



**Titre : Exploration des changements de la perméabilité microvasculaire dans le  
tissu adipeux du modèle de rat Zucker obèse**

Par :

Karine Deschesne

Départements de médecine, physiologie et pharmacologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé

En vue de l'obtention du grade de

Maître ès science (M.Sc.) en Pharmacologie

Avril 2008

Comité d'évaluation :

Dr. Pierre Maheux, Pharmacologie (interne)

Dr. Gérard E. Plante, Pharmacologie (interne)

Pr. Fernand Gobeil, Pharmacologie (interne)

Dre. Hélène Bachelard, Département de médecine, Université Laval (externe)



Library and  
Archives Canada

Bibliothèque et  
Archives Canada

Published Heritage  
Branch

Direction du  
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file* *Votre référence*  
*ISBN: 978-0-494-42949-5*  
*Our file* *Notre référence*  
*ISBN: 978-0-494-42949-5*

**NOTICE:**

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

**AVIS:**

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

---

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

  
**Canada**

## TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES ILLUSTRATIONS.....	vi
LISTE DES SIGLES, ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES .....	ix
RÉSUMÉ.....	xi
1 INTRODUCTION.....	1
1.1 Obésité.....	1
1.1.1 Épidémiologie.....	1
1.1.2 Pathologies associées.....	2
1.1.3 Types d'obésité.....	4
1.2 Tissu adipeux.....	4
1.2.1 Généralité .....	5
1.2.2 Distribution du tissu adipeux.....	5
1.2.2.1 Tissu adipeux sous-cutané.....	6
1.2.2.2 Tissu adipeux intra-abdominal .....	7
1.2.3 Tissu adipeux blanc versus brun.....	12
1.2.4 Histologie du tissu adipeux .....	13
1.2.4.1 Adipocytes.....	14
1.2.4.2 Cellules endothéliales.....	15
1.2.4.3 Autres types cellulaires présents dans le tissu adipeux .....	18
1.2.5 Fonctions du tissu adipeux .....	18
1.2.5.1 Fonction d'entreposage .....	18
1.2.5.2 Fonctions endocriniennes .....	20
1.2.5.3 Autres fonctions.....	22
1.3 La microcirculation .....	23
1.3.1 De l'artériole à la veinule .....	23
1.3.2 Les capillaires.....	25
1.3.3 Perméabilité vasculaire et différents facteurs qui la régulent.....	27
1.3.3.1 Oxyde nitrique .....	28
1.3.3.2 Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire .....	32
1.3.3.3 Angiotensine II .....	37

1.4	Modèles animaux d'obésité.....	42
1.4.1	Rats Zucker.....	43
1.4.1.1	Mutation au niveau du récepteur à la leptine.....	44
1.5	Problématique, hypothèses et objectifs du projet.....	46
2	MATÉRIEL ET MÉTHODE.....	49
2.1	Animaux :.....	49
2.2	Prélèvements sanguins et dosages plasmatiques.....	50
2.2.1	Prélèvements sanguins.....	50
2.2.2	Dosages plasmatiques du glucose et des triglycérides.....	50
2.2.3	Dosage de l'insuline plasmatique.....	51
2.2.4	Dosage du VEGF A plasmatique.....	52
2.2.5	Dosages des nitrites et des nitrates plasmatiques.....	54
2.3	Extravasation du Bleu d'Evans et prélèvements des tissus.....	54
2.4	Extraction d'ARN et qRT-PCR.....	56
2.4.1	Extraction d'ARN et dosage.....	56
2.4.2	Réaction de transcription inverse.....	57
2.4.3	PCR quantitatif en temps réel.....	58
2.4.4	Analyses des résultats de qRT-PCR.....	60
2.5	Extraction de protéines et immunobuvardage de type Western.....	62
2.6	Microscopie électronique à transmission.....	64
2.7	Analyses statistiques.....	64
3	RÉSULTATS.....	65
3.1	Caractéristiques des animaux et dosages plasmatiques.....	65
3.2	Extravasation du Bleu d'Evans.....	67
3.2.1	Première série d'expériences au Bleu d'Evans.....	67
3.2.2	Deuxième série d'expériences au Bleu d'Evans.....	69
3.3	PCR quantitatif en temps réel.....	73
3.3.1	Extraction de l'ARN et dosage.....	74
3.3.2	Résultats de la réaction de transcription inverse.....	75
3.3.3	Mise au point et résultats des PCR quantitatifs en temps réel.....	75
3.4	Immunobuvardage de type Western.....	80

3.5	Microscopie électronique à transmission .....	83
4	DISCUSSION.....	87
4.1	Le rat Zucker obèse et ses caractéristiques métaboliques .....	88
4.2	Extravasation du Bleu d'Evans .....	89
4.3	Tissu adipeux sous-cutané.....	92
4.4	Tissu adipeux rétro-péritonéal .....	97
4.5	Tissu adipeux épидидymique.....	100
4.6	Microscopie électronique à transmission .....	103
	CONCLUSIONS .....	106
	LIMITES EXPÉRIMENTALES ET PERSPECTIVES .....	108
	REMERCIEMENTS .....	110
	LISTE DES RÉFÉRENCES.....	111

## LISTE DES ILLUSTRATIONS

### FIGURES

FIGURE 1 : <i>Classification des différents types de dépôts graisseux</i> .....	6
FIGURE 2 : <i>Tissu adipeux mésentérique et épiploïque</i> .....	9
FIGURE 3 : <i>Relation anatomique entre le tissu adipeux viscéral et la veine porte</i> ...	10
FIGURE 4 : <i>Tissu adipeux rétropéritonéal et périrénal</i> .....	11
FIGURE 5 : <i>Histologie du tissu adipeux</i> .....	13
FIGURE 6 : <i>Quatre voies de passage à travers l'endothélium</i> .....	16
FIGURE 7 : <i>Le transport via les cavéoles</i> .....	17
FIGURE 8 : <i>Métabolisme des lipides et du glucose via les adipocytes</i> .....	19
FIGURE 9 : <i>Phénomènes modulés par les différentes adipokines</i> .....	20
FIGURE 10 : <i>Réseau capillaire ouvert et fermé</i> .....	25
FIGURE 11 : <i>Trois types de capillaires</i> .....	26
FIGURE 12 : <i>Molécules et facteurs sécrétés par la cellule endothéliale</i> .....	27
FIGURE 13 : <i>Production de monoxyde d'azote par l'enzyme NO synthétase</i> .....	28
FIGURE 14 : <i>Mécanisme d'activation de la eNOS</i> .....	30
FIGURE 15 : <i>Isoformes formées par épissage alternatif du VEGF A</i> .....	33
FIGURE 16 : <i>Spécificité des récepteurs au VEGF et leurs fonctions selon la voie de signalisation empruntée</i> .....	35
FIGURE 17 : <i>Synthèse et dégradation de l'angiotensine II par la voie RAS et la voie NRAS</i> .....	39
FIGURE 18 : <i>Cascade de signalisation de l'Ang II via son récepteur AT<sub>1</sub>R sur les cellules musculaires lisses vasculaires</i> .....	41
FIGURE 19 : <i>Courbes de croissance des rats Zucker obèses versus maigres</i> .....	45
FIGURE 20 : <i>Hypothèses du projet</i> .....	47
FIGURE 21 : <i>Condition de PCR quantitatif en temps réel et activation du fluorochrome, SYBR Green</i> .....	59
FIGURE 22 : <i>Exemple de graphique obtenu suite à un PCR quantitatif en temps réel</i> .....	61

FIGURE 23 : Extravasation du Bleu d'Evans dans les organes prélevés lors de la première expérience .....	68
FIGURE 24 : Extravasation du Bleu d'Evans dans trois différents types de tissu adipeux .....	69
FIGURE 25 : Extravasation du Bleu d'Evans dans les organes prélevés lors de la deuxième expérience.....	70
FIGURE 26 : Extravasation du Bleu d'Evans dans les six différents types de tissus adipeux .....	73
FIGURE 27 : Migration du produit de l'extraction d'ARN de tissus adipeux sous-cutanés sur gel d'agarose.....	74
FIGURE 28 : Résultats des qRT-PCR eNOS, AT <sub>1a</sub> R et VEGF <sub>164</sub> avec le contrôle de $\beta$ -actine : Courbes d'amplification et courbes de dénaturation.....	77
FIGURE 29 : Migration sur gel d'agarose du produit de la réaction de PCR quantitatif en temps réel avec les amorces spécifiques à $\beta$ -actine, à eNOS, à AT <sub>1a</sub> R et à VEGF <sub>164</sub> à partir de tissus adipeux rétropéritonéaux .....	78
FIGURE 30 : PCRs quantitatifs en temps réel des gènes eNOS, AT <sub>1a</sub> R et VEGF <sub>164</sub> dans les tissus adipeux sous-cutanés (TA SC) et rétropéritonéaux (TA RP) analysés avec la méthode du $2^{-\Delta\Delta C_t}$ .....	79
FIGURE 31 : Immunobuvardage de type Western pour les protéines eNOS, AT <sub>1a</sub> R, VEGF <sub>164b</sub> et VEGF A (188, 164 et 120) pour les tissus adipeux sous-cutané (a), rétropéritonéal (b) et épидидymique (c). .....	83
FIGURE 32 : Cellules endothéliales des divers tissus adipeux de rats Zucker Fa/? et fa/fa prises par microscopie électronique à transmission.....	85
FIGURE 33 : Jonctions des cellules endothéliales et adipocytes du tissu adipeux sous-cutané prises par microscopie électronique à transmission .....	86
FIGURE 34 : Histogramme démontrant les changements de la perméabilité vasculaire, d'expression d'ARN et protéique en pourcentage dans le tissu adipeux sous-cutané .....	92
FIGURE 35 : Récapitulation des résultats obtenus au niveau de l'expression protéique des facteurs étudiés et en perméabilité vasculaire dans le tissu adipeux sous-cutané du rat Zucker fa/fa obèse.....	97

