term exercise in experimental atherosclerosis using Apolipoprotein E-deficient mice (ApoE^{-/-}). ApoE^{-/-} mice were subjected to 6-month swimming exercise. A group of sedentary animals were used as controls. Morphometry and characteristics of atherosclerotic plaque stability were assessed in aortic sinus by immunohistochemistry. Aortic levels of total protein kinase Akt (protein kinase B), phosphorylated Akt at Ser⁴⁷³ (p-Akt), total eNOS (endothelial Nitric Oxide Synthase) and phosphorylated eNOS at Ser¹¹⁷⁷ (p-eNOS) were assessed by western blotting. Exercised mice developed a more stable plaque phenotype as shown by decreased macrophage and increased smooth muscle cell content. Protein expressions of Akt, p-Akt, eNOS and p-eNOS were not modulated by exercise. Long-term exercise promotes plaque stability in ApoE^{-/-} mice. These results may explain the clinical benefits of exercise in terms of cardiovascular disease protection. The Akt-mediated eNOS phosphorylation pathway appears not to be the primary molecular mechanism.

Key words: Atherosclerosis, Long-term exercise, Plaque stability, Akt-mediated eNOS phosphorylation

Atherosclerosis, a complex multifactorial chronic disease, represents a major health burden in modern society. It is now widely recognized that atherosclerotic plaque destabilization and rupture leads to dramatic clinical events such as unstable angina, acute myocardial infarction or stroke. For these reasons, identification of novel therapies contributing to plaque stabilization represents a continuing challenge for the medical community.

Regular exercise has been broadly accepted as a deterrent for atherosclerosis and cardiovascular disease (1-3, 6). In particular, exercise has been shown to reduce progression of atherosclerosis in patients with coronary artery disease (CAD) (19). Similarly, we and others have shown that regular exercise exerts beneficial effect on atherosclerosis extension in a variety of animal models (14, 18, 21, 23). Experimental as well as observational data indicate that exercise reduces adiposity, blood pressure, diabetes incidence, dyslipidemia, and inflammation (1, 2). Moreover, it enhances insulin sensitivity, glycemic control, fibrinolysis and endothelial function (1, 2). Although these favourable effects on atherosclerotic and thrombotic-related risk factors may slow the progression of atherosclerosis, there are too insignificant to account for the training-induced reduction in mortality in patients with cardiovascular risk or with established clinical atherosclerosis. Because plaque destabilization is a predictor of fatal atherothrombotic events, stabilization of plaque might be regarded as a primary target of an exercise preventive therapy. However, there is no report investigating whether exercise may modulate plaque composition promoting plaque stability.

In the present study, we examined the plaque-stabilizing effect of long-term exercise in experimental atherosclerosis using Apolipoprotein E-deficient mice (ApoE^{-/-}) mice.

MATERIALS AND METHODS

Animals. Male ApoE^{-/-} mice (10-11 weeks old at the beginning of the experiment) were obtained from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France). During the experimental protocol, all animals were fed a lipid-rich Western-type diet containing 0.2% cholesterol (UAR, Epinay-sur-orge, France). Mice were randomly divided into sedentary (ApoE^{-/-} S ; n = 8) and exercise groups (ApoE^{-/-} X ; n = 8). The housing and care of the animals and all experimental procedures were conducted in compliance with the European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes (European Union Directive 86/609EEC, 1986).

Exercise protocol. The swimming exercise training protocol was adapted from a previously published procedure (23). Briefly, mice in the exercise group were trained 50 min/day, 5 days/week for 24 weeks in water at 35-36°C. Mice were allowed to swim in groups of four. The animals were progressively familiarized with swimming during the first week, beginning with a 10-min training period on day 1 and ending with a 50-min training period on day 5, the swimming time increased of 10 min every day. During weeks 2 to 24, mice swam continuously 50 min/day. All training sessions took place during the early morning hours (8:00-10:00). After all the training, wet animals were carefully dried and placed in a warm environment to avoid additional cold physiological stress and health problems.

Quantification and morphology of plaques. The heart was fixed in formol, dehydrated, and paraffin embedded. Serial sections (3 µm thick) obtained between the appearance and disappearance of the aortic valve were analyzed by light microscopy for the identification and quantification of plaques after staining with Movats pentachrome. Pictures of the 3

middle sections of the biggest atherosclerotic plaque from each mouse were taken with a digital camera (Coolpix, Nikon, Düsseldorf, Germany) and plaque area was quantified in square millimeters by computerized planimetry using the Qwin software (Leica systems, Wetzler, Germany). The preceding and following 3 μm -thick sections were used for immunohistochemistry. An independent investigator blinded to the study protocol evaluated each section under a light microscopy using the morphometry software Qwin. The following characteristic plaque features were evaluated: 1) quantification of fibrous cap thickness; 2) quantification of α -smooth muscle (SM) actin content; 3) quantification of central core (a large core was defined as occupying > 50% of total surface plaque); 4) presence of media degeneration (invasion of media by plaque components, media thinning, elastic laminae rupture and media atrophy); 5) presence of layering /foam cells above or adjacent to the central core); 6) plaque macrophage content quantification (17).

Immunohistochemical analysis. Fixed and paraffin-embedded sections were stained with a biotinylated mouse monoclonal IgG2a α -SM actin antibody or with a rat monoclonal Mac-2 antibody (Cedarlane, Hornby, Ontario, Canada). Staining of sections with specific antibodies was followed by treatment with streptavidin-peroxidase complex (Dako, Glostrup, Denmark). Peroxidase activity was revealed with 3-amino-9-ethylcarbazole (Sigma-Aldrich, St. Louis, MS, USA). Slides were counterstained with hematoxylin (for α -SM actin). Appropriate controls with mouse or rat IgG with irrelevant specificities at the concentrations of the primary antibodies were included. Samples were observed with a photomicroscope and pictures were acquired with a high sensitivity color digital camera (Leica DC Camera, Leica systems, Wetzler, Germany). α -SM actin and Mac-2 positive areas were quantified in each sample by means of the Qwin morphometry software (17).

Protein extraction and Western blot analysis. The expression of total eNOS (endothelial Nitric Oxide Synthase), eNOS phosphorylation at Ser¹¹⁷⁷, (p-eNOS), total Akt (also called protein kinase B), Akt phosphorylation at Ser⁴⁷³ (p-Akt), PECAM-1, p47phox and p67phox were assessed by western blotting. Total cellular proteins were extracted from mouse aorta in Ripa buffer (150 mM NaCl, 50 mM TrisHCL pH8, 0.1 % SDS, 0.5 % Na desoxycholate) containing a mixture of protease inhibitors (Sigma-Aldrich, St. Louis, MS, USA) and phosphatase inhibitors (2 mM Na orthovanadate). After 30 min of incubation at 4°C in lysis buffer, tissue and cell debris were eliminated by 30 min centrifugation at 10 000 x g, and supernatant was collected. Protein concentrations were measured by using a Biorad protein assay (Biorad, Marnes-la-Coquette, France). Thirty to 50 µg of protein were incubated in loading buffer (125 mM Tris-HCl, pH6.8, 10% β-mercaptoethanol, 4.6% SDS, 20% glycerol and 0.003% bromophenol blue), boiled for 3 min, separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and electroblotted onto polyvinylidene difluoride membrane (PerkinElmer, Massachusetts, USA). After blocking nonspecific binding sites overnight with 5% nonfat milk in TPBS (PBS, 0.1% Tween 20), membranes were incubated for 2 hours at room temperature with various primary antibodies: rabbit polyclonal antibodies directed against total eNOS diluted 1:200 (Santa Cruz Biotechnology, California, USA), against p-eNOS diluted 1/200 (Santa Cruz Biotechnology), against β-actin diluted 1/200 (Santa Cruz Biotechnology), against p67-phox diluted 1/200 (Santa Cruz Biotechnology), against p47-phox diluted 1/200 (Santa Cruz Biotechnology), mouse monoclonal antibodies directed against total Akt diluted 1/1000 (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA), against p-Akt diluted 1/1000 (Upstate Biotechnology), and against PECAM-1 diluted 1/200 (Santa Cruz Biotechnology); all antibodies were diluted in TPBS. After three washes in TPBS, membranes were incubated

with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse (Santa Cruz Biotechnology) or anti-rabbit antibody (Interchim, Montluçon, France) for 1 h at room temperature, and washed three times in TPBS. Autoradiography of immunoblots was performed using an enhanced chemoluminescence detection kit (Santa Cruz Biotechnology). The band intensities were quantified by densitometry using a Biorad image analysis system (Quantity one, Biorad), and normalized against the β -actin protein. Each experiment was repeated three times with each animal.

Lipid measurements. Blood samples from 4 h fasting mice were collected in heparin-containing test tubes. Plasmas were obtained by slow-speed centrifugation and stored at -80°C until analysis. All assays were performed on a Victor 1420 Multilabel Counter (Wallac-PerkinElmer Life Sciences). Commercially available kits were used for the determination of phospholipids (Wako), total cholesterol (Diasys) and triglycerides (Diasys) in plasma. For HDL- and non HDL-cholesterol determination, 10 μ l of plasma were mixed with 190 μ l of potassium bromide solution adjusted to a density of 1.07 g/ml. After a 5h, 100 000 rpm run in a TLA120 rotor in a TLX ultracentrifuge (Beckman), HDL-cholesterol content was assayed in the supernatant (100 μ l), and non-HDL cholesterol content was measured in the infranatant (100 μ l).

Muscle oxidative enzyme activity. Citrate synthase activity, a marker of mitochondrial content, was measured in gastrocnemius muscle homogenates using spectrophotometric method as previously described (23).

Statistical analysis. Data were expressed as mean \pm SEM. Student's t-test was used to assess significant differences. Probability value of <0.05 was considered to be statistically significant.

RESULTS

Efficacy of the swimming exercise program.

Body weights and relative heart weights at the end of the swimming program are shown in Table 1. In accordance with the well-described body mass and cardiac adaptations induced by endurance training, the 24-week swimming exercise decreased mice weight and increased the relative heart weight ($p < 0.05$). Training program resulted in a significantly improved skeletal muscle oxidative capacity ($p < 0.05$) as evidenced by increased citrate synthase activity (Table 1). These results suggest that exercised mice exhibit physiological effects of exercise training.

Swimming did not cause significant changes in plasma total cholesterol, HDL-cholesterol, non HDL-cholesterol, triglycerides and phospholipids levels (Table 1).

Effect of swimming exercise on size and stability of plaques.

Quantification of atherosclerotic lesion areas in aortic roots showed that 24-week swimming exercise significantly decreased by $\approx 30\%$ the progression of atherosclerotic lesions ($p < 0.05$; Figure 1).

In addition to the effect of swimming exercise on lesion size, we also assessed characteristics of plaque stability. Surface of central lipid core and signs of media degeneration were similar in exercised compared with sedentary mice. Presence of fibrous cap ensures a certain degree of stability, whereas its loss is associated with plaque rupture. In addition, mixed multiple cells layers at different stages are suggested to be the consequence of previous clinically silent ruptures and after de novo plaque growth.

Swimming exercise was associated with a slight, but not significant, increase in fibrous cap thickness and a decrease in layering. Plaque-stabilizing changes in lesions include reduced macrophage and increased SMC content (24). As shown in Figure 2A and 2B, macrophage

content, determined by Mac-2 immunostaining, was considerably decreased in lesions from exercised mice ($p < 0.05$) compared with sedentary ones. Long-term exercise significantly increased by $\approx 58\%$ SMC plaque content, determined by α -SM actin staining (Figure 2C and 2D).

Effect of swimming exercise on eNOS, p-eNOS- Ser¹¹⁷⁷, Akt, p-Akt- Ser⁴⁷³, and PECAM- 1 expression.

Exercise-induced increase of vascular eNOS expression and of eNOS-Ser¹¹⁷⁷ phosphorylation through the protein kinase Akt might be an important and potentially vasoprotective effect of exercise training (9). To investigate underlying molecular mechanisms of long-term exercise in our mouse model, we analysed the aortic contents of eNOS, p-eNOS on Ser¹¹⁷⁷, Akt, and p-Akt on Ser⁴⁷³ in mice by Western blotting.

Expression of total eNOS in exercised mice did not differ significantly from that of sedentary animals (Figure 3A). There was no significant difference in the protein levels of eNOS phosphorylation at Ser¹¹⁷⁷ among the sedentary and exercised groups (Figure 3B). Along the same line, protein levels of Akt and Akt phosphorylation at Ser⁴⁷³ were similar in sedentary and exercised ApoE^{-/-} mice (Figure 3C and 3D).

Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) has been shown to modulate Akt and eNOS activation in endothelial cells in response to shear-stress (4). Therefore, we quantified the protein level of PECAM-1. We found that exercise did not modulate PECAM-1 expression in ApoE^{-/-} mice (data not shown).

Effect of swimming exercise on expression of prooxidant NAD(P)H oxidase subunits p47phox and p67phox .

We next investigated whether the observed antiatherosclerotic effect of long-term exercise was mediated by changes in prooxidant NAD(P)H oxidase subunits protein levels. For this purpose, we assessed the protein expression of p47phox and p67phox subunit of the NAD(P)H oxidase. Translocation of the cytosolic regulatory subunits p47phox and p67phox to the plasma membrane is a prerequisite for NADPH oxidase activation, the major source of reactive oxygen species (ROS) in the circulatory system (26). Western blot analysis revealed that expression level of p47phox and p67phox subunits remain unchanged between exercised and sedentary mice (Figure 4).

DISCUSSION

Our results show for the first time, in a mouse model of atherosclerosis, that long-term exercise can stabilize atherosclerotic plaques.

Regular exercise is known to reduce cardiovascular mortality in humans with cardiovascular risk factors (10, 16) or with CAD (28). Despite the established role of exercise in primary and secondary prevention of CAD, the mechanism responsible for this mortality benefit have not yet been clearly defined. Here, we hypothesized that long-term exercise may directly alter plaque composition and increase plaque stability. Our results showed that 6-month exercise retards further progression of atherosclerosis in sedentary ApoE^{-/-} mice fed a lipid-rich diet independently of blood lipid modifications. Reduction of atherosclerosis progression secondary to exercise has been previously shown in ApoE^{-/-} mice (14, 21, 23). However, this effect was observed only in response to medium-term exercise (6-9 weeks) (14, 21, 23). Our data provide first evidence that long-term exercise is equally effective to prevent atherosclerosis extension. More importantly, exercised mice

developed a more stable plaque phenotype as shown by decreased macrophage and increased SM cell. This suggests that the improvement of plaque stability with exercise, if confirmed in clinical studies, might be a key patho-physiologic mechanism contributing to exercise-mediated reduction in morbidity and mortality in patients with cardiovascular risk since atherosclerotic plaque destabilization and rupture leads to dramatic cardiovascular events as above mentioned. Reduction of macrophage plaque content, also shown in ApoE^{-/-} mice undergoing a 8-week swimming exercise (21), indicates that the vasculoprotective effect of exercise, and in particular swimming, may be mediated, at least in part, by a reduction in inflammation. In support of this notion, a clinical study recently showed that exercise training reduces circulating inflammatory markers in subjects at risk of coronary events (20). Furthermore, we show herein that swimming exercise induces increased SM cell plaque content. Augmented SM cell content favours plaque stabilization since SM cell produce extracellular matrix which is responsible for plaque mechanical strength. On the contrary, loss of SM cell can be detrimental for plaque stability (13). Our data suggest that swimming exercise may promote the migration of SM cells from medial to intimal region or may inhibit SM cell apoptosis, leading to increased SM cell number and improved plaque stability. Clearly, further studies are needed to address this point.