FIGURE 36 : Histogramme démontrant les changements de la perméabilité vasculaire, d'expression d'ARN et protéique en pourcentage dans le tissu adipeux rétropéritonéal.....	98
FIGURE 37 : Récapitulation des résultats obtenus au niveau de l'expression protéique des facteurs étudiés et en perméabilité vasculaire dans le tissu adipeux rétropéritonéal du rat Zucker fa/fa obèse. ....	100
FIGURE 38 : Histogramme démontrant les changements de la perméabilité vasculaire, d'expression d'ARN et protéique en pourcentage dans le tissu adipeux épидидymique.....	101
FIGURE 39 : Récapitulation des résultats obtenus au niveau de l'expression protéique des facteurs étudiés et en perméabilité vasculaire dans le tissu adipeux épидидymique du rat Zucker fa/fa obèse. ....	102
FIGURE 40 : Schématisation des résultats obtenus en perméabilité vasculaire et en expression protéique pour chacun des sous-types de tissu adipeux.....	103

## TABLEAUX

TABLEAU 1 : Classification des adultes en fonction de l'IMC.....	1
TABLEAU 2 : Prévalence de l'hypertension, du diabète et de la maladie cardiaque, selon la catégorie d'IMC chez l'adulte (plus de 18 ans) vivant au Canada .....	3
TABLEAU 3 : Différences régionales des divers tissus adipeux.....	8
TABLEAU 4 : Comparaison entre les adipocytes blancs et les adipocytes bruns.....	15
TABLEAU 5 : Différents facteurs et leur niveau de sécrétion selon le sous-type de tissu adipeux .....	21
TABLEAU 6 : Caractéristiques des vaisseaux sanguins de l'artériole à la veinule....	24
TABLEAU 7 : Amorces utilisées pour les qRT-PCRs et la taille des amplicons.....	60
TABLEAU 8 : Conditions des immunobuvardages selon la protéine étudiée.....	63
TABLEAU 9 : Caractéristiques des animaux et données métaboliques .....	66
TABLEAU 10 : Valeurs des coefficients de variation pour chacun des résultats de BE obtenus dans les six types de tissus adipeux prélevés lors de la deuxième expérience	72
TABLEAU 11 : Valeurs des variations d'efficacité du PCR pour chacune des paires d'amorces par rapport au gène de référence ( $\beta$ -actine) .....	76

## LISTE DES SIGLES, ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES

aa :	Acide aminé
ADNc :	ADN complémentaire
Ang :	Angiotensine
AT <sub>1</sub> R :	Récepteur de l'angiotensine II de type 1
AT <sub>1a</sub> R :	Récepteur de l'angiotensine II de type 1a
BE :	Bleu d'Evans
eNOS :	NO synthétase endothéliale
Épi :	Épididymique
Fa/? :	Rat Zucker contrôle
fa/fa :	Rat Zucker obèse
GTP :	Guanosine triphosphate
IL :	Interleukine
IMC :	Indice de masse corporelle
iNOS :	NO synthétase inductible
M :	Mésentérique
nNOS :	NO synthétase neuronale
NO :	Monoxyde d'azote ou oxyde nitrique
NO <sub>2</sub> :	Nitrites
NO <sub>3</sub> :	Nitrates
NO <sub>x</sub> :	Nitrites / Nitrates
NRAS :	Système de synthèse de l'angiotensine indépendant de la rénine
OM :	Épiploïque (omental)
pb :	Paires de base
PCR :	Réaction de polymérisation en chaîne
PR :	Périrénal
qRT-PCR :	PCR quantitatif en temps réel
RAS :	Système rénine-angiotensine
RP :	Rétropéritonéal

RPM :	Rotation par minute
RT :	Transcription inverse
SC :	Sous-cutané
SEM :	«Standard error of mean», erreur standard de la moyenne
TA :	Tissu adipeux
TP :	Température pièce
VEGF :	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VEGFR :	Récepteur du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

## RÉSUMÉ

### «Exploration des changements de la perméabilité microvasculaire dans le tissu adipeux du modèle de rat Zucker obèse»

Départements de médecine, physiologie et pharmacologie

Université de Sherbrooke

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé, en vue de l'obtention du grade de Maître ès science (M.Sc.) en Pharmacologie.

Karine Deschesne, janvier 2008

À l'heure actuelle, l'obésité est une pathologie qui prend de l'ampleur. Elle est associée à maintes pathologies, dont la résistance à l'insuline et la dysfonction endothéliale. Selon les lits vasculaires, les impacts de ces phénomènes peuvent avoir des conséquences physiologiques importantes. Précédemment, nous avons démontré qu'il y avait une augmentation de 30 à 50% de la perméabilité endothéliale dans le muscle strié du modèle de rat Zucker obèse.

Pour sa part, le tissu adipeux est unique de par ses fonctions métaboliques, endocrines et sa microcirculation. Trois facteurs impliqués dans le contrôle de la microcirculation et de la perméabilité vasculaire dans ce tissu nous ont intéressés: le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire, la NO synthétase endothéliale et l'angiotensine II via son récepteur de type 1.

Tout d'abord, le VEGF est reconnu pour augmenter l'angiogénèse et la perméabilité vasculaire. La eNOS est une enzyme qui produit le NO à partir de la L-arginine. En dehors de son rôle classique de vasorelaxation, le NO stimule l'expression du VEGF

et parallèlement, le VEGF active la production de NO : il y a donc synergie entre ces deux facteurs. L'angiotensine II est un peptide qui engendre une forte vasoconstriction, via son récepteur AT<sub>1</sub>R.

Notre hypothèse de recherche est que la microcirculation du tissu adipeux possède un rôle primordial dans l'obésité, étant donné que celui-ci tient une place importante sur le plan métabolique et endocrinien. Nos objectifs ont consisté à évaluer s'il y avait des changements dans la perméabilité endothéliale chez le rat Zucker obèse par la méthode du Bleu d'Evans, par des mesures de l'expression des trois facteurs étudiés (Western et qRT-PCR) et par l'observation en microscopie électronique des caractéristiques morphologiques des cellules endothéliales, dans les divers types de tissus adipeux (sous-cutané, rétropéritonéal et épидидymique).

Nos résultats ont démontré qu'il existe une grande hétérogénéité dans la perméabilité des divers sous-types de tissu adipeux. Contrairement aux autres organes, cette perméabilité est majoritairement à la baisse. De plus, nos expériences ont permis d'observer plusieurs changements significatifs dans l'expression protéique de la eNOS, de l'AT<sub>1</sub>R et du VEGF A et ceci, principalement dans le tissu adipeux sous-cutané. Les changements protéiques de ces trois facteurs ne corrèlent pas exactement avec les changements de perméabilité observés avec le Bleu d'Evans, ce qui nous permet d'affirmer que la régulation de la perméabilité vasculaire est régulée par une myriade d'autres facteurs. D'autre part, les résultats préliminaires obtenus en microscopie électronique ne nous ont pas permis d'identifier de changements marquants au niveau de la morphologie des cellules endothéliales. Ceci suggère que les changements de perméabilité ne sont pas la conséquence de changements

morphologiques, mais plutôt fonctionnels et en relation avec différents facteurs vasoactifs.

En somme, nos résultats ont permis d'établir qu'il y a une grande hétérogénéité entre les divers sous-types de tissu adipeux, au point de vue de la perméabilité et de l'expression de certains facteurs vasoactifs. De plus, ces expériences nous ont démontré que le contrôle de la perméabilité vasculaire est un phénomène très complexe qui implique une multitude de phénomènes. La compréhension de ces derniers [phénomènes] dans le tissu adipeux pourrait permettre l'élaboration de traitements ayant la capacité de limiter l'expansion de ce tissu en diminuant sa perméabilité vasculaire, ceci afin de restreindre les effets néfastes liés à l'obésité.

Mots clés : tissu adipeux, microcirculation, perméabilité vasculaire, oxyde nitrique synthétase type III, facteur de croissance endothéliale vasculaire de type A

# 1 INTRODUCTION

## 1.1 Obésité

### 1.1.1 Épidémiologie

L'obésité est un problème de santé publique qui prend de l'ampleur depuis déjà quelques années et rivalise avec la consommation de tabac comme cause de décès prématuré (LE PETIT, 2006). L'obésité est définie, selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS, 1997), comme étant une maladie où l'accumulation excessive de masse grasse a des effets indésirables sur la santé. La mesure couramment utilisée pour identifier l'obésité est l'indice de masse corporelle (IMC), obtenu en divisant le poids (kg) par la taille mise au carré (m<sup>2</sup>). Basée sur l'IMC, une classification a été élaborée mettant en relation le poids et le risque pour la santé (tableau 1).

TABLEAU 1 : Classification des adultes en fonction de l'IMC

IMC		
Catégorie	Fourchette	Risque pour la santé
Insuffisance pondérale	< 18,5	Accru
Poids normal	de 18,5 à 24,9	Moindre
Embonpoint	de 25,0 à 29,9	Accru
Obésité de classe I	de 30,0 à 34,9	Élevé
Obésité de classe II	de 35,0 à 39,9	Très élevé
Obésité de classe III	≥ 40,0	Extrêmement élevé

(tiré de TJEPKEMA, 2006)

«Selon les données de l'enquête sur la santé dans les collectivités canadiennes de 2004, 23,1% des Canadiens de 18 ans et plus, soit environ 5,5 millions d'adultes, [...] étaient obèses.» (TJEPKEMA, 2006). Entre 1978 et 2004, la proportion de gens obèses âgés entre 25 et 34 ans est passée de 8,5% à 20,5%, ce qui représente une

augmentation de plus du double (TJEPKEMA, 2006). Cette augmentation de la prévalence de l'obésité est observée partout dans le monde autant dans les pays industrialisés que dans les pays en développement, atteignant quasiment des niveaux épidémiques. Le plus inquiétant reste que ce problème progresse rapidement chez l'enfant (OMS, 1997). Cela aura des conséquences importantes dans le futur, étant donné que près du deux tiers des enfants obèses resteront obèses à l'âge adulte, ce qui entraîne l'apparition de troubles associés au surpoids. (WHITAKER, WRIGHT *et al.*, 1997).

### **1.1.2 Pathologies associées**

L'obésité est un facteur de risque pour de multiples pathologies, telles le diabète de type 2, les maladies cardiovasculaires, l'hypertension et des problèmes psychologiques (TJEPKEMA, 2006). Plusieurs études au cours des dernières années ont démontré qu'il y avait une corrélation entre l'obésité et le risque de présenter un diabète de type 2 (COLLINS, DOWSE *et al.*, 1994) (HARTZ, RUPLEY *et al.*, 1983). Certaines études vont jusqu'à conclure que le risque augmente continuellement avec l'IMC et qu'une perte de poids pourrait diminuer les chances de développer une pathologie associée (OMS, 1997). L'obésité est également un facteur de prédisposition à l'hypertension artérielle, au diabète, à la cardiopathie coronarienne et à l'accident vasculaire cérébral (tableau 2) (OMS, 1997). Aussi, depuis quelques années, un nouveau syndrome fut associé à l'obésité : le syndrome métabolique. Ce dernier correspond à un état de résistance à l'insuline accompagné de plusieurs

facteurs de risque de maladies cardiovasculaires. Ces facteurs sont l'obésité abdominale, l'intolérance au glucose, l'hypertension et la dyslipidémie; chacun contribuant aux anomalies métaboliques et vasculaires (JOHNSON et WEINSTOCK, 2006). L'obésité, à elle seule, entraîne l'apparition précoce des maladies mentionnées ci-haut et ainsi, diminue la qualité de vie des gens qui souffrent de surpoids. De plus, la localisation de l'accumulation de la graisse est un facteur important dans les risques associés à l'obésité (WAJCHENBERG, 2000).

TABLEAU 2 : Prévalence de l'hypertension, du diabète et de la maladie cardiaque, selon la catégorie d'IMC chez l'adulte (plus de 18 ans) vivant au Canada

Catégorie d'IMC (fourchette)	Hommes		Femmes
	et femmes	Hommes	
	%	%	%
<b>Hypertension</b>			
Poids normal (de 18,5 à 24,9)	8,7	7,9 <sup>E</sup>	9,2
Embonpoint (sans obésité) (de 25,0 à 29,9)	15,1*	15,1*	15,2*
Obésité, classe I (de 30,0 à 34,9)	23,7*	22,1*	25,5*
Obésité, classe II (de 35,0 à 39,9)	30,1*	32,5* <sup>E</sup>	28,0*
Obésité, classe III (≥ 40,0)	29,5*	28,1* <sup>E</sup>	30,1*
<b>Diabète</b>			
Poids normal (de 18,5 à 24,9)	2,2	2,1 <sup>E</sup>	2,2 <sup>E</sup>
Embonpoint (sans obésité) (de 25,0 à 29,9)	4,3*	3,7*	5,2* <sup>E</sup>
Obésité, classe I (de 30,0 à 34,9)	9,9*	11,0* <sup>E</sup>	8,6*
Obésité, classes II et III (≥ 35,0)	12,0*	14,1* <sup>E</sup>	10,5* <sup>E</sup>
<b>Maladie cardiaque</b>			
Poids normal (de 18,5 à 24,9)	3,0	2,8	3,1
Embonpoint (sans obésité) (de 25,0 à 29,9)	5,2*	6,0*	4,2
Obésité, classe I (de 30,0 à 34,9)	7,2*	7,7* <sup>E</sup>	6,6* <sup>E</sup>
Obésité, classes II et III (≥ 35,0)	6,7* <sup>E</sup>	7,9* <sup>E</sup>	5,8 <sup>E</sup>

Source des données: Enquête sur la santé dans les collectivités canadiennes : Nutrition, 2004

\* Valeur significativement différente de l'estimation pour le poids normal ( $p < 0,05$ ).

<sup>E</sup> Coefficient de variation compris entre 15,6 % et 33,3 % (interpréter avec prudence).

(tiré de TJEKEMA, 2006)

### **1.1.3 Types d'obésité**

L'obésité peut être divisée en deux sous-types selon la localisation des graisses, soit l'obésité gynoïde et l'obésité androïde. L'obésité gynoïde correspond à une accumulation des graisses en périphérie des membres, particulièrement au niveau des cuisses. Cette obésité est aussi appelée de type poire et elle est principalement retrouvée chez les femmes. L'accumulation de graisses se fait au niveau du tissu adipeux sous-cutané essentiellement.

L'obésité androïde, quant à elle, est caractérisée par une accumulation de graisses préférentiellement à la région abdominale. Ce type d'obésité, aussi nommé de type pomme, est plus souvent observé chez les hommes (OMS, 1997). L'obésité androïde est beaucoup plus nocive que l'obésité gynoïde, car l'accumulation des graisses se fait de façon prédominante dans le tissu adipeux intra-abdominal, tissu métaboliquement plus actif que le tissu adipeux sous-cutané. (JOHNSON et WEINSTOCK, 2006). Par conséquent, c'est majoritairement avec ce type d'obésité que l'on retrouve les différentes pathologies décrites précédemment.

## ***1.2 Tissu adipeux***

Tous les mammifères sans exception et certaines autres espèces animales, comme les oiseaux, possèdent du tissu adipeux, permettant l'entreposage de lipides comme source d'énergie (HAUSMAN, DIGIROLAMO *et al.*, 2001).

### **1.2.1 Généralité**

Depuis déjà quelques décennies, le tissu adipeux est un organe ayant pris de la popularité comme sujet de recherche. Les différents résultats obtenus par maints groupes de recherche et l'avancement dans le domaine de la biologie moléculaire ont permis d'attribuer au tissu adipeux de nouveaux rôles métaboliques. Ainsi, ce tissu n'est maintenant plus uniquement considéré comme un site d'entreposage des graisses (AVRAM, AVRAM *et al.*, 2005). Chez un homme de poids normal, la masse grasse correspond à environ 9 à 18% de la masse corporelle totale, tandis que chez la femme, le pourcentage est légèrement plus élevé (14-28%). Dans des situations extrêmes, ces valeurs peuvent atteindre des seuils de 2 à 3% chez des athlètes extrêmement musclés et 60 à 70% chez des individus atteints d'obésité morbide (HAUSMAN, DIGIROLAMO *et al.*, 2001).

### **1.2.2 Distribution du tissu adipeux**

La nomenclature des différents dépôts graisseux se fait selon leur localisation (figure 1). Les deux grandes classes de tissus adipeux sont le tissu adipeux (TA) sous-cutané et le tissu adipeux intra-abdominal, parfois aussi appelé TA viscéral (AVRAM, AVRAM *et al.*, 2005).

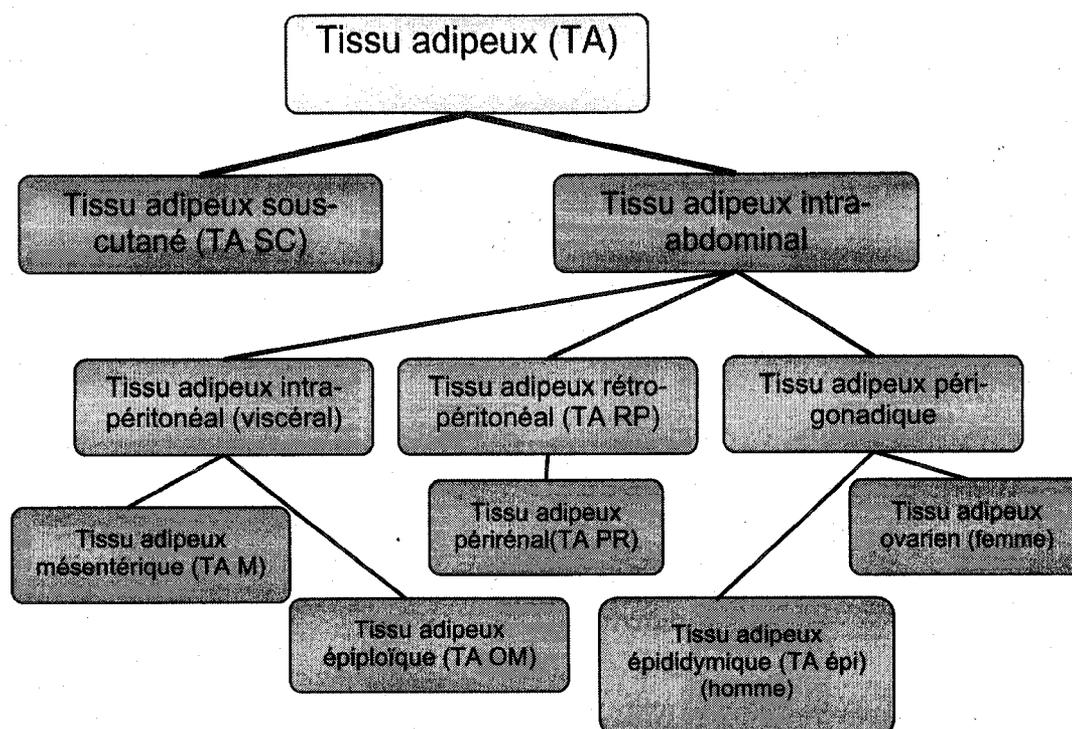


FIGURE 1 : *Classification des différents types de dépôts graisseux*

Classification de la nomenclature pour les différents types de dépôts graisseux, ainsi que les abréviations utilisées dans ce projet de maîtrise.