To elucidate the molecular mechanism involved in the exercise-induced plaque stabilization, we investigated the Akt-dependent eNOS phosphorylation pathway. Exercise is a powerful stimulus to increase blood flow and shear stress in vascular beds which in turn up-regulates eNOS expression leading to increased vascular nitric oxide (NO) production, a known antiatherogenic molecule (29). Exercise-mediated increase of eNOS expression and eNOS-Ser¹¹⁷⁷ phosphorylation through protein kinase Akt (protein kinase B) is most likely an important vasoprotective mechanism of exercise. In fact, Hambrecht et al. have recently demonstrated in patients with CAD that 4 weeks of regular aerobic

exercise improves vascular function through shear stress-induced/Akt-dependent eNOS phosphorylation on Ser¹¹⁷⁷ (9). More recently, studies have also shown that 8-10 weeks of swim training stimulates this pathway in myocardium of healthy rats (11, 30). However, to our knowledge, there is no report investigating whether exercise may modulate this protective pathway in experimental atherosclerosis. Interestingly, our results indicate that a 6-month swimming program did not change expression of Akt, eNOS and phosphorylations of Ser⁴⁷³-Akt and Ser¹¹⁷⁷-eNOS in the aorta of ApoE^{-/-} mice. It is well-recognized that short and medium-term exercise increase vascular eNOS protein levels in various animal models (5, 7, 14, 27). The lack of adaptation in arterial eNOS levels observed in response to long-term exercise reported here is not since also in previous experiments no change in eNOS protein expression was found after 3 to 5 months of regular exercise (15, 22, 25). This confirms a recent hypothesis suggesting that exercise-induced elevations in eNOS protein expression may be a transient molecular adaptation that occurs in the early phase of exercise and may not persist within months of training (8). Likewise, our results showed for the first time that long-term exercise did not increase posttranscriptional modification of eNOS as evidenced by absence of upregulation of eNOS phosphorylation on Ser¹¹⁷. Thus, it appears that the Akt-dependent eNOS phosphorylation pathway is not the primary molecular mechanism contributing to the beneficial effects of long-term exercise on plaque stability in our mouse model. Alternative mechanisms should also be considered.

We next addressed the possible modulation of prooxidant NAD(P)H oxidase subunits p47phox and p67phox in response to exercise in our experimental model. NAD(P)H oxidase subunits p47phox and p67phox represent a major source of ROS and oxidative stress in the vasculature (26). We found that expression of p47phox and p67phox subunits in the aorta of our exercised ApoE^{-/-} mice was not different from sedentary

animals. On the contrary, Laufs and al. showed that expression of these two subunits was reduced after 6 weeks of voluntary cage wheel exercise in C57BL/6 mice (14). Differences in mouse models and exercise duration could explain these discrepancies. In accordance with our study, a recent clinical trial showed that exercise did not modify the degree of systemic oxidative stress (evaluated by measuring plasma 8-isoprostane) in humans (12). Thus, modulation of prooxidant p47phox and p67phox NAD(P)H oxidase subunits may not account for the antiatherosclerotic benefits of long-term exercise in ApoE^{-/-} mice.

In conclusion, results reported here emphasize for the first time the pivotal role of long-term exercise in atherosclerosis plaque stabilization in ApoE^{-/-} mice. These findings may explain the clinical benefits of long-term exercise in terms of cardiovascular event protection. The Akt-dependent eNOS phosphorylation pathway does not seem to be the primary molecular mechanism responsible for the plaque-stabilizing effect of long-term exercise.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr Isabelle Jallat-Dalloz, Chantal Ferniot and Dominique Paris for their help.

DISCLOSURES

Authors report no conflicts of interest.

REFERENCES

1. Bassuk SS and Manson JE. Physical activity and the prevention of cardiovascular disease. *Curr Atheroscler Rep* 5: 299-307, 2003.
2. Bassuk SS and Manson JE. Epidemiological evidence for the role of physical activity in reducing risk of type 2 diabetes and cardiovascular disease. *J Appl Physiol* 99: 1193-1204, 2005.
3. Casillas JM, Gremeaux V, Damak S, Feki A and Perennou D. Exercise training for patients with cardiovascular disease. *Ann Readapt Med Phys* 50: 403-402, 2007.
4. Fleming I, Fisslthaler B, Dixit M and Busse R. Role of PECAM-1 in the shear-stress-induced activation of Akt and the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in endothelial cells. *J Cell Sci* 118: 4103-4111, 2005.
5. Fukai T, Siegfried MR, Ushio-Fukai M, Cheng Y, Kojda G and Harrison DG. Regulation of the vascular extracellular superoxide dismutase by nitric oxide and exercise training. *J Clin Invest* 105: 1631-1639, 2000.
6. Gaesser GA. Exercise for prevention and treatment of cardiovascular disease, type 2 diabetes, and metabolic syndrome. *Curr Diab Rep* 7: 14-19, 2007.
7. Graham DA and Rush JW. Exercise training improves aortic endothelium-dependent vasorelaxation and determinants of nitric oxide bioavailability in spontaneously hypertensive rats. *J Appl Physiol* 96: 2088-2096, 2004.
8. Green DJ, Maiorana A, O'Driscoll G and Taylor R. Effect of exercise training on endothelium-derived nitric oxide function in humans. *J Physiol* 561: 1-25, 2004.
9. Hambrecht R, Adams V, Erbs S, Linke A, Krankel N, Shu Y, Baither Y, Gielen S, Thiele H, Gummert JF, Mohr FW and Schuler G. Regular physical activity improves endothelial function in patients with coronary artery disease by increasing phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 107: 3152-3158, 2003.
10. Hu G, Eriksson J, Barengo NC, Lakka TA, Valle TT, Nissinen A, Jousilahti P and Tuomilehto J. Occupational, commuting, and leisure-time physical activity in relation to total and cardiovascular mortality among Finnish subjects with type 2 diabetes. *Circulation* 110: 666-673, 2004.
11. Iemitsu M, Maeda S, Jesmin S, Otsuki T and Miyauchi T. Exercise training improves aging-induced downregulation of VEGF angiogenic signaling cascade in hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291: H1290-H1298, 2006.
12. Kelly AS, Steinberger J, Olson TP and Dengel DR. In the absence of weight loss, exercise training does not improve adipokines or oxidative stress in overweight children. *Metabolism* 56: 1005-1009, 2007.
13. Kockx MM and Knaapen MW. Pathological changes in the coronary arteries in the acute coronary syndromes. *Heart* 92: 1557-1558, 2006.

14. Laufs U, Wassmann S, Czech T, Munzel T, Eisenhauer M, Bohm M and Nickenig G. Physical inactivity increases oxidative stress, endothelial dysfunction, and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 809-814, 2005.
15. Laughlin MH, Pollock JS, Amann JF, Hollis ML, Woodman CR and Price EM. Training induces nonuniform increases in eNOS content along the coronary arterial tree. *J Appl Physiol* 90: 501-510, 2001.
16. Leitzmann MF, Park Y, Blair A, Ballard-Barbash R, Mouw T, Hollenbeck AR and Schatzkin A. Physical activity recommendations and decreased risk of mortality. *Arch Intern Med* 167: 2453-2460, 2007.
17. Mazzolai L, Duchosal MA, Korber M, Bouzourene K, Aubert JF, Hao H, Vallet V, Brunner HR, Nussberger J, Gabbiani G and Hayoz D. Endogenous angiotensin II induces atherosclerotic plaque vulnerability and elicits a Th1 response in ApoE^{-/-} mice. *Hypertension* 44: 277-282, 2004.
18. Meilhac O, Ramachandran S, Chiang K, Santanam N and Parthasarathy S. Role of arterial wall antioxidant defense in beneficial effects of exercise on atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21: 1681-1688, 2001.
19. Niebauer J, Hambrecht R, Velich T, Hauer K, Marburger C, Kalberer B, Weiss C, von HE, Schlierf G, Schuler G, Zimmermann R and Kubler W. Attenuated progression of coronary artery disease after 6 years of multifactorial risk intervention: role of physical exercise. *Circulation* 96: 2534-2541, 1997.
20. Niessner A, Richter B, Penka M, Steiner S, Strasser B, Ziegler S, Heeb-Elze E, Zorn G, Leitner-Heinschink A, Niessner C, Wojta J and Huber K. Endurance training reduces circulating inflammatory markers in persons at risk of coronary events: impact on plaque stabilization? *Atherosclerosis* 186: 160-165, 2006.
21. Okabe TA, Shimada K, Hattori M, Murayama T, Yokode M, Kita T and Kishimoto C. Swimming reduces the severity of atherosclerosis in apolipoprotein E deficient mice by antioxidant effects. *Cardiovasc Res* 74: 537-545, 2007.
22. Parker JL, Mattox ML and Laughlin MH. Contractile responsiveness of coronary arteries from exercise-trained rats. *J Appl Physiol* 83: 434-443, 1997.
23. Pellegrin M, Berthelot A, Houdayer C, Gaume V, Deckert V and Laurant P. New insights into the vascular mechanisms underlying the beneficial effect of swimming training on the endothelial vasodilator function in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis* 190: 35-42, 2007.
24. Rong JX, Li J, Reis ED, Choudhury RP, Dansky HM, Elmaleh VI, Fallon JT, Breslow JL and Fisher EA. Elevating high-density lipoprotein cholesterol in apolipoprotein E-deficient mice remodels advanced atherosclerotic lesions by decreasing macrophage and increasing smooth muscle cell content. *Circulation* 104: 2447-2452, 2001.
25. Rush JW, Turk JR and Laughlin MH. Exercise training regulates SOD-1 and oxidative stress in porcine aortic endothelium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284: H1378-H1387, 2003.

26. Singh U and Jialal I. Oxidative stress and atherosclerosis. *Pathophysiology* 13: 129-142, 2006.
27. Suvorava T, Lauer N and Kojda G. Physical inactivity causes endothelial dysfunction in healthy young mice. *J Am Coll Cardiol* 44: 1320-1327, 2004.
28. Walther C, Mobius-Winkler S, Linke A, Bruegel M, Thiery J, Schuler G and Halbrecht R. Regular exercise training compared with percutaneous intervention leads to a reduction of inflammatory markers and cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 15: 107-112, 2008.
29. Zanesco A and Antunes E. Effects of exercise training on the cardiovascular system: Pharmacological approaches. *Pharmacol Ther* 114: 307-317, 2007.
30. Zhang QJ, Li QX, Zhang HF, Zhang KR, Guo WY, Wang HC, Zhou Z, Cheng HP, Ren J and Gao F. Swim training sensitizes myocardial response to insulin: role of Akt-dependent eNOS activation. *Cardiovasc Res* 75: 369-380, 2007.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Swimming exercise reduces progression of atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice.

A: representative histological sections of aortic sinus stained with Movats pentachrome. B: atherosclerosis lesion size quantification. Bars represent mean ± SEM of measurements performed in 8 mice per group. * p<0.05 versus sedentary group.

Figure 2. Swimming exercise reduces macrophage and increases SMC plaque content in

ApoE^{-/-} mice. Representative sections analyzed immunohistochemically for Mac-2 (A) and α-SM (C). Quantitative analysis of Mac-2- (B) and α-SM actin-immunopositive area (D) expressed as percentage of total plaque size. Bars represent mean ± SEM of measurements performed in 8 mice per group. * p<0.05 versus sedentary group.

Figure 3. Influence of swimming exercise on the protein expression of eNOS (A), Ser¹¹⁷⁷-phosphorylated eNOS (B), Akt (C) and Ser⁴⁷³-phosphorylated Akt (D) in the aorta of ApoE^{-/-} mice. To determine the total protein content of eNOS, Ser¹¹⁷⁷-phosphorylated eNOS, Akt and Ser⁴⁷³-phosphorylated Akt, Western blot analysis was performed. On top of the figures, representative Western blot of the sedentary (S) and exercised (E) group. Panels E and F show the ratio of the p-eNOS to eNOS expression and the ratio of the p-Akt to Akt expression, respectively. Bars represent mean ± SEM of measurements performed in 4 mice per group.

Figure 4. Influence of swimming exercise on the protein expression of p47phox and p67phox in the aorta of ApoE^{-/-} mice. On top of the figures, representative Western blot of the sedentary (S) and exercised (E) group. Bars represent mean ± SEM of measurements performed in 4 mice per group.

Table 1. Body weight, lipid levels and citrate synthase activity in sedentary and exercised ApoE^{-/-} mice.

	Sedentary group	Exercised group
Mice weight, g	45.0 ± 1	35.9 ± 0.9*
Heart weight/body weight (mg/g)	4.3 ± 0.4	5.2 ± 0.2*
Plasma total cholesterol (g/L)	6.5 ± 0.6	7.6 ± 1.6
Plasma HDL-cholesterol (g/L)	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.2
Plasma non HDL-cholesterol (g/L)	4.8 ± 0.6	5.3 ± 0.8
Plasma triglycerides (g/L)	0.9 ± 0.1	1.3 ± 0.3
Plasma phospholipides (g/L)	4.9 ± 0.4	5.6 ± 1.1
Citrate synthase activity (μmol/min/g tissue)	87 ± 7	112 ± 8*

Mean ± SEM, n = 8 mice per group

* p<0.05 versus sedentary group

Figure 1.

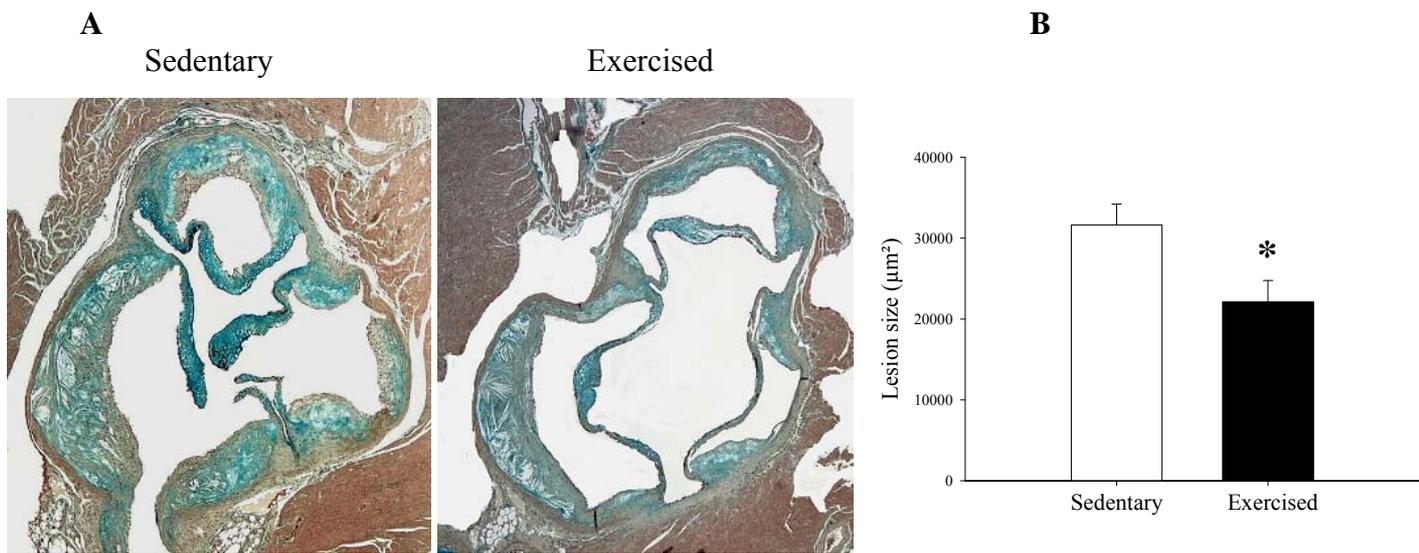


Figure 2.