### 1.2.2.1 Tissu adipeux sous-cutané

Il est maintenant reconnu que le tissu adipeux sous-cutané (TA SC) fait partie intégrante des composantes de la peau (AVRAM, AVRAM *et al.*, 2005). Ce tissu adipeux correspond aux dépôts de graisses qui se retrouvent directement sous le derme. Le TA SC peut être subdivisé en deux sous-types : le TA SC superficiel, directement sous le derme, et le TA SC profond, entre le TA SC superficiel et le muscle (AVRAM, AVRAM *et al.*, 2005). Chez le rongeur, il y a deux dépôts sous-cutanés principaux : l'antérieur et le postérieur. Le dépôt antérieur est celui qui part de la base des membres avant, recouvrant la région dorsale près des omoplates, tandis que le dépôt postérieur est

localisé à la base des membres postérieurs, du pubis au fessier et jusqu'à la région lombaire (CINTI, 2005). Chez l'homme, une étude effectuée auprès de 130 individus a démontré que les femmes de moins de 60 ans ont une accumulation de graisses prédominante au niveau du tissu adipeux sous-cutané de la région abdominale autant chez les femmes minces que chez les obèses. En effet, le ratio du TA SC abdominal sur le TA viscéral est de deux à trois fois plus élevé chez la jeune femme que chez le jeune homme (ENZI, GASPARO *et al.*, 1986).

### **1.2.2.2 Tissu adipeux intra-abdominal**

Le tissu adipeux intra-abdominal comprend tous les dépôts graisseux qui se retrouvent dans la cavité abdominale. Il englobe le tissu adipeux intrapéritonéal, couramment nommé viscéral et le tissu adipeux rétropéritonéal. Ces derniers sont séparés par la surface inférieure des intestins et la surface supérieure des reins. Il contient également le tissu adipeux périgonadique (WAJCHENBERG, 2000). Il faut rester vigilant, car selon les auteurs, la nomenclature «tissu adipeux viscéral» peut correspondre soit aux TA intra-abdominal soit plus spécifiquement au TA intrapéritonéal. Le TA intra-abdominal, en comparaison avec le TA SC, possède un nombre plus important d'adipocytes par unité de masse, ainsi qu'une vascularisation et une lipolyse plus importantes, le rendant plus vulnérable aux changements dans l'entreposage des lipides (OMS, 1997). Il existe des différences majeures dans le métabolisme des divers tissus intra-abdominaux tant au niveau du débit sanguin qu'au niveau de leurs capacités prolifératives (tableau 3) (HAUSMAN, DIGIROLAMO *et al.*, 2001).

TABLEAU 3 : Différences régionales des divers tissus adipeux

Dépôt	Blood flow		Proliferative capacity - Precursor cells	Growth modality hypertrophy > hyperplasia	Innervation density
	Fed	Fasted			
Mesenteric	+++	+++++	+	++++	++++
Epicidymal	++	++++	++	+++	+++
Retroperitoneal	++	+++	+++	++	++
Inguinal	+	+	++++	+	+

(tiré de : HAUSMAN, DIGIROLAMO *et al.*, 2001)

#### 1.2.2.2.1 Tissu adipeux intrapéritonéal

Chez l'humain, le tissu adipeux intrapéritonéal est le tissu majoritaire dans la composition du TA intra-abdominal, il correspond à 10 à 15% de la masse grasse totale (DESPRÉS, DALLONGEVILLE *et al.*, 2007). Il comprend deux sous-types de tissus adipeux, le TA mésentérique (TA M) et le TA épiploïque ou omental (TA OM) (AVRAM, AVRAM *et al.*, 2005). Le TA M est situé entre les anses de l'intestin, tandis que le TA OM est le tissu adipeux du tablier graisseux du grand épiploon, attaché à l'estomac, recouvrant les intestins (figure 2). Les adipocytes du TA M ont une plus petite taille, mais ils métabolisent le glucose à un taux supérieur par rapport aux adipocytes des autres dépôts graisseux (HAUSMAN, DIGIROLAMO *et al.*, 2001). Par contre, chez les rongeurs, la proportion du tissu adipeux épiploïque est beaucoup moindre que chez l'homme (CINTI, 2005).

La caractéristique majeure qui différencie le tissu adipeux viscéral de tous les autres sous-types est qu'il est l'unique tissu adipeux à se drainer directement dans la veine porte, veine qui apporte le sang au foie pour être épuré (figure 3) (JOHNSON et WEINSTOCK, 2006). De plus, le tissu adipeux viscéral est un tissu métaboliquement plus actif que le tissu adipeux sous-cutané, car les niveaux d'activité de la lipolyse y

sont plus élevés dans les adipocytes épiploïques et mésentériques; ceci contribue à l'augmentation des niveaux d'acides gras libres dans la circulation systémique. C'est également pour cette raison que le tissu adipeux viscéral est plus sensible à une réduction du poids que le tissu adipeux sous-cutané (WAJCHENBERG, 2000).

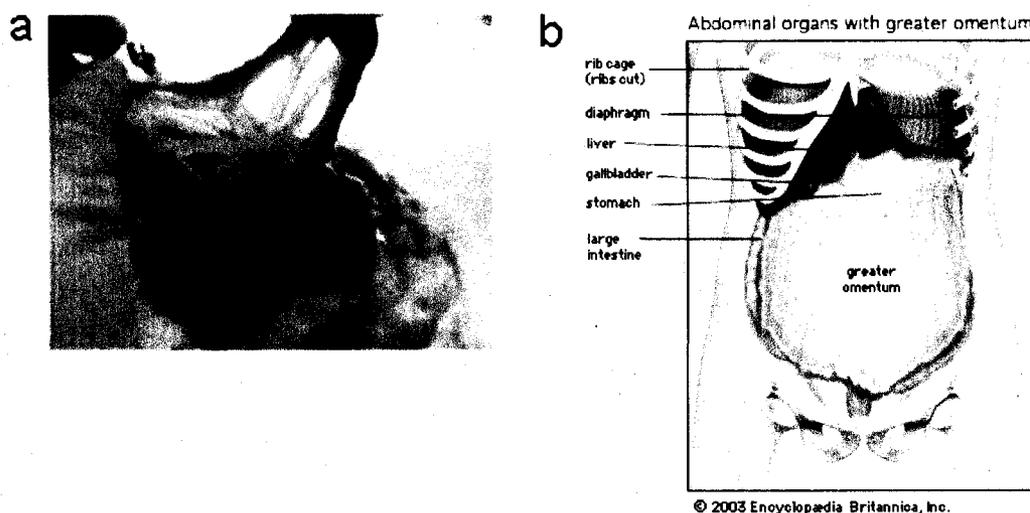
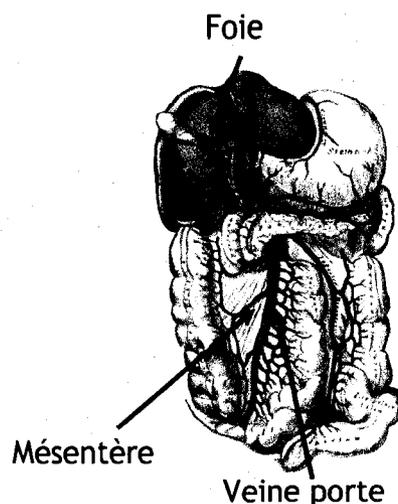


FIGURE 2 : *Tissu adipeux mésentérique et épiploïque*

a) Le tissu adipeux mésentérique (TA M) est le dépôt qui se retrouve entre les anses de l'intestin. b) Le tissu adipeux épiploïque (TA OM) correspond au grand épiploon qui est lié à l'estomac et qui recouvre les intestins.

(adaptée de : b) <http://www.britannica.com/eb/art-68663/The-abdominal-organs-are-supported-and-protected-by-the-bones>, 2007/08/20)

Chez l'humain, la proportion de tissu adipeux viscéral augmente considérablement avec l'âge dans les deux sexes, indépendamment du poids de la personne. Par ailleurs, cette augmentation est plus importante chez l'homme que chez la femme (WAJCHENBERG, 2000). Cette observation est concrète, chez la femme, à partir de l'âge de 60 ans. C'est à cet âge que le ratio TA SC / TA viscéral diminue remarquablement et ce, jusqu'à passer d'une silhouette gynoïde à une silhouette androïde (ENZI, GASPARO *et al.*, 1986).

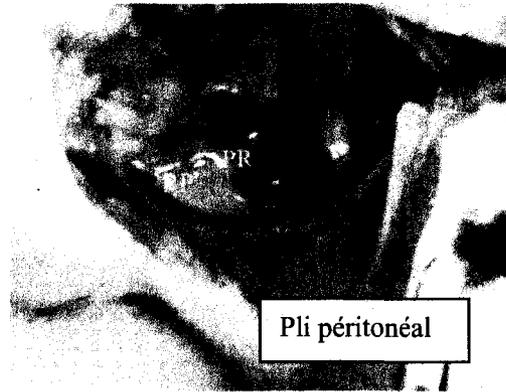


**FIGURE 3 : Relation anatomique entre le tissu adipeux viscéral et la veine porte**  
 Le tissu adipeux viscéral, ou intrapéritonéal, c'est-à-dire le tissu adipeux épiploïque (TA OM) et mésentérique, draine directement dans la veine porte qui mène au foie.  
 (modifié de [http://fr.wikipedia.org/wiki/Veine\\_porte](http://fr.wikipedia.org/wiki/Veine_porte) , 2007/02/12)

#### **1.2.2.2 Tissu adipeux rétropéritonéal**

Le tissu adipeux rétropéritonéal (RP) se situe au fond de la cavité abdominale, sous les viscères et en bordure de la colonne vertébrale. Il est généralement constitué essentiellement de tissu adipeux blanc (CINTI, 2005). Chez l'humain, le tissu adipeux rétropéritonéal représente une part minime du volume de tissu adipeux présent dans les dépôts graisseux intra-abdominaux; proportion équivalente à environ un quart de ces dépôts (WAJCHENBERG, 2000). Le tissu adipeux rétropéritonéal possède des caractéristiques métaboliques semblables à celles du tissu adipeux sous-cutané, étant tout deux des tissus adipeux qui ne drainent pas dans la veine porte (DESPRES, MOORJANI *et al.*, 1990). Le TA RP se draine en effet dans la veine cave inférieure (SHEN, WANG *et al.*, 2003). Le TA RP inclut aussi la partie adjacente aux reins (tissu adipeux périrénal). Les tissus adipeux rétropéritonéal et périrénal sont séparés l'un de

l'autre par un pli péritonéal, ce qui permet de bien les séparer lors de la dissection (CINTI, 2005) (figure 4). La proximité du TA périrénal au rein, organe d'épuration du sang, pourrait suggérer des caractéristiques distinctes de ce sous-type de TA.



**FIGURE 4 : *Tissu adipeux rétropéritonéal et périrénal***

Le tissu adipeux rétropéritonéal (RP) est le tissu adipeux qui se retrouve au fond de la cavité abdominale, et la partie entourant le rein est délimitée par un pli péritonéal, ce qui permet de le séparer du tissu adipeux RP et ainsi, il est nommé périrénal (PR).

#### ***1.2.2.2.3 Tissu adipeux périgonadique***

Le tissu adipeux périgonadique se concentre près des organes génitaux mâles ou femelles. Chez les mâles, ce dépôt graisseux est nommé épидидymique et il est bien circonscrit. Il enveloppe et limite les épидидymes par un feuillet péritonéal. Cependant, chez la femelle, le tissu adipeux périgonadique est plus étendu puisqu'il enveloppe les ovaires, l'utérus et la vessie (CINTI, 2005).

### 1.2.3 Tissu adipeux blanc versus brun

Tous les tissus adipeux présentés ci-dessus sont composés de deux types de tissus adipeux : le tissu adipeux blanc et le tissu adipeux brun en proportion distincte. Donc, la couleur de chacun des tissus dépend du ratio entre le nombre d'adipocytes blancs et d'adipocytes bruns (AVRAM, AVRAM *et al.*, 2005). Selon le type d'adipocytes prédominant, le tissu aura une teinte plutôt blanchâtre, tirant vers le jaune / ivoire, ou brunâtre. Leurs fonctions métaboliques sont aussi différentes (voir section 1.2.5). Plusieurs facteurs déterminent la composition cellulaire du tissu adipeux, tels que l'âge, l'espèce et les conditions environnementales et alimentaires (CINTI, 2005). Chez l'humain, le développement du tissu adipeux brun débute à la vingtième semaine de gestation et se poursuit jusqu'à quelques jours suivant la naissance, pour atteindre environ 1% de la masse corporelle totale (AVRAM, AVRAM *et al.*, 2005). Le tissu adipeux sous-cutané est constitué principalement d'adipocytes blancs et ce, indépendamment de l'âge. Par contre, pour le tissu adipeux intra-abdominal chez l'enfant, il est composé majoritairement d'adipocytes bruns, mais au cours des années, ces adipocytes tendent à disparaître. À l'âge adulte, seulement quelques adipocytes bruns isolés sont retrouvés (LEAN, 1989). Au contraire, chez les petits mammifères, comme les rongeurs, le tissu adipeux brun est présent tout au long de leur existence, bien qu'en général, le nombre d'adipocytes bruns tend aussi à diminuer avec l'âge (AVRAM, AVRAM *et al.*, 2005; CINTI, 2005). Chez les souris et les rats adultes, le tissu adipeux brun est visible macroscopiquement dans le tissu adipeux sous-cutané antérieur, dans le tissu du médiastin et dans les dépôts périrénaux. En microscopie, des adipocytes bruns sont présents dans le TA SC postérieur, dans la région péri-

ovarienne et dans le tissu adipeux rétro-péritonéal (CINTI, 2005). Chez l'humain adulte, les sites où l'on retrouve des adipocytes bruns sont principalement le long des vertèbres dorsales et cervicales et dans la région périrénale (LEAN, 1989).

#### 1.2.4 Histologie du tissu adipeux

L'étude histologique du tissu adipeux a démontré que les adipocytes matures correspondaient environ au tiers de sa composition. Les deux autres tiers sont composés de petits vaisseaux sanguins, nerfs, fibroblastes, pré-adipocytes et cellules du système immunitaire. (AVRAM, AVRAM *et al.*, 2005) (figure 5).

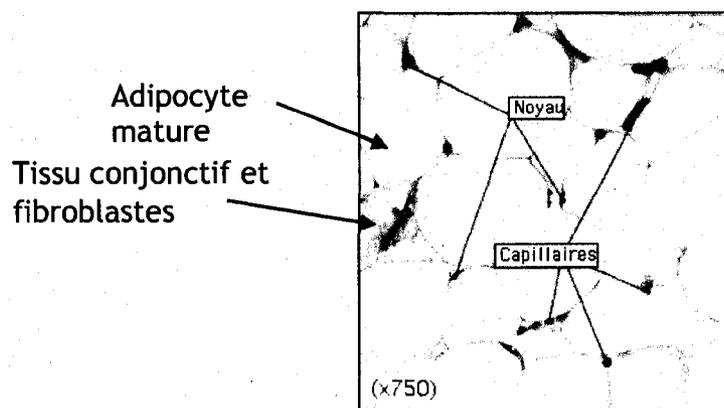


FIGURE 5 : *Histologie du tissu adipeux*

Le tissu adipeux est composé de divers types cellulaires comme les adipocytes, les cellules endothéliales, le tissu conjonctif, les fibroblastes, les pré-adipocytes et les macrophages.

(adaptée de :

<http://homepage.mac.com/danielbalas/HISTOLOGIE/HISTGENE/histgen1/histgen3/histgen3.htm>, 2007/02/08)

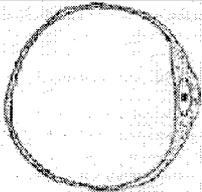
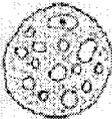
### 1.2.4.1 Adipocytes

Tel que discuté précédemment, la principale caractéristique qui distingue le TA blanc du brun est la variété d'adipocytes qui le compose.

Les adipocytes blancs sont uniloculaires et à maturité, ils peuvent atteindre entre 30 et 70  $\mu\text{m}$  de diamètre. Leur volume est majoritairement occupé par une enclave lipidique ne laissant qu'un mince espace pour le cytoplasme et le noyau (CINTI, 2005). La fonction principale de l'adipocyte blanc est l'entreposage et la répartition des acides gras selon le niveau de dépense énergétique (CINTI, 2005). Lorsque la balance énergétique est positive, les adipocytes blancs vont prendre du volume (hypertrophie), mais il y a un volume maximal que les cellules peuvent atteindre. Par contre, les adipocytes ont la capacité de proliférer et ainsi, il y a augmentation du nombre de cellules (hyperplasie) (AVRAM, AVRAM *et al.*, 2005; CINTI, 2005).

Pour leur part, les adipocytes bruns sont multiloculaires parce qu'ils possèdent plusieurs petites enclaves lipidiques. Ainsi, la cellule est de forme polygonale et le noyau de l'adipocyte est centré. La taille de l'adipocyte brun mature est entre 20 et 40  $\mu\text{m}$ , ce qui est en deçà de la taille des adipocytes blancs (AVRAM, AVRAM *et al.*, 2005). Les adipocytes bruns possèdent aussi un grand nombre de mitochondries pourvues de la protéine découplante (UCP1) d'où découle leur fonction principale de produire de la chaleur (voir section 1.2.5.3) (CINTI, 2005).