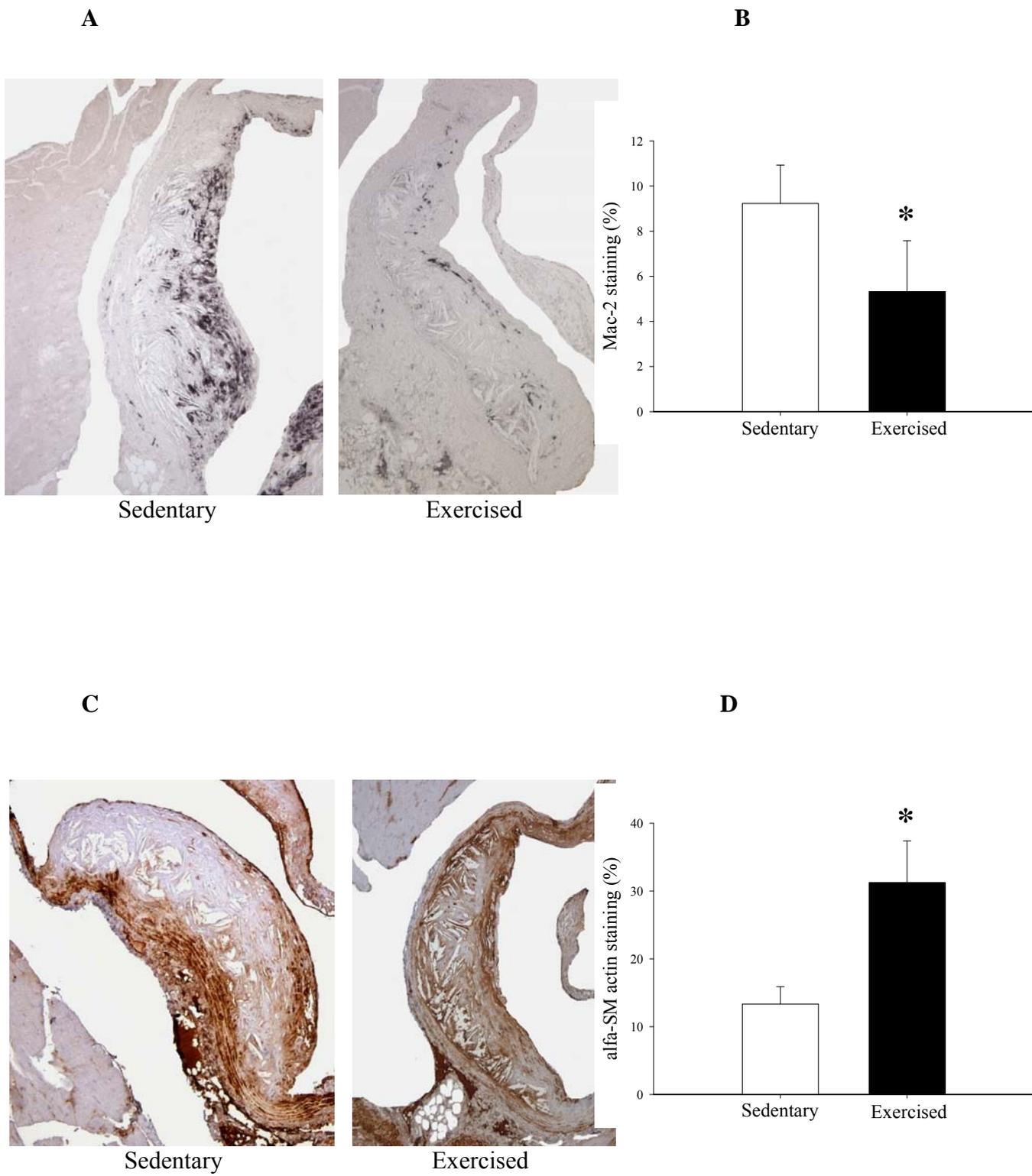


Figure 3.

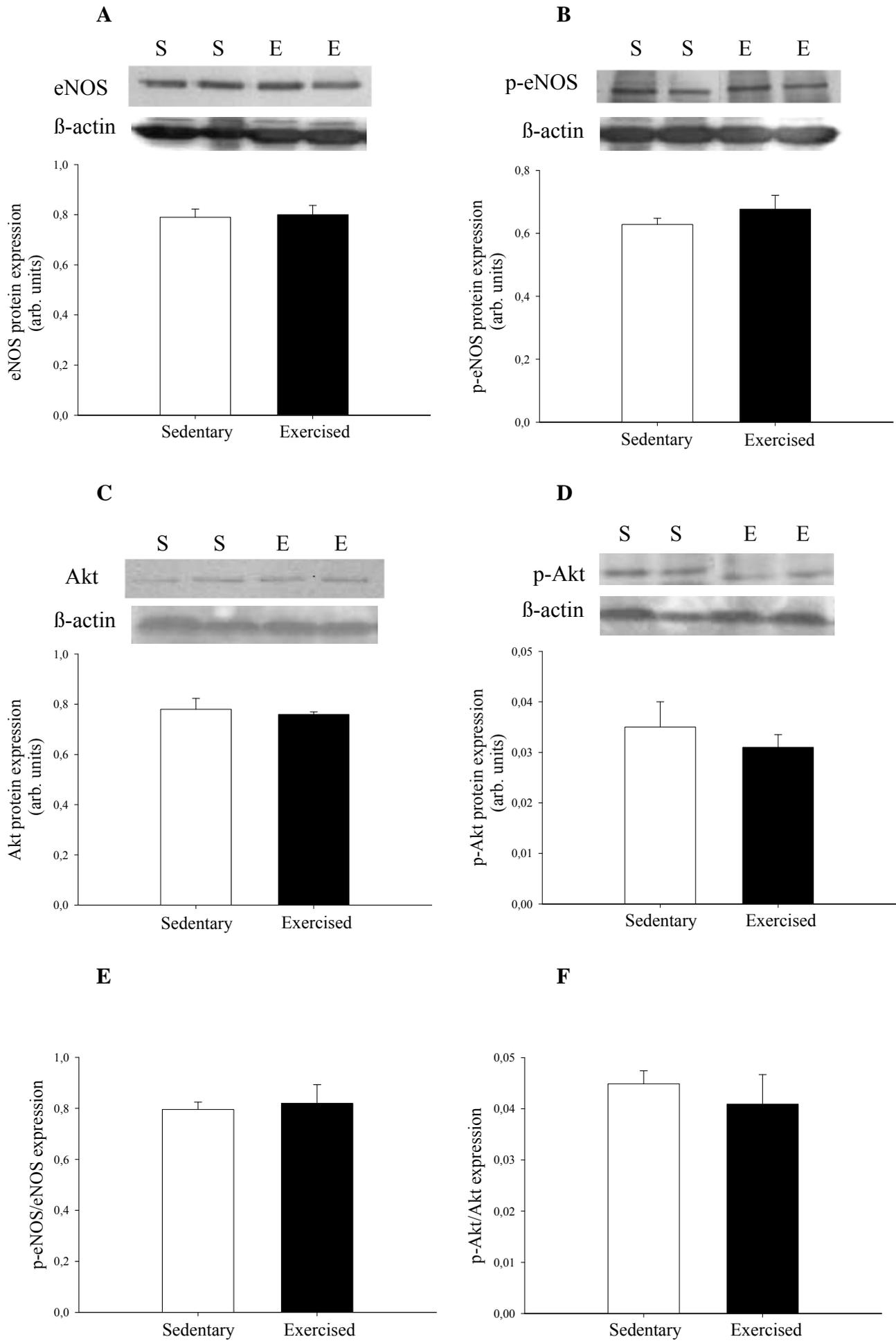
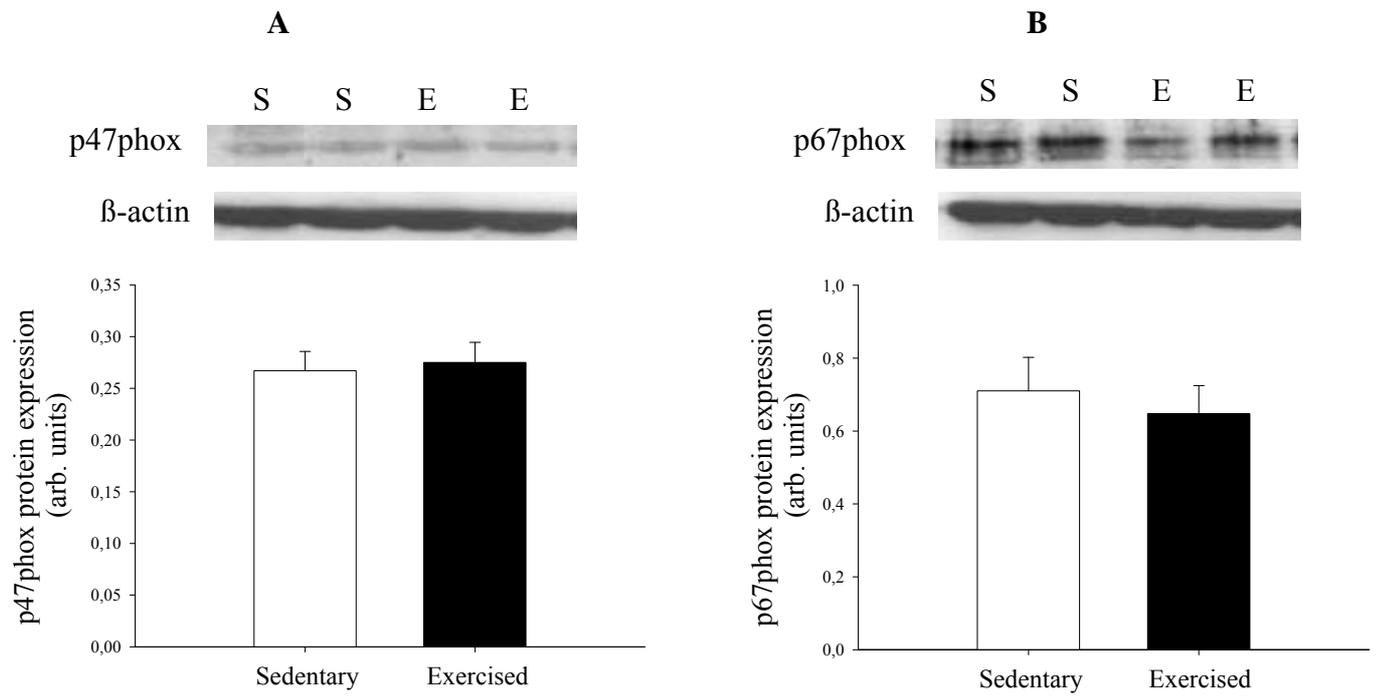


Figure 4.



TROISIEME PARTIE: EXERCICE PHYSIQUE ET PREVENTION DE LA PLAQUE INSTABLE

Swimming prevents vulnerable atherosclerotic plaque development by modulating Angiotensin II AT1 receptor expression in mice

Maxime Pellegrin, Jean-François Aubert, Karima Bouzourene, Vincent Braunersreuther, François Mach, Jacques-Antoine Haefliger, Florian Alonso, Alain Berthelot, Jürg Nussberger, Pascal Laurant, Lucia Mazzolai

Publication soumise dans Hypertension (Impact factor 2007: 7.2)

1. But de l'étude

Le but de cette étude était d'investiguer les effets de l'exercice sur le développement de la plaque vulnérable en utilisant un modèle murin de plaque instable.

Nous supposons que l'exercice est capable de prévenir la progression de la plaque instable. Nous présumons également que cet effet est expliqué par une diminution de l'expression des récepteurs AT1.

2. Méthode

- Nous avons utilisé deux modèles de souris avec une hypertension rénovasculaire, un modèle de plaque instable: la souris ApoE^{-/-} 2K1C et un modèle contrôle avec plaque stable: la souris ApoE^{-/-} 1K1C.

Chez la souris 2K1C, l'artère rénale gauche est clippée ce qui provoque une constriction de l'artère et donc la diminution de la perfusion rénale. En réponse à cette diminution de la perfusion, le rein sécrète une plus grande quantité de rénine et donc d'Ang II circulant ce qui provoque une hypertension rénine-Ang II-dépendante. L'augmentation de l'ang II augmente aussi la réabsorption du sel et de l'eau par le rein provoquant une hypervolémie qui est compensée par le rein controlatéral (Figure 7). Dans le modèle 1K1C, la procédure chirurgicale est la même (clip de l'artère rénale gauche) mais une

néphrectomie du rein droit est réalisée. L'hypervolémie persiste en l'absence du 2^{ème} rein et exerce un effet feed back négatif sur la sécrétion de rénine. L'hypertension est donc volume-dépendante (Figure 7). Quatre semaines après l'opération, ces souris développent des plaques avec un phénotype instable (2K1C) ou stable (1K1C) (Mazzolai *et al.*, 2004e).

- Les souris ApoE^{-/-} sham, 2K1C et 1K1c ont suivi ou non un protocole de nage pendant 5 semaines (5 fois/semaine, 50 min/jour).
- Mesure des paramètres hémodynamiques (pression artérielle et fréquence cardiaque) et des taux hormonaux sanguins (activité et concentration plasmatique de la rénine, noradrénaline...)
- Quantification de la morphologie des plaques au niveau du sinus aortique. Evaluation de plusieurs caractéristiques de la plaque (épaisseur de la chape fibreuse, présence d'une dégénérescence de la média, présence de cellules spumeuses en-dehors du noyau lipidique, inflammation de l'adventice, contenu en CMLV et macrophages).
- Expression des récepteurs AT1. Quantification des ARNm par RT-PCR (réaction en chaîne de la polymérase en temps réel) au niveau de l'aorte.

3. Résultats principaux et conclusion

- L'exercice a prévenu l'apparition de la plaque instable indépendamment d'un effet hémodynamique.
- Cet effet bénéfique est médié par une sous-expression aortique des récepteurs AT1.

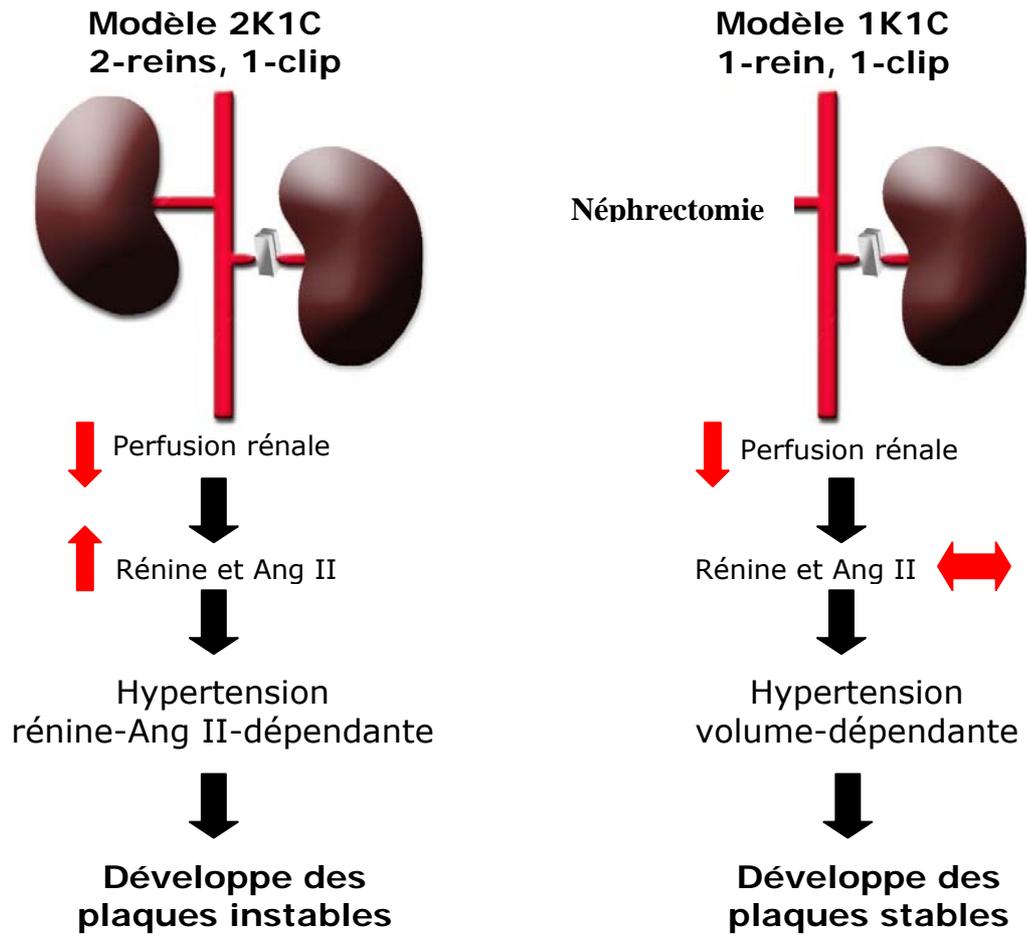


Figure 8. Génération des modèles de souris avec plaques instables (2K1C) et plaques stables (1K1C).

**Swimming prevents vulnerable atherosclerotic plaque development by modulating
Angiotensin II AT1 receptor expression in mice**

Maxime Pellegrin^{1,2}, Jean-François Aubert¹, Karima Bouzourene¹, Vincent
Braunersreuther³, François Mach³, Jacques-Antoine Haefliger⁴, Florian Alonso⁴, Alain
Berthelot², Jürg Nussberger¹, Pascal Laurant², Lucia Mazzolai¹

From ¹the Service of Vascular Medicine, Lausanne University Hospital, Centre Hospitalier
Universitaire Vaudois, Lausanne, Switzerland; ² EA-4267/2SBP, Exercise Prevention
Innovation and Technico-Sporting Watching Department, University of Franche-Comté,
Besançon, France; ³the Division of Cardiology, University Hospital, Foundation for Medical
Researches, Geneva, Switzerland; ⁴the Service of Internal Medicine, Lausanne University
Hospital, Centre Hospitalier Universitaire Vaudois, Switzerland;

Corresponding authors:

Lucia Mazzolai or Maxime Pellegrin

Service of Vascular Medicine, CHUV, Av. Pierre Decker 5, 1011 Lausanne, Switzerland

Phone number: +41-21-3140750, Fax number: +41-21-3140761

E-mails: lucia.mazzolai@chuv.ch or maxime.pellegrin@chuv.ch

ABSTRACT

Exercise is known to reduce cardiovascular risk. However, its role on atherosclerotic plaque stabilization is unknown. For this purpose, ApoE^{-/-} mice with vulnerable (2K1C: Angiotensin II-dependent hypertension model) or stable atherosclerotic plaques (1K1C: Angiotensin II-independent hypertension model, and normotensive shams) swam regularly for 5 weeks and were compared to sedentary controls. Exercised 2K1C mice developed significantly more stable plaques (thinner fibrous cap, decreased media degeneration, layering, macrophage content and increased smooth muscle cells) than sedentary controls. Exercise did not affect blood pressure. Conversely, swimming significantly reduced aortic Ang II AT1 receptor mRNA levels. Sympathetic tone also significantly diminished in exercised 2K1C mice compared to sedentary ones; renin and aldosterone levels tended to increase. AT1 downregulation was not accompanied by improved endothelial function and no difference in balance among Th1, Th2, and T regulatory cells was observed between sedentary and exercised mice.

These results show for the first time, in a mouse model of Angiotensin II-mediated vulnerable plaques, that swimming prevents atherosclerosis progression and plaque vulnerability. This benefit was due to decreased aortic AT1 expression, independently from any hemodynamic change, protecting the vessel wall from the pro-atherogenic effects of Angiotensin II. The pivotal and blood pressure-independent role of Angiotensin II in atherogenesis is newly emphasized.

INTRODUCTION

Atherosclerosis, a complex multifactorial chronic disease, represents a major health burden in modern society. A number of risk factors are strongly associated with the initiation and growth of atherosclerotic plaques. However, the mechanisms that cause a stable plaque to become vulnerable remain largely unknown. We have recently shown, in a mouse model of atherosclerosis, that Angiotensin (Ang) II induces progression of atherosclerosis and mediates plaque vulnerability beyond its effect on blood pressure (1). Progression towards a vulnerable phenotype facilitates plaque rupture with dramatic consequences (2, 3).

Therefore, stabilizing atherosclerotic plaques is a major goal in cardiovascular medicine.

Regular physical exercise is effective and efficient in reducing cardiovascular risk(4-6). In particular, exercise has been shown to reduce progression of atherosclerosis in patients with coronary artery disease (7). Similarly, we and others have shown that regular exercise exerts beneficial effect on atherosclerosis extension in a variety of animal models (8-11). It is therefore not surprising that many national and international guidelines now consider regular aerobic exercise for at least 30 minutes per day, most days of the week, to be a key element in the management of cardiovascular risk reduction. Swimming is considered equally effective as jogging, biking or walking as a recommended aerobic exercise. However, although exercise has undoubtedly beneficial effects on cardiovascular risk reduction, little is known as to whether exercise, and in particular swimming, may have an impact on atherosclerotic plaque progression/stabilization. Therefore, the aim of this study was to assess a putative beneficial effect of regular swimming on vulnerable plaque development. For this purpose, the mouse model of Ang II mediated vulnerable plaque, developed in our laboratory (1), was used.

RESULTS

Sedentary mice

Hemodynamic and hormonal results are summarized in Table 1. Exercised ApoE^{-/-} sham, 2K1C (2 kidney-one clip), and 1K1C (1 kidney-one clip) mice were analyzed. Sedentary ApoE^{-/-} sham, 2K1C, and 1K1C animals served as controls. As expected, in sedentary hypertensive 2K1C mice plasma renin concentration (PRC) values were significantly above normal (Ang II-dependent hypertension model) as compared to control normotensive sham. In hypertensive 1K1C mice (Ang II-independent hypertension model) PRC levels were within the normal range. Plasma angiotensinogen (Ang-N) in sedentary hypertensive 2K1C mice was significantly decreased (due to substrate consumption following renin activation) compared to sedentary normotensive sham and hypertensive 1K1C mice. In these two latter groups plasma Ang-N levels remained normal. Heart rate (HR) and body weight (BW) were not different among sham, 2K1C, and 1K1C sedentary animals.

Effect of exercise on MBP, HR, BW, PRC, total cholesterol, and citrate synthase levels

Five weeks of swimming training had no significant effect on mean blood pressure (MBP) in any group of mice (Table 1). Analysis of systolic and diastolic blood pressure values showed similar unchanged results between sedentary and exercised mice (data not shown). Along the same line, as observed in sedentary animals, after exercise PRC remained significantly higher in 2K1C mice as compared to similarly trained sham, and 1K1C animals (Table 1). Correspondingly, plasma Ang-N substrate significantly decreased in exercised 2K1C mice (Table 1). As expected, HR was significantly lower in animals after swimming as compared to sedentary controls ($p < 0.05$; Table 1). Body weight was not affected by swimming (Table 1). Likewise, plasma total cholesterol levels were not different among exercised and sedentary mice (data not shown). To verify that indeed swimming mice sufficiently exercised, muscle citrate synthase was measured and was found to be

significantly increased after 5 weeks of swimming training in all three groups of mice (data not shown).

Swimming prevents atherosclerosis progression in hypertensive 2K1C mice

Plaque analysis in sedentary mice showed in 2K1C animals a more vulnerable phenotype than plaques from similarly hypertensive 1K1C and normotensive sham mice as previously described (decreased fibrous cap thickness, increased media degeneration, layering, and adventitia inflammation, $p < 0.05$; Table 2) (1). Moreover, smooth muscle cells (SMC) content was significantly decreased in plaques from 2K1C mice as evidenced by the decrease in α -smooth muscle actin (SMA) ($p < 0.05$; Figure 1). Along the same line, in plaques from 2K1C mice macrophage content was significantly increased ($p < 0.05$; Figure 2). Contrasting to sedentary 2K1C mice, plaques from sedentary hypertensive 1K1C showed a significantly more stable phenotype similar to that found in sedentary normotensive sham animals (Table 2, Figures 1 and 2).

Analysis of plaques from exercised mice revealed prevention of atherosclerosis progression in 2K1C animals. In fact, qualitative plaque evaluation from hypertensive 2K1C mice, after 5 weeks of swimming, showed a more stable phenotype as compared to equally hypertensive sedentary 2K1C animals (significantly thicker fibrous cap, decreased media degeneration, layering and adventitia inflammation; Table 2 and Figure 3). Along the same line, α -SMA content was significantly increased by 143% ($p < 0.05$) in exercised as compared to sedentary 2K1C mice (Figure 1). In addition, macrophage plaque content was significantly reduced by 35% ($p < 0.05$) in exercised as compared to sedentary 2K1C mice (Figure 2).

Plaque phenotype of these exercised 2K1C mice was similar to that found in sedentary normotensive sham and sedentary hypertensive 1K1C animals.

Plaque staging also differed among exercised and sedentary 2K1C mice. Sedentary hypertensive 2K1C animals mainly developed advanced lesions (89% of mice) whereas only 25% of mice developed advanced plaques in the exercised hypertensive 2K1C group ($p < 0.05$; Table 2). Swimming exercise did not seem to affect significantly plaque phenotype of sham and hypertensive 1K1C mice as compared to sedentary ones (Table 2, Figures 1 and 2). No difference in plaque staging was observed among exercised sham or 1K1C and sedentary sham or 1K1C mice (Table 2).

Effect of swimming on AT1 receptor expression, endothelial function, eNOS expression and T cell phenotype

In the ApoE^{-/-} 2K1C mouse model, plaque vulnerability is Ang II mediated as we have previously shown (1). Five weeks of regular swimming prevented development of vulnerable plaques in ApoE^{-/-} 2K1C mice. Interestingly, in these animals MBP and PRC were unaffected by exercise. Therefore, we investigated whether the beneficial effect of swimming may be induced by modulating vascular Ang II AT1 receptor expression. Quantitative mRNA analysis showed similar aortic AT1 expression levels among sedentary sham, 2K1C and 1K1C mice (Figure 4). After 5 weeks of swimming a downregulation in aortic AT1 receptor expression was observed in all groups of mice (Figure 4). This reduction was significant in exercised normotensive sham and hypertensive 2K1C mice compared to sedentary sham and 2K1C, respectively ($p < 0.05$). In exercised 1K1C animals AT1 expression was reduced by 23%, but the reduction did not reach significance (Figure 4). Notably, the decrease in aortic AT1 mRNA levels in 2K1C animals correlated with the reduction in plaque macrophage content ($r = 0.80$) and with the increase in SMC content ($r = 0.58$).

Ang II, via the AT1 receptor, has been linked to endothelial dysfunction (12). Therefore, we assessed whether aortic AT1 mRNA downregulation might be accompanied by improved

endothelial function in our 2K1C exercised mice. For this purpose, endothelium-dependent and independent vasorelaxation in isolated aortic rings were studied. Five weeks of swimming did not improve endothelial function in 2K1C mice (Figure 5). Similarly, endothelium-independent SNP induced vasorelaxation as well as phenylephrine induced vasoconstriction were unchanged between exercised and sedentary mice (data not shown). Likewise, expression of eNOS, a key mediator of endothelial function and atherogenesis, was not altered in exercised compared to sedentary 2K1C mice (Figure 6).

Ang II, via its AT1 receptor, is also known to modulate T cell phenotype thus playing a role in atherogenesis. For this purpose, cell-type specific transcript expression was studied in splenocytes of exercised and sedentary 2K1C mice. Results showed unchanged CD4 expression after swimming (Figure 7A). Likewise, Tim-3 (Th1 lymphocyte-marker), GATA3 (Th2-lymphocyte-marker), and Foxp3 (regulatory T cell-marker) appeared to be unaffected by swimming exercise (Figure 7B-D).

Effect of swimming on plasma norepinephrine and aldosterone levels

Swimming is known to affect sympathetic tone. Therefore, plasma norepinephrine (NE) was measured in sedentary and exercised mice. NE plasma levels decreased after 5 weeks of swimming in all groups of mice and this reduction reached statistical significance in the exercised 2K1C group (Table 1).

Aldosterone plays a pivotal role in blood pressure homeostasis and is a key element of the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS). Therefore, plasma levels were determined after exercise and compared to those found in sedentary animals. Mean plasma aldosterone was consistently higher after 5 weeks of swimming, but in parallel to slightly increased mean plasma renin, the increase was not significant.

DISCUSSION

Our results show for the first time, in a mouse model of Ang II-mediated vulnerable atherosclerotic plaques, that swimming can prevent atherosclerosis progression and plaque vulnerability. Moreover, the pivotal and blood pressure-independent role of Ang II in atherogenesis is newly emphasized (1). The beneficial effect of swimming was likely mediated by downregulating aortic Ang II AT1 receptor expression independently from any hemodynamic change.

In sedentary ApoE^{-/-} mice, aortic AT1 receptor expression was not significantly different among sham, 2K1C, and 1K1C animals. After 5 weeks of swimming all groups of mice showed a similar decrease in Ang II receptor mRNA levels. These findings of reduced AT1 mRNA levels in aortas of exercising mice, to our knowledge, have not been shown before.

Alternatively, other authors showed: 1) reduced AT1 mRNA and protein levels in the central nervous system of rabbits with chronic heart failure undergoing treadmill exercise (13); 2) decreased AT1 receptors in mammary arteries of trained vs untrained individuals (14). It may therefore be postulated that beneficial effects of exercise are mediated, at least partly, by reduced AT1 levels. Nevertheless, the universality of the observed exercise effect on AT1 receptor expression will have to be assessed in various organs and vascular beds and following various types of exercise to fully evaluate the potential role of this adaptation.

Decreased aortic AT1 expression in exercised 2K1C mice was not accompanied by a decrease in blood pressure. Conversely, the observed modest increase in renin and aldosterone levels accompanied by a sizable reduction in Ang-N (- 42% in 2K1C mice) suggested a stimulated RAAS and enhanced substrate consumption. Thus, in our mice the benefit of exercise cannot be explained by reduced Ang II production or a hemodynamic effect.

After 5 weeks of swimming, 2K1C mice showed also a diminished sympathetic tone (significant decrease in plasma NE levels). This suppressive effect of exercise on

sympathetic system has been observed also by others (13). These trends for swimming-induced hormonal changes were seen in all 3 groups of exercised mice. An exercise-mediated reduction in sympathetic drive (reduced heart rate and NE levels) may necessitate a compensatory increase in RAAS activity in order to maintain adequate renal perfusion. Reduced AT1 receptor expression would thus reflect increased Ang II concentrations. On the other hand, it is known that the RAAS and the sympathetic system work together in a synergistic way to assure blood pressure homeostasis (15). A cross-talk between the RAAS and the sympathetic system is therefore conceivable also at the receptor level. Reduced NE levels may have indirectly or directly reduced aortic AT1 receptor expression in our exercised mice.

The beneficial effect on plaque progression was clearly manifest only in exercised hypertensive 2K1C animals. This is not surprising. In young sham mice lesions are at an early stage and spontaneously progress rather slowly in absence of stimuli (high fat diet, hypertension, RAAS stimulation, etc.). Similarly, plaques from volume overload hypertensive 1K1C mice, although at a more advanced stage than seen in sham normotensive animals, are of a stable phenotype. On the contrary, 2K1C mice rapidly develop advanced and vulnerable lesions during the 5 weeks after clipping due to increased endogenous Ang II production (1, 16) and therefore, in these mice the beneficial effect of exercise on atherosclerosis progression was readily demonstrated.

The question arises as to the possible mechanisms by which diminished vascular Ang II receptor expression could affect plaque progression. Certainly, a lower local Ang II signaling may protect the vessel wall from the pro-atherogenic effects of Ang II. One of the most frequently claimed negative effects of Ang II is impaired endothelial function. Therefore, we investigated whether exercise-induced AT1 downregulation could result in improved aortic endothelial function. This was not the case and along the same line aortic eNOS expression was not affected by swimming in our 2K1C mice.

Several lines of evidence suggest that regular aerobic exercise reduces established markers and mediators of inflammation which are known to play a key role in the pathophysiology of atherosclerosis (17). Exercise reduces pro-inflammatory cytokines while increasing anti-inflammatory ones in patients with coronary syndromes (18, 19). Correspondingly, Ang II is known to negatively affect these same mediators (12). Therefore, we assessed whether in our exercised 2K1C mice modulation of T cells phenotype may explain the beneficial effect on plaque progression. However, no difference in balance among Th1, Th2, and T regulatory cells was observed between sedentary and exercised mice.

Results reported here – if confirmed in clinical studies– should have clinical implications in terms of cardiovascular event protection. In fact, for hypertensive patients with an activated RAAS and presenting with clinical or subclinical atherosclerosis, swimming exercise may be an attractive adjuvant therapy for prevention of atherosclerosis progression.

MATERIALS AND METHODS

Mouse models of stable and vulnerable atherosclerotic plaques. ApoE^{-/-} mice (C57BL/6J background, IFFA CREDO, L'Arbresle Cedex, France) were fed regular rodent chow and water ad libitum throughout the study. Both male and female mice were used. All experiments were approved by the local Institutional Animal Committee. Two models of renovascular hypertension were generated as previously described in 14-16 week-old animals: 1) the renin-dependent Ang II-mediated 2K1C (2 kidney-one clip); these mice develop vulnerable plaques as previously reported (1), and 2) the renin-independent 1K1C (1 kidney-one clip); these mice develop stable plaques (1). Briefly, mice were anesthetized by halothane inhalation (1% to 2% in oxygen), the left kidney was exposed and left renal artery was clipped to reduce renal perfusion. In the 1K1C model, besides left renal artery clipping, right nephrectomy was performed. Normotensive sham animals were used as controls.

Endurance swimming protocol. ApoE^{-/-} mice were randomly assigned to either sedentary or exercise group. The exercise group underwent a 5-week swimming program as previously published (10). Briefly, swimming was performed always in the morning between 8 and 10 am. It consisted of a swimming period of 50 min/day, 5 days/week in water constantly kept at 35-36°C. Animals were progressively trained before clipping: 10 min training on day 1 followed by daily 10 min increase up to 40 min training on day four. On day five, mouse models of stable or vulnerable plaques were generated as described above. After surgery, mice were allowed to recover for 2 days. Swimming training was then resumed at 50 min/day, 5 days/week during 5 weeks. After swimming sessions, wet animals were carefully dried and placed in a warm environment to avoid additional cold physiological stress and health problems.

Blood pressure and heart rate. Mean blood pressure (MBP) and heart rate (HR) were measured 5 weeks after clipping at the end of the experimental protocol in the six groups of mice (sedentary and exercised sham, 2K1C and 1K1C ApoE^{-/-} mice) as previously described (1). Briefly, left carotid artery was catheterized and catheter was tunneled subcutaneously to exit at the back of the neck. Mice were allowed full recovery from anaesthesia. The arterial line was connected to a pressure transducer and 30-45 min thereafter, MBP, systolic and diastolic pressures, and HR were recorded using a computerized data acquisition system (20).