TABLEAU 4 : Comparaison entre les adipocytes blancs et les adipocytes bruns

<i>Caractéristiques</i>	<i>Adipocyte blanc</i>	<i>Adipocyte brun</i>
<i>Apparence</i>	 Modifiée : <a href="http://mapageweb.umontreal.ca/cabanat/bio2412/Chapitre3.html">http://mapageweb.umontreal.ca/cabanat/bio2412/Chapitre3.html</a>	
<i>Forme</i>	Sphérique	Polygonale
<i>Taille</i>	30 à 70 µm	20 à 40 µm
<i>Enclaves lipidiques</i>	Uniloculaire, mais occupant la majeure partie de la cellule	Multiloculaire, de petite taille
<i>Cytoplasme</i>	En périphérie de la cellule, une mince bande	Autour des organelles
<i>Noyau</i>	Contre la membrane de la cellule	Centré dans l'adipocyte
<i>Mitochondries</i>	Normales	Nombreuses et possédant la protéine UCP1
<i>Fonction principale</i>	Entreposage et distribution des acides gras Production d'adipokines et de différents facteurs hormonaux	Production de chaleur

#### 1.2.4.2 Cellules endothéliales

Les cellules endothéliales composent la tunique interne de l'ensemble du réseau vasculaire. Par ailleurs, c'est l'unique type cellulaire présent dans les capillaires qui sont les plus petits vaisseaux du réseau vasculaire. L'endothélium est semi-perméable et permet les échanges de molécules entre la circulation sanguine et l'espace interstitiel (GALLEY et WEBSTER, 2004). Tous les tissus nécessitent la présence d'un

réseau microcirculatoire afin de permettre à leurs cellules d'avoir accès aux nutriments et d'éliminer les déchets qui ont été produits. Que ce soit le tissu adipeux brun ou le tissu adipeux blanc, les deux sont bien vascularisés. Toutefois, le tissu adipeux brun est plus vascularisé que le blanc (CINTI, 2005). Chacun des adipocytes du tissu adipeux est relié à un minimum d'un capillaire, permettant les échanges entre la circulation sanguine et l'adipocyte (AVRAM, AVRAM *et al.*, 2005).

Le passage sélectif des molécules d'un côté à l'autre des cellules endothéliales s'effectue via quatre voies distinctes : diffusion directe, diffusion via la fente intercellulaire, diffusion via un pore et transport via des vésicules de transcytose ou cavéole (figure 6).

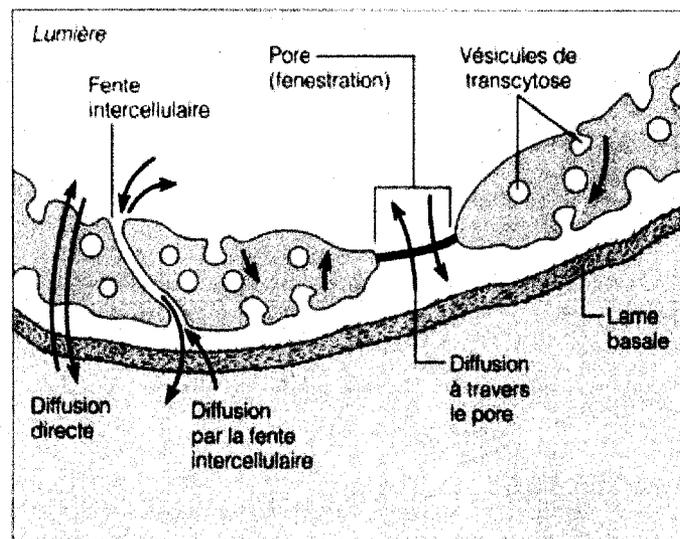


FIGURE 6 : *Quatre voies de passage à travers l'endothélium*

Les molécules peuvent utiliser quatre mécanismes de transport afin de traverser la barrière capillaire : la diffusion directe, la diffusion via la fente intercellulaire, la diffusion via un pore ou le transport via une vésicule de transcytose telle qu'une cavéole. La diffusion à travers le pore est présente uniquement dans les capillaires fenestrés.

(tirée de : MARIEB, 1999)

Même si les cellules endothéliales sont unies via une jonction serrée, cette jonction est souvent partielle et laisse un espace appelé fente intercellulaire (MARIEB, 1999). Ces fentes permettent le passage paracellulaire d'ions, d'eau et de certaines macromolécules (GALLEY et WEBSTER, 2004). Maintes vésicules existent, permettant le transport transcellulaire de liquides et de diverses molécules (MARIEB, 1999). Une de ces vésicules est la cavéole qui consiste en une invagination de la membrane cellulaire au niveau des radeaux lipidiques. Les cavéoles se distinguent des autres types de vésicules par la présence de la protéine cavéoline-1 à sa surface (GALLEY et WEBSTER, 2004). Les cavéoles permettent le transport transcellulaire de molécules telles que l'albumine, le cholestérol, les acides gras et le calcium (figure 7) (ANDERSON, 1998).

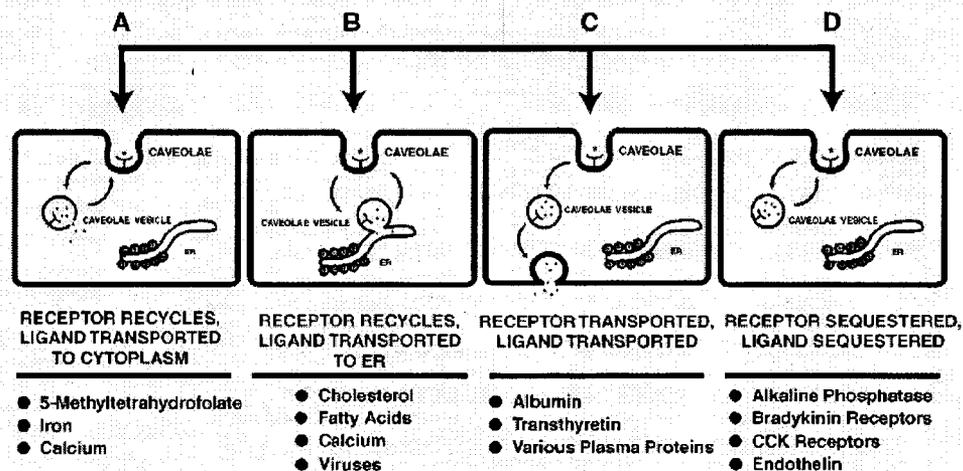


FIGURE 7 : *Le transport via les cavéoles*

Les différentes molécules transportées via les cavéoles et leurs destinations.

(modifiée de : ANDERSON, 1998)

### **1.2.4.3 Autres types cellulaires présents dans le tissu adipeux**

À l'intérieur du tissu adipeux, il est possible de retrouver d'autres types cellulaires que des adipocytes et des cellules endothéliales. Le tissu adipeux est un organe doté de nerfs de différentes tailles. Les plus petits nerfs sont moins myélinisés que les plus gros et possèdent un grand nombre de fibres noradrénergiques. Les nerfs plus gros contiennent des fibres noradrénergiques, mais également des fibres immunoréactives pour certains neuropeptides tels que le neuropeptide Y et la substance P (CINTI, 2005). Par ailleurs, le tissu adipeux contient des cellules précurseurs d'adipocytes, également nommées pré-adipocytes. Ces cellules permettent l'adipogénèse (du pré-adipocyte à l'adipocyte mature) à tous les stades de la vie (AVRAM, AVRAM *et al.*, 2005). De surcroît, la présence de macrophages et de monocytes dans le tissu adipeux est proportionnelle à la grosseur des adipocytes, car les adipocytes sécrètent des protéines qui servent au recrutement de ces cellules (AILHAUD, 2006).

### **1.2.5 Fonctions du tissu adipeux**

Le tissu adipeux a plusieurs rôles, le premier identifié étant la fonction d'entreposage des lipides. Cependant, d'autres fonctions lui ont été attribuées avec les années, telles des fonctions endocrines (AVRAM, AVRAM *et al.*, 2005).

#### **1.2.5.1 Fonction d'entreposage**

Les adipocytes, qu'ils soient bruns ou blancs, ont la capacité d'entreposer et de relâcher les acides gras. Par contre, le tissu adipeux blanc est le principal à exercer

cette fonction (CINTI, 2005). Suite à un repas, les lipides sont hydrolysés en acides gras libres par la lipoprotéine lipase. Cette enzyme est synthétisée par l'adipocyte, mais elle rejoint la surface des cellules endothéliales afin d'agir. Une fois les acides gras libres en circulation, ils peuvent entrer dans la cellule adipeuse et être emmagasinés en triglycérides dans les gouttelettes lipidiques (AVRAM, AVRAM *et al.*, 2005; BORON et BOULPAEP, 2005).