Hormones, total cholesterol, and citrate synthase measurements. At the end of the experimental period, right after blood pressure measurement, blood was drawn (100µl) from non anesthetized mice via the arterial catheter into EDTA containing tubes. Plasma renin concentration (PRC) and angiotensinogen (Ang-N) plasma levels were determined as previously described using a modified microassay based on Ang I trapping by antibody developed in our laboratory (16). Plasma norepinephrine (NE) levels were measured as previously described (21). Briefly, blood was gently drawn via the arterial catheter connected to a long (30 cm) PE-10 tube into heparin containing tubes. Plasma NE was determined using a modified HPLC with amperometric detection technique. Plasma aldosterone levels were measured by direct radioimmunoassay as previously described (22). Total cholesterol in mouse plasma was measured using a commercially available kit (DiaSys Diagnostic Systems GmbH, Germany) following manufacturer instructions. Citrate synthase activity, a marker of mitochondrial content, was measured in gastrocnemius muscle homogenates using spectrophotometric method as previously described (10).

Evaluation of atherosclerotic plaque vulnerability and morphology. Analysis of plaque morphology and morphometry were carried out in 3 μm -thick serial histological sections of formalin fixed and paraffin embedded aortic sinus as previously described (1). Sections obtained between the appearance and disappearance of the aortic valve were analyzed by light microscopy for the identification of plaques. The 3 middle sections of the biggest atherosclerotic plaque were used for atherosclerotic evaluation after staining with Movats pentachrome. The preceding and following 3 μm -thick sections were used for immunohistochemistry. An independent investigator blinded to the study protocol evaluated each section under a light microscopy using the morphometry software Qwin (Leica systems, Wetzlar, Germany). Following Movats staining, plaques were classified as early-intermediate (essentially composed of foam cells or with a small lipid core) and advanced (large necrotic/lipid core with multiple layers). Furthermore, the following characteristics of plaque quality were evaluated: 1) fibrous cap thickness; 2) quantification of smooth muscle cell content (α -smooth muscle actin, α -SMA, staining); 3) presence of media degeneration (invasion of media by plaque components, media thinning, elastic laminae rupture, and media atrophy); 4) presence of layering (foam cells above or adjacent to the central lipid core); 5) inflammation of the adventitia (> 20 polymorphonuclear cells); 6) plaque macrophage content quantification (MAC-2 staining) (1).

Immunohistochemical analysis. Analysis was carried out as previously described (1). Briefly, sections were stained with a biotinylated mouse monoclonal IgG2a α -SM actin antibody (23) or with a monoclonal antibody to mouse macrophage marker Mac-2 (clone M3/38; Cedarlane, Ontario, Canada). Samples were observed with a photomicroscope and pictures were acquired with a high sensitivity color digital camera (Leica DC Camera, Leica systems, Wetzlar, Germany). α -smooth muscle actin (α -SMA) and Mac-2 positive areas were quantified by means of the Qwin morphometry software (1).

Ex vivo endothelial function assessment. Aortas of mice were excised, cleaned from connective tissue, and cut into rings of approximately 2 mm in length. Each ring was suspended between wires attached to force transducers in a Multi Myograph System (Model 610M) for the measurement of isometric tension. Rings were incubated in a chamber filled with Krebs solution (NaCl 118 mM, KCl 4.65 mM, CaCl₂ 2.5 mM, KH₂PO₄ 1.18 mM, NaHCO₃ 24.9 mM, MgSO₄ 1.18 mM, glucose 12 mM, pH 7.4) bubbled with 95% O₂ - 5% CO₂ at 37°C (pH 7.4) and allowed to stabilize for 60 min at 3-4 mN optimal resting tension. To study endothelial function, the vasodilator response to endothelium dependent agonist acetylcholine (Ach; 3x10⁻⁹-10⁻⁵ mol/L) and endothelium independent agonist sodium nitroprusside (SNP; 3x10⁻⁹ to 10⁻⁵ mol/L) were studied. The degree of vasodilatation was expressed as percentage reduction from the precontracted state induced by 10⁻⁵ mol/L phenylephrine.

Real-time semi quantitative PCR. Total RNA from mouse spleens or thoraco-abdominal aortas was extracted with TRI Reagent (MRC Inc., Cincinnati, Ohio) according to the manufacturer's instructions. Reverse transcription was performed using the Quantitect kit (Qiagen). Real-time PCR (ABI Prism 7000 Sequence Detection System, Applied Biosystems) was used to determine mRNA levels of CD4 (T helper-cell marker), Tim3 (Th1-cell marker), Gata3 (Th2-cell marker), and Foxp3 (regulatory T-cell marker) in spleens whereas mRNA levels of eNOS, and AT1 receptor were quantified in mouse aortas. The following primers were used: for CD4: 5'-AGATCACAGTCTTCACCTGGAAGTT (sense), 5'-TGCCCCTTTTTTGGGAATCAA (antisense); for Tim3: 5' GCCGGTGGACCTCAGTTTC (sense), 5'-TGGGAGCCAGCACAGATCA (antisense); for Gata3: 5'-CAGAACCGGCCCTTATCA (sense), 5'-CATTAGCGTTCCTCCTCCAGA (antisense), for Foxp3: 5'-GGCCCTTCTCCAGGACAGA (sense), 5'-GCTGATCATGGCTGGGTTGT (antisense), for eNOS: 5'-TTGTCTGCGGCGATGTCA (sense) , 5'-

GAATTCTCTGCACGGTTTGCA (antisense) and for AT1a receptor: 5' GTC GCA CTC AAG CCT GTC TA 3' (sense), 5' CCT GTC ACT CCA CCT CAG AA 3' (antisense).

Statistical Analysis. No significant differences between sexes were found and therefore, results were averaged. Data are expressed as mean \pm SEM. The Mann-Whitney test was used for comparison between two groups. For multiple comparisons, one-way ANOVA followed by Tukey's test was used. Dose-response relationships were analysed using two-way ANOVA followed by Bonferroni test. Statistical analysis of plaque morphology was carried out using the Chi squared test, if more than 20% of the expected frequencies were less than 5 we used the Fisher's exact test to evaluate the exact *P*-value. Values of $p < 0.05$ were considered significant. The statistical software GraphPad was used for analysis.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Françoise Nicoud, Irène Keller, Sylvie Bertholet, and Graziano Pelli for excellent technical assistance.

SOURCES OF FUNDING

This work was supported by the Swiss national science foundation (grant 3200BO-109900 to Dr L. Mazzolai).

CONFLICT(S) OF INTEREST/DISCLOSURE(S) STATEMENT

Authors report no conflicts of interest.

REFERENCES

1. Mazzolai, L., et al. 2004. Endogenous angiotensin II induces atherosclerotic plaque vulnerability and elicits a Th1 response in ApoE^{-/-} mice. *Hypertension* 44:277-282.
2. Naghavi, M., et al. 2003. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part II. *Circulation* 108:1772-1778.
3. Naghavi, M., et al. 2003. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part I. *Circulation* 108:1664-1672.
4. Bassuk, S.S., and Manson, J.E. 2005. Epidemiological evidence for the role of physical activity in reducing risk of type 2 diabetes and cardiovascular disease. *J Appl Physiol* 99:1193-1204.
5. Gaesser, G.A. 2007. Exercise for prevention and treatment of cardiovascular disease, type 2 diabetes, and metabolic syndrome. *Curr. Diab. Rep.* 7:14-19.
6. Thompson, P.D., et al. 2003. Exercise and physical activity in the prevention and treatment of atherosclerotic cardiovascular disease: a statement from the Council on Clinical Cardiology (Subcommittee on Exercise, Rehabilitation, and Prevention) and the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism (Subcommittee on Physical Activity). *Circulation* 107:3109-3116.
7. Niebauer, J., et al. 1997. Attenuated progression of coronary artery disease after 6 years of multifactorial risk intervention: role of physical exercise. *Circulation* 96:2534-2541.
8. Laufs, U., et al. 2005. Physical inactivity increases oxidative stress, endothelial dysfunction, and atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25:809-814.
9. Napoli, C., et al. 2004. Long-term combined beneficial effects of physical training and metabolic treatment on atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101:8797-8802.
10. Pellegrin, M., et al. 2007. New insights into the vascular mechanisms underlying the beneficial effect of swimming training on the endothelial vasodilator function in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis* 190:35-42.
11. Shimada, K., et al. 2007. Exercise training reduces severity of atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice via nitric oxide. *Circ. J.* 71:1147-1151.
12. Skultetyova, D., Filipova, S., Riecanaky, I., and Skultety, J. 2007. The role of angiotensin type 1 receptor in inflammation and endothelial dysfunction. *Recent Patents Cardiovasc Drug Discov* 2:23-27.
13. Mousa, T.M., Liu, D., Cornish, K.G., and Zucker, I.H. 2008. Exercise training enhances baroreflex sensitivity by an angiotensin II-dependent mechanism in chronic heart failure. *J Appl Physiol* 104:616-624.

14. Adams, V., et al. 2005. Impact of regular physical activity on the NAD(P)H oxidase and angiotensin receptor system in patients with coronary artery disease. *Circulation* 111:555-562.
15. Mancia, G., Dell'Oro, R., Quarti-Treviso, F., Scopelliti, F., and Grassi, G. 2006. Angiotensin-sympathetic system interactions in cardiovascular and metabolic disease. *J Hypertens Suppl* 24:S51-S56.
16. Nussberger, J., et al. 2008. Renin inhibition by aliskiren prevents atherosclerosis progression: comparison with irbesartan, atenolol, and amlodipine. *Hypertension* 51:1306-1311.
17. Wilund, K.R. 2007. Is the anti-inflammatory effect of regular exercise responsible for reduced cardiovascular disease? *Clin Sci (Lond)* 112:543-555.
18. Goldhammer, E., et al. 2005. Exercise training modulates cytokines activity in coronary heart disease patients. *Int J Cardiol* 100:93-99.
19. Walther, C., et al. 2008. Regular exercise training compared with percutaneous intervention leads to a reduction of inflammatory markers and cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 15:107-112.
20. Wiesel, P., Mazzolai, L., Nussberger, J., and Pedrazzini, T. 1997. Two-kidney, one clip and one-kidney, one clip hypertension in mice. *Hypertension* 29:1025-1030.
21. Grouzmann, E et al.. 2003. Blood sampling methodology is crucial for precise measurement of plasma catecholamines concentrations in mice. *Pflugers Arch* 447:254-258.
22. Nussberger, J., Waeber, B., Brunner, H.R., Burris, J.F., and Vetter, W. 1984. Highly sensitive microassay for aldosterone in unextracted plasma: comparison with two other methods. *J Lab Clin Med* 104:789-796.
23. Skalli, O., et al. 1986. A monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. *J Cell Biol* 103:2787-2796.

RESULTS

Table 1. Hemodynamic and hormonal characteristics in sedentary and 5-week exercised sham, 2K1C and 1K1C ApoE^{-/-} mice.

Exercise		BW	MBP	HR	Ang-N	PRC	NE	Aldosterone
		(g)	(mmHg)	(bpm)	(pmol/ml)	(ng/ml per h)	(nM)	(pg/ml)
Sham	No	25 ± 1	118 ± 3	628 ± 11	309 ± 17	903 ± 84	7.26 ± 0.5	533 ± 78
2K1C	No	26 ± 1	142 ± 2 ^A	654 ± 13	193 ± 25 ^C	1987 ± 184 ^C	5.76 ± 0.8	606 ± 156
1K1C	No	23 ± 1	150 ± 3 ^A	646 ± 12	327 ± 48	970 ± 172	6.49 ± 0.7	1049 ± 173
Sham	Yes	25 ± 1	118 ± 2	570 ± 27 ^B	248 ± 14	1022 ± 169	4.19 ± 1.2	776 ± 138
2K1C	Yes	24 ± 1	141 ± 5 ^A	607 ± 7 ^B	111 ± 11 ^C	2059 ± 470 ^C	4.381 ± 0.3 ^B	636 ± 196
1K1C	Yes	23 ± 1	146 ± 3 ^A	590 ± 1 ^B	321 ± 23	994 ± 456	5.41 ± 0.7	1380 ± 300

BW: body weight; MBP: mean blood pressure; HR: heart rate; Ang-N: angiotensinogen; PRC: plasma renin concentration; NE: norepinephrine.

N=11-19 in each group, for the NE measurements N=5-10 in each group

^Ap<0.001 vs respective sham

^Bp<0.05 vs respective sedentary group

^Cp<0.05 vs respective sham and 1K1C

Table 2. Plaque quality assessment and staging in sedentary and 5-week exercised sham, 2K1C and 1K1C ApoE^{-/-} mice. Number of mice presenting the characteristic over total number of mice in the group.

	Exercise	Media degeneration	Layering	Thinned fibrous cap	Adventitia inflammation	Advanced plaque staging
Sham	No	2/7	2/7	2/7	0/7	2/7
2K1C	No	9/9 ^C	9/9 ^{BC}	9/9 ^{BC}	5/9 ^{BC}	8/9 ^C
1K1C	No	7/8	2/8	4/8	0/8	4/8
Sham	Yes	5/8	2/8	4/8	1/8	4/8
2K1C	Yes	3/8 ^A	3/8 ^A	3/8 ^A	0/8 ^A	2/8 ^A
1K1C	Yes	6/7	4/8	4/8	0/8	4/8

N=7-9 in each group

^Ap<0.05 vs sedentary 2K1C mice

^Bp<0.05 vs sedentary 1K1C mice

^Cp<0.05 vs sedentary sham mice

Figure 1

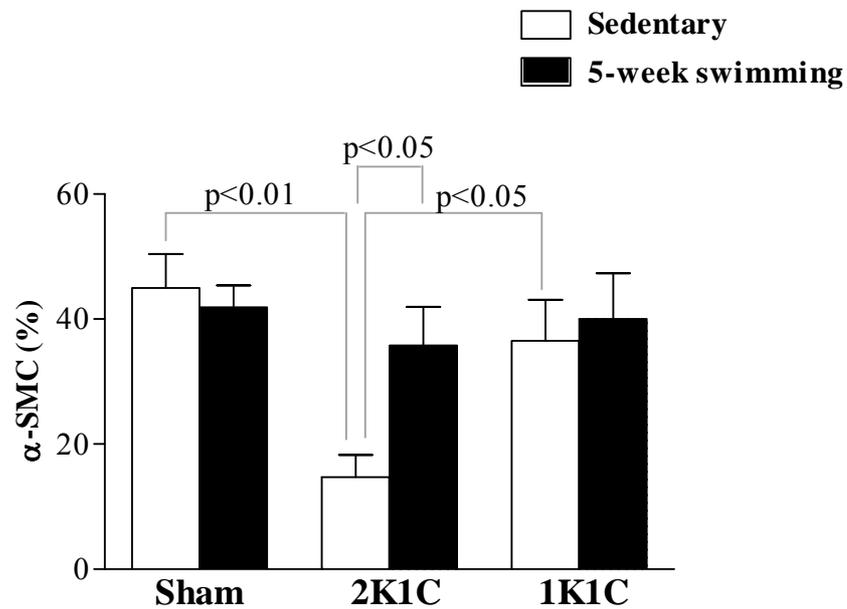


Figure 1. Smooth muscle cell (SMC) plaque content. Fibrous cap SMC content was immunohistochemically quantitated by α -smooth muscle actin (SMA) staining. Sedentary hypertensive 2K1C mice show significantly decreased SMC content, a sign of plaque vulnerability, as compared to sedentary normotensive and similarly hypertensive 1K1C mice. Sedentary normotensive and hypertensive 1K1C animals had similar SMC content. After 5 weeks of swimming hypertensive 2K1C mice presented significantly increased SMC content, not different from that found in sedentary and trained normotensive and hypertensive 1K1C mice. N = 7-12 in each group.

Figure 2

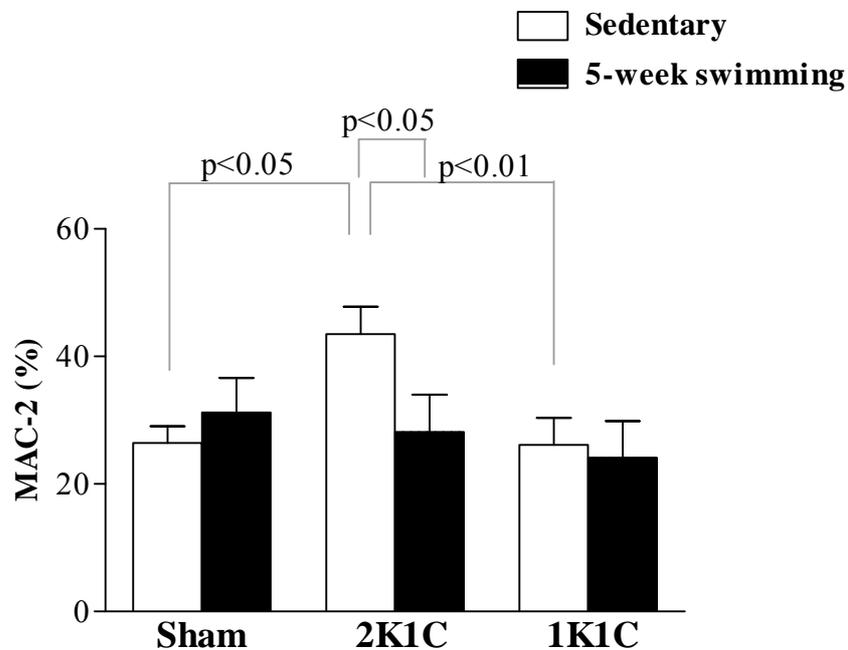


Figure 2. Macrophage plaque content. Plaques macrophage content was immunohistochemically quantitated by MAC-2 staining. Sedentary hypertensive 2K1C mice show significantly increased macrophage content, a sign of plaque vulnerability as compared to sedentary normotensive and similarly hypertensive 1K1C mice. Sedentary normotensive and hypertensive 1K1C animals had similar macrophage content. After 5 weeks of swimming hypertensive 2K1C mice presented significant decrease in macrophage content, not different from that found in sedentary and trained normotensive and hypertensive 1K1C mice. N = 7-12 in each group.

Figure 3

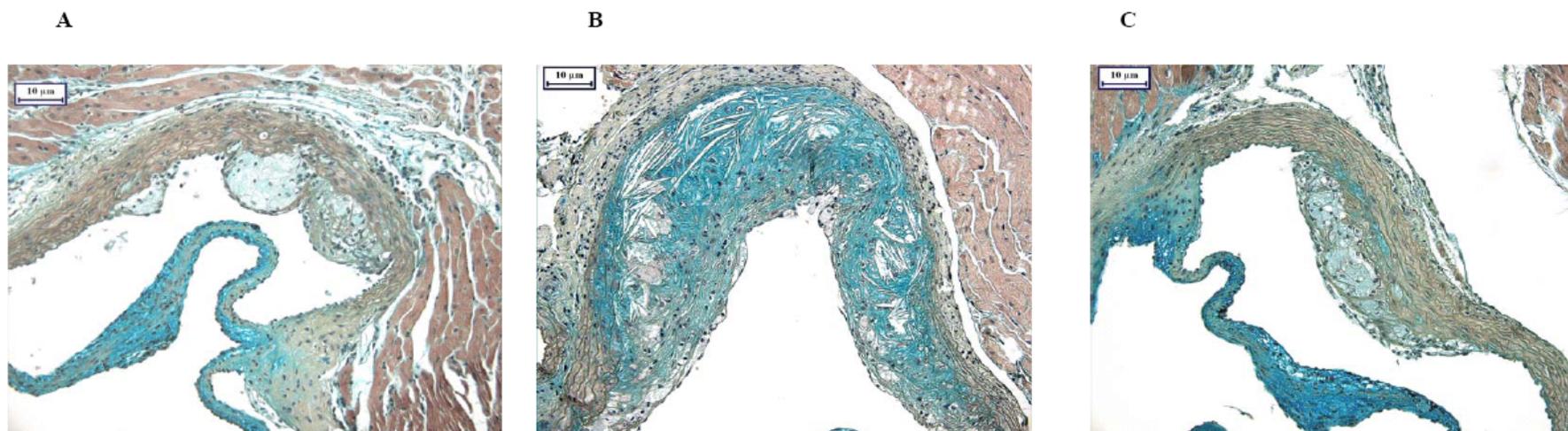


Figure 3. Representative plaques from sedentary sham, sedentary 2K1C, and exercised 2K1C mice. Phenotype of atherosclerotic plaques from aortic sinus in mice was assessed by Movats staining. A, sedentary sham; B, sedentary 2K1C; C, exercised 2K1C. Figure shows advanced staging and signs of plaque vulnerability in sedentary hypertensive 2K1C mice (B). After 5 weeks of swimming plaques show a more stable phenotype similar to that found in sedentary normotensive mice (C).

Figure 4

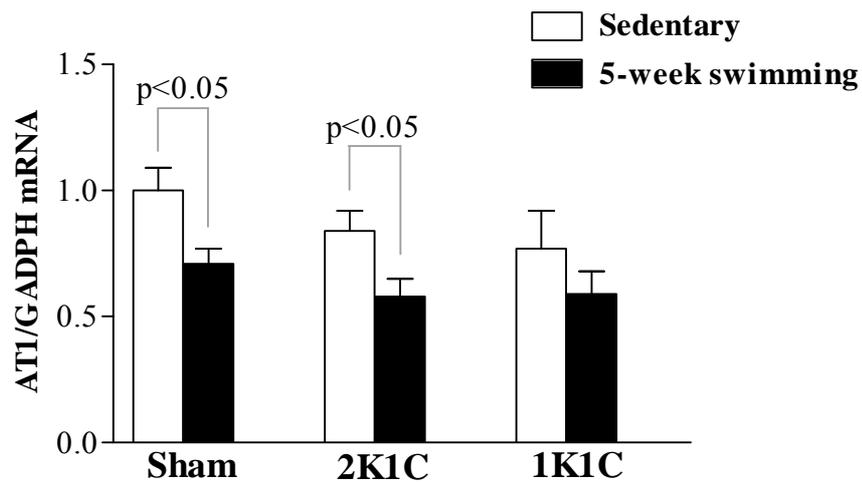


Figure 4. Aortic AT1 receptor mRNA expression. Real time PCR analysis showed a significant decrease in aortic Ang II AT1 receptor mRNA levels in normotensive and hypertensive 2K1C mice. This decrease was also present in hypertensive 1K1C animals although it did not reach statistical significance. AT1 mRNA levels were not different among the various groups of sedentary animals. N = 4 to 10.

Figure 5

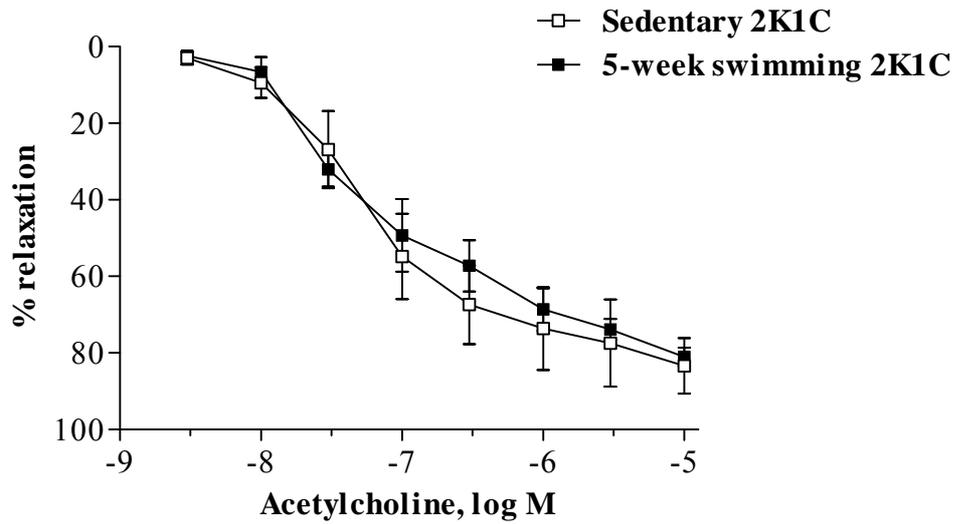


Figure 5. Endothelial function in *Apoe*^{-/-} 2K1C mice. Endothelium-dependent and independent vasorelaxation in isolated aortic rings were studied. Five weeks of swimming did not improve endothelial function in 2K1C mice. N = 5 to 7.

Figure 6

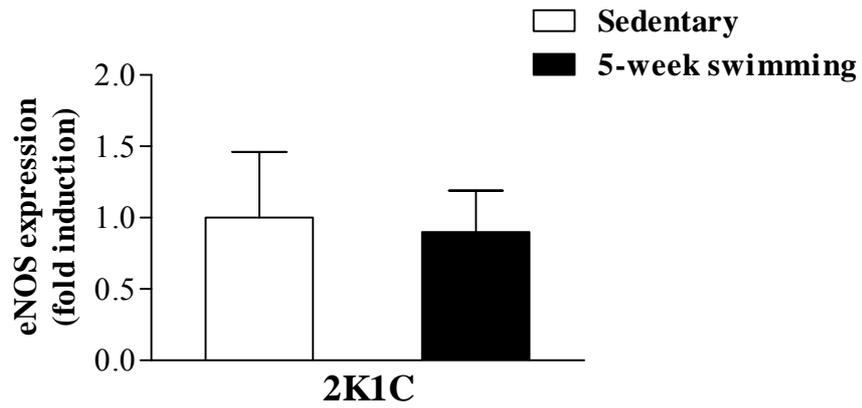


Figure 6. Aortic eNOS mRNA expression. Real time PCR analysis showed no difference in eNOS expression among sedentary and exercised hypertensive 2K1C mice. N = 5 to 7.

Figure 7

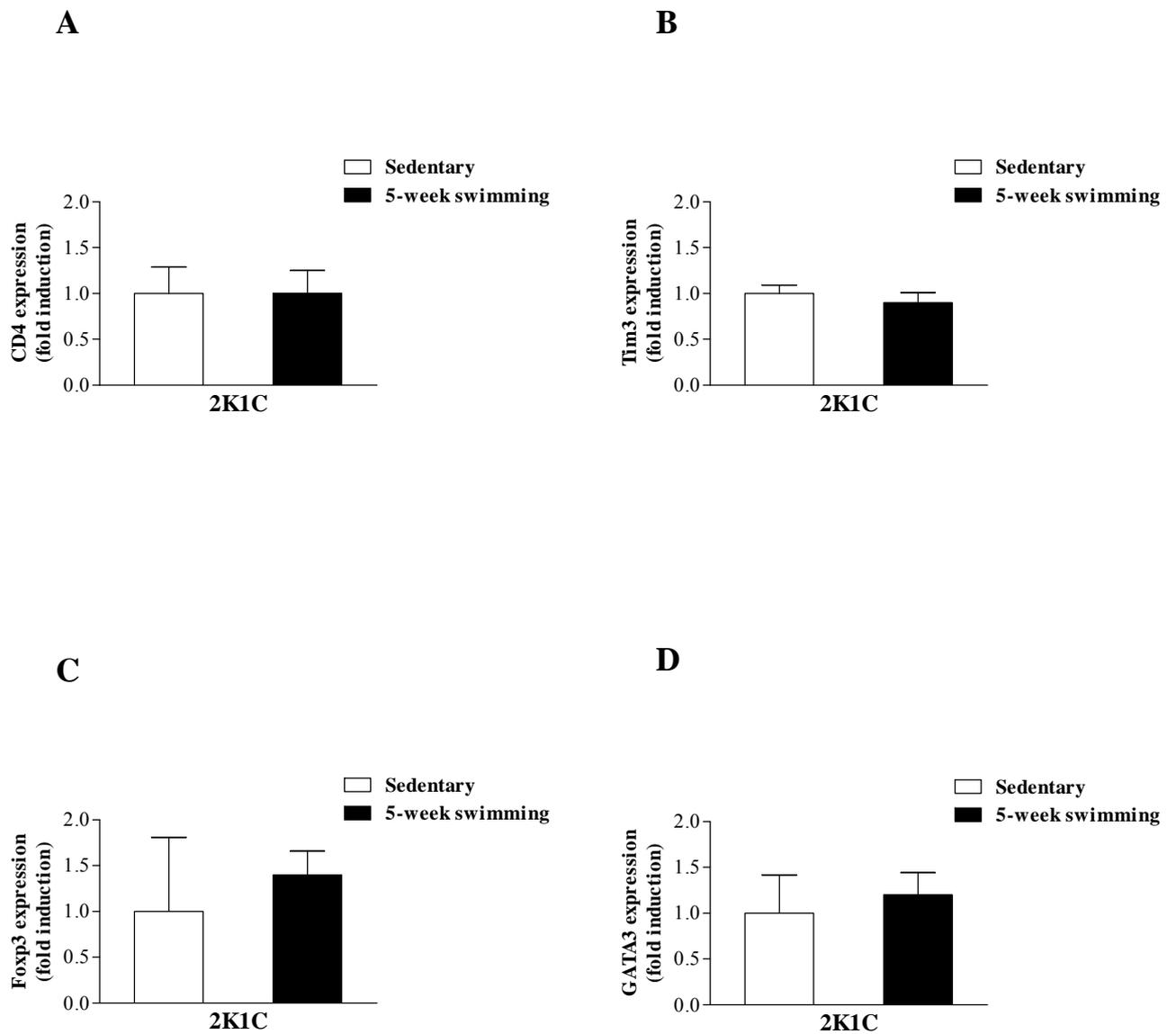


Figure 7. Spleen mRNA expression for T cell markers. The expression of transcripts for markers of T helper cells (CD4, A), Th1 cells (Tim 3, B), Th2 cells (Gata3, C), and regulatory T cells (Foxp3, D) was analyzed by RT PCR in splenocytes from 2K1C mice. N = 4 to 6.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'évolution des modes de vie de la société moderne a complètement modifié le comportement des individus en matière d'activité physique. On estime que 25 à 33% de la population des pays industrialisés mènent une vie sédentaire. Paradoxalement, depuis le début des années 1970, l'industrie du sport s'est considérablement développée et a favorisé l'explosion de la pratique sportive. Le sport est devenu aujourd'hui un vecteur incontournable de l'économie occidentale. Pourtant, sa promotion n'a apporté aucune solution à l'explosion parallèle de la sédentarité et des maladies chroniques. Indépendamment de la corpulence et de l'âge, un faible niveau d'activité physique est un déterminant majeur du risque de développer certaines maladies chroniques cardiovasculaires ou autres (cardiopathies ischémiques, cancer du côlon, cancer du sein, arthrose, ostéoporose). L'inactivité physique, seule, serait à l'origine de 10 à 16% des cancers du sein, du côlon et du rectum, et d'environ 22% des cardiopathies ischémiques. Face aux conséquences individuelles et à l'accroissement des dépenses liés à la sédentarité, le projet de loi relatif à la politique de santé publique (9 août 2004) identifie l'activité physique comme l'un des déterminants majeurs de la santé publique. Dans le cadre du 2^{ème} Programme National Nutrition Santé, la promotion de l'activité physique est l'un des neuf objectifs prioritaires avec, pour but, la recommandation de pratiquer quotidiennement l'équivalent d'au moins une demi-heure d'exercice, au minimum cinq jours par semaine. Malgré la prise de conscience des pouvoirs publics, les actions de promotion et de sensibilisation restent timides et peu efficaces en terme de bénéfice sanitaire. Nous sommes convaincus que la pleine efficacité de la promotion de l'activité physique en temps qu'élément de prévention primaire aura lieu lorsque le monde de la recherche scientifique aura démontré et décortiqué les mécanismes biologiques responsables du bénéfice. En toute modestie, l'ensemble de notre travail apporte une pierre à cet édifice. Nos résultats montrent que l'exercice en endurance régulier est capable de prévenir la dysfonction endothéliale qui est considérée comme l'une des étapes précoces majeures de l'athérogenèse. Nous démontrons également, pour la première fois, que l'exercice améliore la stabilité des plaques et ralentit le développement de la plaque instable via une diminution de l'inflammation et une augmentation des CMLV

au sein de la plaque. Ces résultats n'auraient pu être obtenus sans la découverte et l'utilisation d'un modèle murin avec une hypercholestérolémie et une hypertension rénovasculaire développant des plaques instables (Mazzolai *et al.*, 2004). Ainsi, l'exercice préviendrait la rupture de plaque et par conséquent la survenue des complications cardiovasculaires fatales de l'athérosclérose. Ces résultats ont une forte relevance clinique et pourraient expliquer pourquoi l'exercice diminue la mortalité cardiovasculaire et améliore la qualité de vie des patients à risque cardiovasculaire.