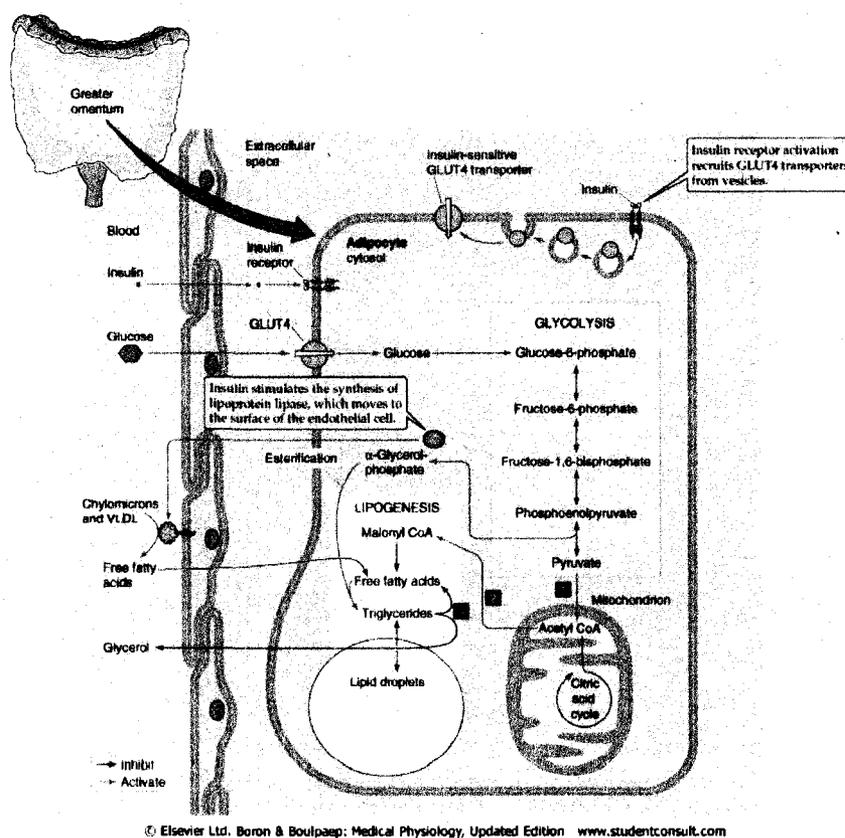


FIGURE 8 : *Métabolisme des lipides et du glucose via les adipocytes*

L'entreposage et la relâche des triglycérides dans les vésicules lipidiques des adipocytes sont rendus possibles via la lipogenèse (acides gras libres en triglycérides), la lipolyse (triglycérides en acides gras libres) et la glycolyse (glucose en pyruvate).  
(tirée de : BORON et BOULPAEP, 2005)

Dans le cas d'une balance énergétique négative, la réaction inverse se produit, le tissu adipeux libère des acides gras et du glycérol par la lipolyse. Ainsi, les cellules des

différents organes ont continuellement accès aux lipides, essentiels à leur respiration aérobie (MARIEB, 1999). De plus, le tissu adipeux peut également métaboliser le glucose via la glycolyse (figure 8) (AVRAM, AVRAM *et al.*, 2005).

### 1.2.5.2 Fonctions endocriniennes

Les adipocytes sont des cellules sécrétrices de protéines qui portent le nom d'adipokines et qui possèdent des actions diverses (figure 9). Le nombre d'adipokines documenté à ce jour dépasse amplement la cinquantaine. Le terme adipokine n'est pas spécifique aux cytokines classiques produites par les adipocytes, il inclut également des facteurs de croissance et d'autres protéines impliquées dans l'homéostasie vasculaire, le métabolisme lipidique et du glucose ainsi que dans l'immunité (TRAYHURN et WOOD, 2004).

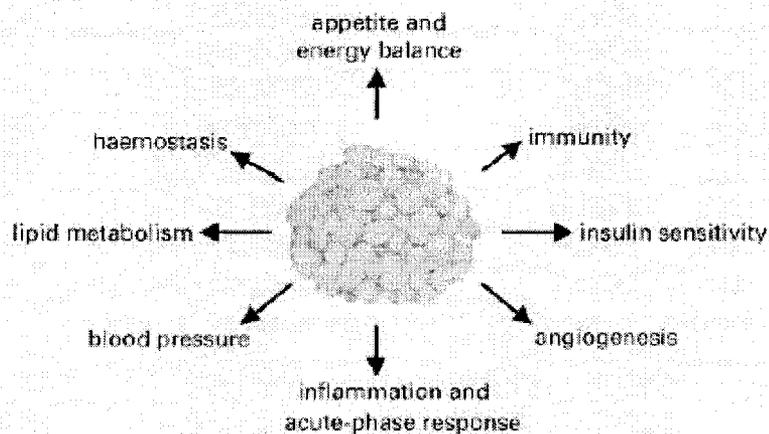


FIGURE 9 : *Phénomènes modulés par les différentes adipokines*

Les adipocytes ont des fonctions endocrines avec un vaste éventail d'actions. Les adipokines peuvent agir de façon autocrine, paracrine ou endocrine. (tirée de : TRAYHURN et WOOD, 2004)

Les adipocytes blancs sont les principales cellules adipeuses à sécréter des adipokines, mais la leptine et l'adiponectine peuvent également être sécrétées par les adipocytes bruns (TRAYHURN, 2005). Le tissu adipeux sous-cutané et le tissu adipeux viscéral n'ayant pas la même localisation dans le corps ni la même fonction, ils ne sécrètent pas exactement les mêmes quantités de facteurs (tableau 5).

TABLEAU 5 : Différents facteurs et leur niveau de sécrétion selon le sous-type de tissu adipeux

Adipokines	Poids moléculaires	Tissu adipeux viscéral	Tissu adipeux sous-cutané
	(kDa)		
Cholesteryl-ester transfer protein (CETP)	74	++	+
Retinol binding protein (RBP)	63	+	+
Angiotensinogène	60	++	+
Lipoprotein lipase (LPL)	56	+	++ (obésité morbide)
Visfatine <sup>1</sup>	52,5	+	+
Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)	45	++	+
Omentine <sup>2</sup>	33	++	+
Adiponectine	30	++	+
Vascular endothelial growth factor (VEGF) <sup>3</sup>	30	++	+
Tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )	26	+	+
Interleukin-6 (IL-6)	26	++	+
Leptine	16	+	++
Résistine	10	+	+

(adapté de : WAJCHENBERG, 2000 et de AILHAUD, 2006 1 : FUKUHARA, MATSUDA *et al.*, 2005 2 : YANG, LEE *et al.*, 2006 3 : MIYAZAWA-HOSHIMOTO, TAKAHASHI *et al.*, 2005)

La leptine, pour sa part, est une adipokine majoritairement exprimée, mais pas exclusivement, dans les adipocytes sous-cutanés. Elle est impliquée dans le contrôle

de la prise alimentaire en envoyant un message de satiété au niveau du système nerveux central, plus précisément à l'hypothalamus. Les niveaux de leptine, autant chez l'animal que chez l'humain, sont connus pour être proportionnels à la masse adipeuse (AILHAUD, 2006).

Parmi les autres facteurs sécrétés par l'adipocyte, nous retrouvons l'adiponectine qui régule le métabolisme du glucose et des lipides en influençant la réponse à l'insuline. De surcroît, il y a la visfatine qui mime l'action de l'insuline (AILHAUD, 2006). À l'inverse, il y a le TNF- $\alpha$ , IL-6 et la résistine qui, lorsqu'ils sont produits en excès, induisent une insulino-résistance. De plus, le tissu adipeux blanc possède toutes les enzymes nécessaires à la conversion de l'angiotensinogène en angiotensine II (système rénine-angiotensine) (voir section 1.3.3.3) (WAJCHENBERG, 2000). Lorsqu'il y a accumulation de graisses au niveau du tissu adipeux viscéral, les niveaux sanguins d'acides gras libres, d'IL-6, de TNF- $\alpha$ , de leptine, de résistine, de PAI-1 et d'angiotensine II augmentent tandis que l'adiponectine diminue (FANTUZZI et MAZZONE, 2007).

### **1.2.5.3 Autres fonctions**

D'autres fonctions ont été attribuées au tissu adipeux blanc, dont le soutien et la protection des organes où il sert d'amortisseur. Il est également grandement sollicité comme isolant thermique, étant donné que la graisse est un mauvais conducteur de chaleur, prévenant ainsi les pertes de chaleur et protégeant du froid extérieur (MARIEB, 1999). Pour sa part, le tissu adipeux brun a pour rôle principal la thermogénèse, c'est-à-dire la production de chaleur. La chaleur est produite durant la phosphorylation

oxydative sur la chaîne respiratoire grâce, à la protéine mitochondriale découplante (UCP-1) qui est exclusive à l'adipocyte brun (AVRAM, AVRAM *et al.*, 2005).

### ***1.3 La microcirculation***

Brièvement, la microcirculation peut être définie comme l'ensemble des vaisseaux sanguins compris entre les artérioles et les veinules ou bien, les vaisseaux sanguins ayant un diamètre inférieur à 150  $\mu\text{m}$  (SERNE, DE JONGH *et al.*, 2007). L'endothélium tapissant l'intérieur de ces vaisseaux a plusieurs rôles importants : il régule le tonus vasomoteur, contrôle la vasoperméabilité et permet l'échange des molécules d'un côté à l'autre de ces cellules (voir section 1.2.4.2) (LEBRANCHU, 2000).