Notre travail éclaire aussi sur les mécanismes vasculaires et moléculaires sous-jacents à l'origine de ces bénéfices. L'exercice prévient la dysfonction endothéliale, principalement via une augmentation de la sensibilité des récepteurs à l'Ach et une activation des événements signalétiques récepteurs-dépendants spécifiques de l'Ach, favorisant ainsi l'action biologique du NO. Concernant l'amélioration de la stabilité de la plaque avec l'exercice, il semblerait que la voie eNOS ne soit pas le mécanisme majeur tout au moins avec l'exercice de longue durée. Ce résultat, pour le moins original, est contraire au courant de pensée scientifique qui revendique le plus souvent l'augmentation de l'expression de la eNOS comme le mécanisme clé à l'origine des effets vasculo-protecteurs de l'exercice. Notre résultat relance la discussion sur la pertinence et le rôle de la voie eNOS avec l'exercice. Nous suggérons que les adaptations moléculaires au niveau des gènes divergent selon la durée de l'exercice. De ce fait, l'augmentation de l'expression de la eNOS pourrait être une adaptation uniquement transitoire qui surviendrait uniquement pendant les premières semaines d'entraînement. A long terme, l'exercice pourrait provoquer un remodelage NO-dépendant qui normaliserait les forces de cisaillement et l'expression de la eNOS. D'autres travaux sont nécessaires pour vérifier cette hypothèse et déterminer l'évolution chronologique des adaptations moléculaires de la eNOS avec l'exercice.

Enfin, en présence d'une hypertension Ang II-dépendante, l'inhibition du développement de la plaque instable est médiée par une sous-régulation de l'expression des récepteurs AT1 indépendamment d'un bénéfice sur les paramètres hémodynamiques. L'exercice agirait comme un antagoniste des récepteurs AT1 de l'Ang II et serait, de ce fait, une

alternative avantageuse aux traitements pharmacologiques proposés aux patients hypertendus qui ont le même mode d'action biologique mais dont les effets secondaires ne sont pas toujours bien connus. Toutefois, les voies signalétiques par lesquelles la diminution de l'expression des récepteurs AT1 amène à prévenir le phénotype instable de la plaque restent à déterminer dans de futurs travaux.

Ainsi, l'exercice, en particulier la nage, serait une thérapie attractive en termes de protection de l'athérosclérose et de la mortalité cardiovasculaire. Il est donc primordial d'encourager dans notre société la pratique d'une activité physique adaptée à la forme physique de chacun.

BIBLIOGRAPHIE

Adams BJ, Carr JG, Ozonoff A, Lauer MS, & Balady GJ (2008). Effect of exercise training in supervised cardiac rehabilitation programs on prognostic variables from the exercise tolerance test. *Am J Cardiol* 101, 1403-1407.

Adams V, Linke A, Krankel N, Erbs S, Gielen S, Mobius-Winkler S, Gummert JF, Mohr FW, Schuler G, & Hambrecht R (2005). Impact of regular physical activity on the NAD(P)H oxidase and angiotensin receptor system in patients with coronary artery disease. *Circulation* 111, 555-562.

Bassuk SS & Manson JE (2005). Epidemiological evidence for the role of physical activity in reducing risk of type 2 diabetes and cardiovascular disease. *J Appl Physiol* 99, 1193-1204.

Blair SN, Kampert JB, Kohl HW, III, Barlow CE, Macera CA, Paffenbarger RS, Jr., & Gibbons LW (1996). Influences of cardiorespiratory fitness and other precursors on cardiovascular disease and all-cause mortality in men and women. *JAMA* 276, 205-210.

Braam B & Verhaar MC (2007). Understanding eNOS for pharmacological modulation of endothelial function: a translational view. *Curr Pharm Des* 13, 1727-1740.

Brevetti G, Schiano V, & Chiariello M (2008). Endothelial dysfunction: a key to the pathophysiology and natural history of peripheral arterial disease? *Atherosclerosis* 197, 1-11.

Buus NH, Jorgensen CG, Mulvany MJ, & Sorensen KE (2007). Large and small artery endothelial function in patients with essential hypertension--effect of ACE inhibition and beta-blockade. *Blood Press* 16, 106-113.

Casillas JM, Gremeaux V, Damak S, Feki A, & Perennou D (2007). Exercise training for patients with cardiovascular disease. *Ann Readapt Med Phys* 50, 403-402.

Chakraphan D, Sridulyakul P, Thipakorn B, Bunnag S, Huxley VH, & Patumraj S (2005). Attenuation of endothelial dysfunction by exercise training in STZ-induced diabetic rats. *Clin Hemorheol Microcirc* 32, 217-226.

Chatzizisis YS, Coskun AU, Jonas M, Edelman ER, Feldman CL, & Stone PH (2007). Role of endothelial shear stress in the natural history of coronary atherosclerosis and vascular remodeling: molecular, cellular, and vascular behavior. *J Am Coll Cardiol* 49, 2379-2393.

Chicco AJ, McCune SA, Emter CA, Sparagna GC, Rees ML, Bolden DA, Marshall KD, Murphy RC, & Moore RL (2008). Low-intensity exercise training delays heart failure and improves survival in female hypertensive heart failure rats. *Hypertension* 51, 1096-1102.

Chironi G, Dosquet C, Del-Pino M, Denarie N, Megnien JL, Drouet L, Bal dit SC, Levenson J, & Simon A (2006). Relationship of circulating biomarkers of inflammation and hemostasis with preclinical atherosclerotic burden in nonsmoking hypercholesterolemic men. *Am J Hypertens* 19, 1025-1031.

de Lemos ET, Reis F, Baptista S, Pinto R, Sepodes B, Vala H, Rocha-Pereira P, Silva AS, & Teixeira F (2007). Exercise training is associated with improved levels of C-reactive protein and adiponectin in ZDF (type 2) diabetic rats. *Med Sci Monit* 13, BR168-BR174.

De FE, Cusi K, Ocampo G, Berria R, Buck S, Consoli A, & Mandarino LJ (2006). Exercise-induced improvement in vasodilatory function accompanies increased insulin sensitivity in obesity and type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 91, 4903-4910.

Dudzinski DM & Michel T (2007). Life history of eNOS: partners and pathways. *Cardiovasc Res* 75, 247-260.

Duerrschmidt N, Stielow C, Muller G, Pagano PJ, & Morawietz H (2006). NO-mediated regulation of NAD(P)H oxidase by laminar shear stress in human endothelial cells. *J Physiol* 576, 557-567.

Fagard RH (2006). Exercise is good for your blood pressure: effects of endurance training and resistance training. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 33, 853-856.

Faxon DP, Fuster V, Libby P, Beckman JA, Hiatt WR, Thompson RW, Topper JN, Annex BH, Rundback JH, Fabunmi RP, Robertson RM, & Loscalzo J (2004). Atherosclerotic Vascular Disease Conference: Writing Group III: pathophysiology. *Circulation* 109, 2617-2625.

Gaesser GA (2007). Exercise for prevention and treatment of cardiovascular disease, type 2 diabetes, and metabolic syndrome. *Curr Diab Rep* 7, 14-19.

Garanty-Bogacka B, Syrenicz M, Syrenicz A, Gebala A, Lulka D, & Walczak M (2005). Serum markers of inflammation and endothelial activation in children with obesity-related hypertension. *Neuro Endocrinol Lett* 26, 242-246.

Garg PK, Tian L, Criqui MH, Liu K, Ferrucci L, Guralnik JM, Tan J, & McDermott MM (2006). Physical activity during daily life and mortality in patients with peripheral arterial disease. *Circulation* 114, 242-248.

Glorian M & Limon I. L'athérosclérose, une maladie inflammatoire. *Revue Francophone des Laboratoires* 389, 43-48. 2007.

Gordon LA, Morrison EY, McGrowder DA, Young R, Fraser YT, Zamora EM, exander-Lindo RL, & Irving RR (2008). Effect of exercise therapy on lipid profile and oxidative stress indicators in patients with type 2 diabetes. *BMC Complement Altern Med* 8, 21.

Graham DA & Rush JW (2004). Exercise training improves aortic endothelium-dependent vasorelaxation and determinants of nitric oxide bioavailability in spontaneously hypertensive rats. *J Appl Physiol* 96, 2088-2096.

Green DJ, Maiorana A, O'Driscoll G, & Taylor R (2004). Effect of exercise training on endothelium-derived nitric oxide function in humans. *J Physiol* 561, 1-25.

Groyer E, Caligiuri G, Laschet-Khallou J, & Nicoletti A (2006). [Immunological aspects of atherosclerosis]. *Presse Med* 35, 475-486.

Hambrecht R, Adams V, Erbs S, Linke A, Krankel N, Shu Y, Baither Y, Gielen S, Thiele H, Gummert JF, Mohr FW, & Schuler G (2003). Regular physical activity improves endothelial function in patients with coronary artery disease by increasing phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 107, 3152-3158.

Hambrecht R, Wolf A, Gielen S, Linke A, Hofer J, Erbs S, Schoene N, & Schuler G (2000). Effect of exercise on coronary endothelial function in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 342, 454-460.

Haskell WL, Lee IM, Pate RR, Powell KE, Blair SN, Franklin BA, Macera CA, Heath GW, Thompson PD, & Bauman A (2007). Physical activity and public health: updated recommendation for adults from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. *Circulation* 116, 1081-1093.

Hu G, Eriksson J, Barengo NC, Lakka TA, Valle TT, Nissinen A, Jousilahti P, & Tuomilehto J (2004). Occupational, commuting, and leisure-time physical activity in relation to total and cardiovascular mortality among Finnish subjects with type 2 diabetes. *Circulation* 110, 666-673.

Joannides R, Bellien J, & Thuillez C (2006). Clinical methods for the evaluation of endothelial function-- a focus on resistance arteries. *Fundam Clin Pharmacol* 20, 311-320.

Kadoglou NP, Iliadis F, Angelopoulou N, Perrea D, Ampatzidis G, Liapis CD, & Alevizos M (2007). The anti-inflammatory effects of exercise training in patients with type 2 diabetes mellitus. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 14, 837-843.

Karasek D, Vaverkova H, Halenka M, Budikova M, & Novoty D (2006). Brachial endothelial function in subjects with familial combined hyperlipidemia and its relationships to carotid artery intima-media thickness. *Int Angiol* 25, 418-426.

Killewich LA, Macko RF, Montgomery PS, Wiley LA, & Gardner AW (2004). Exercise training enhances endogenous fibrinolysis in peripheral arterial disease. *J Vasc Surg* 40, 741-745.

Kolovou G, Anagnostopoulou K, Mikhailidis DP, & Cokkinos DV (2008). Apolipoprotein E knockout models. *Curr Pharm Des* 14, 338-351.

Koutroumpi M, Pitsavos C, & Stefanadis C (2008). The role of exercise in cardiovascular rehabilitation: a review. *Acta Cardiol* 63, 73-79.

Laufs U, Wassmann S, Czech T, Munzel T, Eisenhauer M, Bohm M, & Nickenig G (2005). Physical inactivity increases oxidative stress, endothelial dysfunction, and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25, 809-814.

Leal J, Luengo-Fernandez R, Gray A, Petersen S, & Rayner M (2006). Economic burden of cardiovascular diseases in the enlarged European Union. *Eur Heart J* 27, 1610-1619.

Leitzmann MF, Park Y, Blair A, Ballard-Barbash R, Mouw T, Hollenbeck AR, & Schatzkin A (2007). Physical activity recommendations and decreased risk of mortality. *Arch Intern Med* 167, 2453-2460.

Leon AS (2005). Does long-term aerobic exercise slow progression of atherosclerosis? *Clin J Sport Med* 15, 285-286.

Li TY, Rana JS, Manson JE, Willett WC, Stampfer MJ, Colditz GA, Rexrode KM, & Hu FB (2006). Obesity as compared with physical activity in predicting risk of coronary heart disease in women. *Circulation* 113, 499-506.

Libby P (2002). Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420, 868-874.

Malakul W, Thirawarapan S, Suvitayavat W, & Woodman OL (2008). Type 1 diabetes and hypercholesterolaemia reveal the contribution of endothelium-derived hyperpolarizing factor to endothelium-dependent relaxation of the rat aorta. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 35, 192-200.

Mazzolai L, Duchosal MA, Korber M, Bouzourene K, Aubert JF, Hao H, Vallet V, Brunner HR, Nussberger J, Gabbiani G, & Hayoz D (2004a). Endogenous angiotensin II induces atherosclerotic plaque vulnerability and elicits a Th1 response in ApoE^{-/-} mice. *Hypertension* 44, 277-282.

Meyer AA, Kundt G, Lenschow U, Schuff-Werner P, & Kienast W (2006). Improvement of early vascular changes and cardiovascular risk factors in obese children after a six-month exercise program. *J Am Coll Cardiol* 48, 1865-1870.

Milani RV & Lavie CJ (2007). The role of exercise training in peripheral arterial disease. *Vasc Med* 12, 351-358.

Moien-Afshari F, Ghosh S, Khazaei M, Kieffer TJ, Brownsey RW, & Laher I (2008). Exercise restores endothelial function independently of weight loss or hyperglycaemic status in db/db mice. *Diabetologia* 51, 1327-1337.

Nakase T, Yamazaki T, Ogura N, Suzuki A, & Nagata K (2008). The impact of inflammation on the pathogenesis and prognosis of ischemic stroke. *J Neurol Sci.*

Napoli C, Williams-Ignarro S, de NF, Lerman LO, D'Armiento FP, Crimi E, Byrns RE, Casamassimi A, Lanza A, Gombos F, Sica V, & Ignarro LJ (2006). Physical training and metabolic supplementation reduce spontaneous atherosclerotic plaque rupture and prolong survival in hypercholesterolemic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 10479-10484.

Napoli C, Williams-Ignarro S, de NF, Lerman LO, Rossi L, Guarino C, Mansueto G, Di TF, Pignalosa O, De RG, Sica V, & Ignarro LJ (2004). Long-term combined beneficial effects of physical training and metabolic treatment on atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 8797-8802.

Niebauer J, Hambrecht R, Velich T, Hauer K, Marburger C, Kalberer B, Weiss C, von HE, Schlierf G, Schuler G, Zimmermann R, & Kubler W (1997). Attenuated progression of coronary artery disease after 6 years of multifactorial risk intervention: role of physical exercise. *Circulation* 96, 2534-2541.

Niessner A, Richter B, Penka M, Steiner S, Strasser B, Ziegler S, Heeb-Elze E, Zorn G, Leitner-Heinschink A, Niessner C, Wojta J, & Huber K (2006). Endurance training reduces circulating inflammatory markers in persons at risk of coronary events: impact on plaque stabilization? *Atherosclerosis* 186, 160-165.

Okabe TA, Shimada K, Hattori M, Murayama T, Yokode M, Kita T, & Kishimoto C (2007). Swimming reduces the severity of atherosclerosis in apolipoprotein E deficient mice by antioxidant effects. *Cardiovasc Res* 74, 537-545.

Pedersen BK & Saltin B (2006). Evidence for prescribing exercise as therapy in chronic disease. *Scand J Med Sci Sports* 16 Suppl 1, 3-63.

Peschel T, Sixt S, Beitz F, Sonnabend M, Muth G, Thiele H, Tarnok A, Schuler G, & Niebauer J (2007). High, but not moderate frequency and duration of exercise training induces downregulation of the expression of inflammatory and atherogenic adhesion molecules. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 14, 476-482.

Piedrahita JA, Zhang SH, Hagan JR, Oliver PM, & Maeda N (1992). Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 4471-4475.

Pynn M, Schafer K, Konstantinides S, & Halle M (2004). Exercise training reduces neointimal growth and stabilizes vascular lesions developing after injury in apolipoprotein e-deficient mice. *Circulation* 109, 386-392.

Raj L (2006). Nitric oxide in the pathogenesis of cardiac disease. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 8, 30-39.

Ramachandran S, Penumetcha M, Merchant NK, Santanam N, Rong R, & Parthasarathy S (2005). Exercise reduces preexisting atherosclerotic lesions in LDL receptor knock out mice. *Atherosclerosis* 178, 33-38.

Sasaki JE & dos Santos MG (2006). The role of aerobic exercise on endothelial function and on cardiovascular risk factors. *Arq Bras Cardiol* 87, e226-e231.

Saxton JM, Zwierska I, Hopkinson K, Espigares E, Choksy S, Nawaz S, Walker R, & Pockley AG (2008). Effect of upper- and lower-limb exercise training on circulating soluble adhesion molecules, hs-CRP and stress proteins in patients with intermittent claudication. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 35, 607-613.

Schmieder RE, Hilgers KF, Schlaich MP, & Schmidt BM (2007). Renin-angiotensin system and cardiovascular risk. *Lancet* 369, 1208-1219.

Shimada K, Kishimoto C, Okabe TA, Hattori M, Murayama T, Yokode M, & Kita T (2007). Exercise training reduces severity of atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice via nitric oxide. *Circ J* 71, 1147-1151.

Singh U & Jialal I (2006). Oxidative stress and atherosclerosis. *Pathophysiology* 13, 129-142.

Steiner S, Niessner A, Ziegler S, Richter B, Seidinger D, Pleiner J, Penka M, Wolzt M, Huber K, Wojta J, Minar E, & Kopp CW (2005). Endurance training increases the number of endothelial progenitor cells in patients with cardiovascular risk and coronary artery disease. *Atherosclerosis* 181, 305-310.

Takehita S, Inoue N, Ueyama T, Kawashima S, & Yokoyama M (2000). Shear stress enhances glutathione peroxidase expression in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 273, 66-71.

Uematsu M, Ohara Y, Navas JP, Nishida K, Murphy TJ, Alexander RW, Nerem RM, & Harrison DG (1995). Regulation of endothelial cell nitric oxide synthase mRNA expression by shear stress. *Am J Physiol* 269, C1371-C1378.

Varady KA, St-Pierre AC, Lamarche B, & Jones PJ (2005). Effect of plant sterols and endurance training on LDL particle size and distribution in previously sedentary hypercholesterolemic adults. *Eur J Clin Nutr* 59, 518-525.

Vuori I. Physical Activity and health: Metabolic and cardiovascular issues. *Advances in Physiotherapy*. 9, 50-64. 2007.

Walsh JH, Bilsborough W, Maiorana A, Best M, O'Driscoll GJ, Taylor RR, & Green DJ (2003). Exercise training improves conduit vessel function in patients with coronary artery disease. *J Appl Physiol* 95, 20-25.

Warburton DE, Nicol CW, & Bredin SS (2006). Health benefits of physical activity: the evidence. *CMAJ* 174, 801-809.

Watts K, Beye P, Siafarikas A, Davis EA, Jones TW, O'Driscoll G, & Green DJ (2004a). Exercise training normalizes vascular dysfunction and improves central adiposity in obese adolescents. *J Am Coll Cardiol* 43, 1823-1827.

Watts K, Beye P, Siafarikas A, O'Driscoll G, Jones TW, Davis EA, & Green DJ (2004b). Effects of exercise training on vascular function in obese children. *J Pediatr* 144, 620-625.

Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, Bohm M, & Nickenig G (2005). Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med* 353, 999-1007.

Woodman CR, Turk JR, Rush JW, & Laughlin MH (2004). Exercise attenuates the effects of hypercholesterolemia on endothelium-dependent relaxation in coronary arteries from adult female pigs. *J Appl Physiol* 96, 1105-1113.

Woodman CR, Turk JR, Williams DP, & Laughlin MH (2003). Exercise training preserves endothelium-dependent relaxation in brachial arteries from hyperlipidemic pigs. *J Appl Physiol* 94, 2017-2026.

World Health Organization (2003). Global Strategy on Diet, Physical activity and Health. Chronic disease information sheets. Disponible sur le site : <http://www.who.int/dietphysicalactivity/publications/facts/cvd/en/>.

Zadelaar S, Kleemann R, Verschuren L, de Vries-Van der Weij, van der HJ, Princen HM, & Kooistra T (2007). Mouse models for atherosclerosis and pharmaceutical modifiers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27, 1706-1721.

Zampetaki A, Kirton JP, & Xu Q (2008). Vascular repair by endothelial progenitor cells. *Cardiovasc Res* 78, 413-421.

Zhang J, Ren CX, Qi YF, Lou LX, Chen L, Zhang LK, Wang X, & Tang C (2006). Exercise training promotes expression of apelin and APJ of cardiovascular tissues in spontaneously hypertensive rats. *Life Sci* 79, 1153-1159.

Zoppini G, Targher G, Zamboni C, Venturi C, Cacciatori V, Moghetti P, & Muggeo M (2006). Effects of moderate-intensity exercise training on plasma biomarkers of inflammation and endothelial dysfunction in older patients with type 2 diabetes. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 16, 543-549.

ANNEXES: AUTRES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

- **Prix:** prix de la Société de Physiologie au congrès 2006 de la Société.

- Publications

- **Maxime Pellegrin**, Lucia Mazzolai, Alain Berthelot, Pascal Laurant.
Dysfonction endothéliale et risque cardiovasculaire. L'exercice protège la fonction endothéliale et prévient la maladie cardiovasculaire. Endothelial dysfunction and cardiovascular risk. Exercise protects endothelial function and prevents cardiovascular disease.
Revue générale. Science & Sport. In press (Impact factor 2007: 0.113).
- Jürg Nussberger, Jean-François Aubert, Karima Bouzourene, **Maxime Pellegrin**, Daniel Hayoz, Lucia Mazzolai.
Renin inhibition by aliskiren prevents atherosclerosis progression: comparison with irbesartan, atenolol, and amlodipine.
Hypertension. 2008 May;51(5):1306-11 (Impact factor 2007: 7.2).

- Communications

- **M Pellegrin**, J-F Aubert, K Bouzourene P, J Nussberger, D Hayoz and L Mazzolai.
Exercise training prevents vulnerable plaque in apolipoprotein E-deficient mice (ApoE^{-/-} mice) with Angiotensin II-dependent renovascular hypertension.
Communication orale au congrès annuel de la société Suisse de Cardiologie. Bern, mai 2008.
- **M Pellegrin**, J-F Aubert, K Bouzourene, J Nussberger, D Hayoz and L Mazzolai.
Endothelial vasodilator function is not impaired in mice with renovascular hypertension.
Communication orale au congrès annuel de la société Suisse de cardiologie. Bern, mai 2008.
- J Szostak; C Miguet-Alfonsi; **M Pellegrin**; K Bouzourene; A Berthelot; L Mazzolai; P Laurant.
Swimming reduces atherosclerotic lesions in Apolipoprotein E deficient mice ApoE^{-/-} by increase PPAR- γ expression.
Communication affichée au 13th Annual Congress of the European College of Sport Science. Estoril (Portugal), juillet 2008.
- J Szostak; C Miguet-Alfonsi; **M Pellegrin**; K Bouzourene; A Berthelot; L Mazzolai; P Laurant.
Swimming reduces atherosclerotic lesions in Apolipoprotein E deficient mice ApoE^{-/-} by increase PPAR- γ expression.
Communication orale au Congrès de Physiologie, de Pharmacologie et de Thérapeutique. Clermont-Ferrand, avril 2008.
- **M Pellegrin**, C Miguet-Alfonsi, K Bouzourene, JF Aubert, A Berthelot, L Mazzolai, P Laurant.
Long-term exercise promotes atherosclerotic plaque stability in ApoE^{-/-}: is there a role of the Akt/endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) phosphorylation pathway ?

- Communication orale au 42nd Annual Scientific meeting of the European Society for Clinical Investigation, Geneva (Switzerland), mars 2008.
- F Meziri, D Binda, **M Pellegrin**, A Jacqueson, A Berthelot, P Laurant
Recombinant human erythropoietin affects the physical performance and cardiovascular adaptative function in trained rats with endothelial NO synthase blockade
Communication affichée au 5th European Sports Medicine Congress, Prague (République Tchèque), octobre 2007.
 - **M Pellegrin**, JF Aubert, K Bouzourene, L Mazzolai.
Endothelial vasodilator function is not impaired in mice with renovascular hypertension.
Communication affichée au 42nd Annual Scientific meeting of the European Society for Clinical Investigation, Geneva (Switzerland), mars 2008.
 - P Laurant, **M Pellegrin**, A Berthelot, L Mazzolai.
Prévention de l'athérosclérose par l'exercice : approche expérimentale.
Communication orale (symposium) au 12^{ème} Congrès International de l'Association des Chercheurs en Activité physique et Sportive, Leuven (Belgique), novembre 2007.
 - **M Pellegrin**, P Laurant, J-F Aubert, K Bouzourene, A Berthelot, J Nussberger and L Mazzolai.
Swimming training prevents unstable atherosclerotic plaque in hypercholesterolemic and hypertensive ApoE^{-/-} mice.
Communication orale au 12th Annual Congress of the European College of Sport Science. Jyväskylä (Finlande), juillet 2007.
 - **M Pellegrin**, C Miguët-Alfonsi, V Deckert, K Bouzourene, J-F Aubert, A Berthelot, L Mazzolai and P Laurant.
Effect of a long-term swimming training on lipid profile, eNOS signaling pathway and atherosclerotic plaque morphology in hypercholesterolemic ApoE^{-/-} mice.
Communication affichée au 12th Annual Congress of the European College of Sport Science. Jyväskylä (Finlande), juillet 2007.
 - F Meziri, D Binda, **M Pellegrin**, A Jacqueson, A Berthelot et P Laurant.
Cardiovascular risk of recombinant human erythropoietin appears in trained rats with endothelial NO synthase inhibition.
Communication affichée au 12th Annual Congress of the European College of Sport Science. Jyväskylä (Finlande), juillet 2007.
 - **M Pellegrin**, P Laurant, J-F Aubert, K Bouzourene, A Berthelot, J Nussberger, L Mazzolai.
L'exercice physique améliore la qualité des plaques d'athérosclérose chez un modèle expérimental : la souris génétiquement dépourvue en apolipoprotéine E (ApoE^{-/-}) qui développe des plaques instables.
Communication orale au 6^{ème} colloque Biologie de l'Exercice Musculaire. Clermont-Ferrand, juin 2007.
 - F Meziri, D Binda, **M Pellegrin**, A Jacqueson, A Berthelot et P Laurant.
Le risque cardiovasculaire de l'érythropoïétine (rHuEPO) recombinante humaine chez le rat entraîné dont la NO synthase endothéliale a été inhibée.
Communication orale au 6^{ème} Colloque Biologie de l'Exercice Musculaire ». Clermont-Ferrand, juin 2007
 - L'exercice physique prévient les plaques d'athérosclérose instables chez la souris ApoE^{-/-} hypercholestérolémique et hypertendue.
M Pellegrin, P Laurant, J-F Aubert, K Bouzourene, A Berthelot, J Nussberger, L Mazzolai.
Communication orale au 13^{ème} forum des jeunes chercheurs. Dijon, juin 2007.
 - F Meziri, D Binda, **M Pellegrin**, A Jacqueson, A Berthelot et P Laurant.
Le risque cardiovasculaire de l'érythropoïétine (rHuEPO) recombinante humaine chez le rat entraîné dont la NO synthase endothéliale a été inhibée.
Communication affichée au 13^{ème} forum des jeunes chercheurs. Dijon, juin 2007.

- **M Pellegrin**, J-F Aubert, K Bouzourene, P Laurant, A Berthelot, D Hayoz, L Mazzolai.
Swimming training reduces and stabilizes unstable atherosclerotic plaques in apolipoprotein E knockout mice (apoE^{-/-}) with renovascular hypertension.
Communication orale au Congrès de Physiologie, de Pharmacologie et de Thérapeutique. Toulouse, avril 2007.
- F Meziri, D Binda, **M Pellegrin**, A Berthelot, P Laurant. Cardiovascular risk of recombinant human erythropoietin in trained rats with endothelial NO synthase inhibition.
Communication orale au Congrès de Physiologie, de Pharmacologie et de Thérapeutique. Toulouse, avril 2007.
- **M Pellegrin**, J-F Aubert, K Bouzourene, P Laurant, A Berthelot, D Hayoz, L Mazzolai.
Assessment of endothelial function and vessel wall properties in conduit arteries in mice with renovascular hypertension.
Communication orale au 7^{ème} Congrès de l' Union des Sociétés Suisses des Maladies Vasculaires. Zürich (Suisse), décembre 2006.
- **M Pellegrin**, J-F Aubert, P Laurant, K Bouzourene, A Berthelot, D Hayoz, L Mazzolai.
Renovascular hypertension does not impaired endothelial vasodilator function in conduit arteries in mice.
Communication affichée au 10th joint scientific meeting of the faculties of Biology and Medecine of the Lausanne and Geneva Universities. Changins (Suisse), novembre 2006.
- **M Pellegrin**, J-F Aubert, P Laurant, K Bouzourene, A Berthelot, D Hayoz, L Mazzolai.
Swimming training improves the endothelial vasodilator function and reduces atherosclerotic plaques in Apolipoprotein E knockout mice with renovascular hypertension.
Communication orale au 12th Cardiovascular Biology and Clinical Implications Meeting. Morat-Muntelier (Suisse), octobre 2006.
- **M Pellegrin**, J-F Aubert, P Laurant, K Bouzourene, A Berthelot, D Hayoz, L Mazzolai.
Renovascular hypertension does not impaired endothelial vasodilator function in conduit arteries in mice.
Communication affichée au 12th Cardiovascular Biology and Clinical Implications Meeting. Morat-Muntelier (Suisse), octobre 2006.
- **M Pellegrin**, F Meziri, D Binda, A Berthelot, A Jacqueson, P Laurant.
Cardiovascular (CV) effect of recombinant human erythropoietin administration in trained rats with CV risk factor.
Communication orale au 11th Annual Congress of the European College of Sport Science. Lausanne (Suisse), juillet 2006.
- **M Pellegrin**, A Berthelot, V Deckert, P Laurant.
New insights into the vascular mechanisms underlying the beneficial effect of swimming training on endothelial function in Apolipoprotein E-deficient mice (ApoE^{-/-}).
Communication orale au congrès de la Société Suisse de Cardiologie. Bâle (Suisse), juin 2006.
- **M Pellegrin**, F Meziri, D Binda, A Berthelot, A Jacqueson, P Laurant.
Effet de l'érythropoïétine (EPO) sur la pression artérielle et la vasorelaxation endothélium- et NO-dépendante chez des rats entraînés avec des facteurs de risque cardiovasculaires (CV).
Communication affichée au 33^{ème} Forum des Jeunes Chercheurs. Besançon (France), juin 2006.

- **M Pellegrin**, E Colin, A Berthelot, P Laurant.
Exercise training reverses endothelial dysfunction and modulates vascular morphology of pressurized mesenteric small arteries in rats with chronic Nitric oxide Synthase (NOS) inhibition.
Communication orale au 1^{er} congrès commun Physiologie, Pharmacologie, Thérapeutique. Montpellier (France), avril 2006.
- **M Pellegrin**, A Berthelot, P Laurant.
Amélioration par l'exercice physique chronique de la fonction vasculaire relaxante endothélium- et NO-dépendante de la souris déficiente en apolipoprotéine apoE^{-/-} (modèle expérimental de l'athérosclérose humaine).
Communication affichée au 11^{ème} Congrès International de l'Association des Chercheurs en Activité physique et Sportive, Paris (France), octobre 2005.
- **M Pellegrin**, C Houdayer, A Berthelot, P Laurant.
Regular physical exercise stimulates endothelium-dependent NO-mediated vasorelaxation and reduces the progression of atherosclerotic lesions in hypercholesterolemic apolipoprotein E- deficient mice (apoE^{-/-}).
Communication orale au 10th Annual Congress of the European College of Sport Science, Belgrade (Serbie), juillet 2005.
- E Colin, **M Pellegrin**, D Binda, A Berthelot, N Tordi, P Laurant.
Interaction of exercise training and chronic NOS inhibition on blood pressures, vasodilatation and vascular morphology of pressurized mesenteric small arteries rat.
Communication orale au 10th Annual Congress of the European College of Sport Science, Belgrade (Serbie), juillet 2005.
- **M Pellegrin**, A Berthelot et P Laurant.
L'exercice physique stimule la vasorelaxation endothélium- et NO-dépendante et réduit la taille des lésions athéroscléreuses chez la souris hypercholestérolémique déficiente en apolipoprotéine apoE^{-/-}.
Communication orale au 32^{ème} Forum des Jeunes Chercheurs, Dijon (France), mai 2005.
- E Colin, **M Pellegrin**, D Binda, A Berthelot, N Tordi, P Laurant.
Interaction entre l'exercice physique et l'inhibition chronique de la NOS sur la morphologie vasculaire des artères mésentériques et la pression artérielle chez le rat.
Communication affichée au 32^{ème} Forum des Jeunes Chercheurs, Dijon (France), mai 2005.
- **M Pellegrin**, V Gaume, A Berthelot et P Laurant.
Effet de l'exercice physique sur la fonction endothéliale de l'aorte de la souris hypercholestérolémique apoE^{-/-}.
Communication affichée au 71^{ème} Congrès de la Société de Physiologie, Paris-Bercy (France), septembre 2004.