#### **1.3.1 De l'artériole à la veinule**

Le réseau microcirculatoire débute par les artérioles. Ces vaisseaux sont constitués à partir de la lumière, de l'endothélium puis, d'une tunique formée de muscles lisses et de fibres élastiques et pour finir, d'une tunique externe (adventice) composée principalement de fibres collagènes (tableau 6). Les artérioles terminales, c'est-à-dire les dernières avant les capillaires, sont constituées de l'endothélium et d'une mince couche continue de cellules musculaires lisses innervées. Leur diamètre interne est d'environ 10 à 300  $\mu\text{m}$  (MARIEB, 1999). Par la suite, le sang oxygéné entre dans un lit capillaire composé des sphincters pré-capillaires, de la métartériole et des capillaires. La métartériole est très similaire aux artérioles à la différence que les cellules musculaires lisses sont discontinues et souvent non innervées. La métartériole est le

chemin direct entre l'artériole et la veinule, lorsque les sphincters pré-capillaires sont fermés (figure 10) (BORON et BOULPAEP, 2005).

TABLEAU 6 : Caractéristiques des vaisseaux sanguins de l'artériole à la veinule

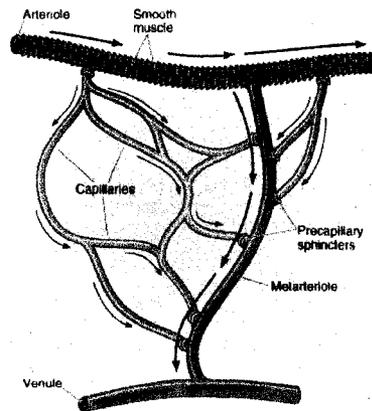
	Artériole	Pré-capillaire sphincter	True capillary	Veinule
Internal radius:	15 $\mu\text{m}$	15 $\mu\text{m}$	3 $\mu\text{m}$	10 $\mu\text{m}$
Wall thickness:	20 $\mu\text{m}$	30 $\mu\text{m}$	1 $\mu\text{m}$	2 $\mu\text{m}$
Endothelial cells	Present	Present	Present	Present
Elastic fibers	Present	Present	Absent	Absent
Smooth muscle	Present	Present	Absent	Absent
Collagen fibers	Present	Present	Absent	Absent

Boron & Boulpaep: Medical Physiology, Updated Edition

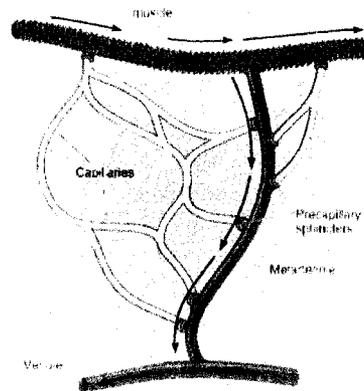
Les sphincters pré-capillaires sont un collet de cellules musculaires lisses non innervées pour la plupart, étant régi par les conditions chimiques environnantes. Lorsque les sphincters sont contractés, le sang ne rejoint pas les capillaires donc, les échanges n'ont pas lieu au niveau de ceux-ci. Par contre, lorsque les sphincters sont dilatés, le sang irrigue les capillaires permettant les échanges. Pour leur part, les capillaires sanguins sont constitués d'une monocouche de cellules endothéliales soutenues par une lame basale composée de fibres de collagènes et parfois de péricytes (BORON et BOULPAEP, 2005). Leur diamètre interne est d'environ 8 à 10  $\mu\text{m}$  et d'une longueur moyenne de 1 mm. La lumière des capillaires permet le passage d'un seul érythrocyte à la fois, diminuant le débit sanguin et augmentant ainsi l'efficacité des échanges entre la circulation sanguine et l'espace interstitiel (MARIEB, 1999). La prochaine section permettra d'approfondir le sujet des capillaires (voir section 1.3.2). À la sortie des capillaires et/ou de la métartériole, le sang rejoint les

veinules. Les veinules, pour leur part, ressemblent beaucoup aux capillaires. Elles sont composées d'un endothélium poreux et de quelques fibroblastes. Les veinules de plus gros calibre possèdent également une tunique moyenne composée de péricytes et d'une mince tunique externe. Leur diamètre varie entre 8 et 100  $\mu\text{m}$  (MARIEB, 1999).

### Sphincters ouverts



### Sphincters fermés



© Elsevier Ltd. Boron & Boulpaep: Medical Physiology, Updated Edition www.studentconsult.com

FIGURE 10 : Réseau capillaire ouvert et fermé

Les sphincters sont des muscles qui se retrouvent au début des capillaires et qui permettent de bloquer l'accès du sang aux capillaires, le restreignant à la métarteriole. (modifiée de : BORON et BOULPAEP, 2005)

### 1.3.2 Les capillaires

L'élément déterminant dans la microcirculation est le lit capillaire. Les capillaires le constituant peuvent être de trois types : continus, fenestrés et discontinus, aussi appelés sinusoides (figure 11).

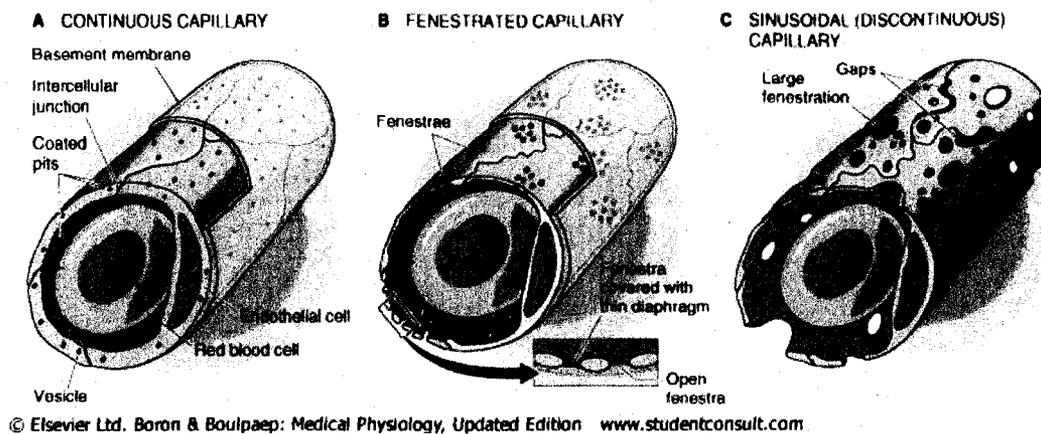


FIGURE 11 : *Trois types de capillaires*

Représentation schématique des trois types de capillaires : continu, fenestré et discontinu.

(tirée de : BORON et BOULPAEP, 2005)

Les capillaires continus sont les plus nombreux et les plus importants dans les tissus adipeux. Les cellules endothéliales les composant sont liées entre elles par des jonctions serrées, laissant quelques fentes intercellulaires. Pour leur part, les capillaires fenestrés possèdent la même morphologie que les capillaires continus à l'exception que leurs cellules endothéliales ont des pores, ce qui augmente grandement leur perméabilité. Ils se retrouvent principalement dans l'intestin grêle et les reins. Le troisième type de capillaires, les capillaires discontinus, sont retrouvés dans le foie, la moelle osseuse, le tissu lymphoïde et certaines glandes endocrines. Ils possèdent une grande lumière irrégulière avec des larges pores et moins de jonctions serrées que dans les autres types de capillaires (MARIEB, 1999). Dans le tissu adipeux des souris, il est possible d'observer deux des trois types de capillaires, les continus et les fenestrés (CAO, BRAKENHIELM *et al.*, 2001).

Peu importe le type de capillaires présents, leur rôle principal est toujours d'être une barrière semi-perméable entre la circulation sanguine et l'espace interstitiel (voir

section 1.2.4.2). Les cellules endothéliales qui composent les capillaires ont cependant d'autres fonctions importantes. En plus de leur rôle dans le transport des molécules, elles ont en effet des fonctions autocrines, paracrines et endocrines (figure 12) (GALLEY et WEBSTER, 2004). Les cellules sécrètent plusieurs substances qui sont vasoactives (vasodilatateurs ou vasoconstricteurs) permettant le contrôle serré de la perméabilité vasculaire (LEBRANCHU, 2000).

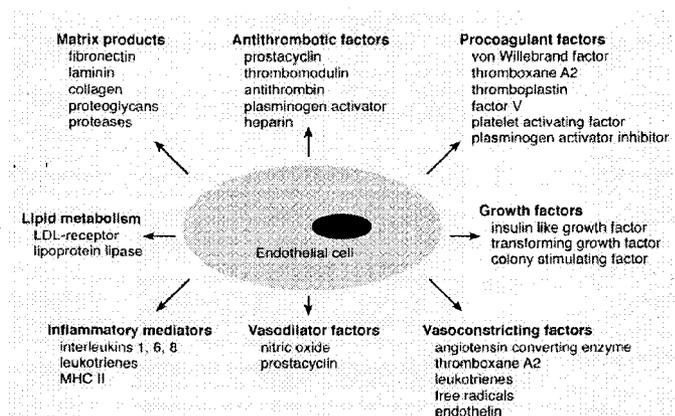


FIGURE 12 : *Molécules et facteurs sécrétés par la cellule endothéliale*  
La cellule endothéliale métabolise et synthétise maintes molécules ou facteurs qui sont relâchés afin d'avoir une action autocrine, paracrine ou endocrine.  
(modifiée de GALLEY et WEBSTER, 2004)

### 1.3.3 Perméabilité vasculaire et différents facteurs qui la régulent

Le contrôle de la perméabilité vasculaire se fait principalement via la régulation du tonus vasomoteur et du recrutement capillaire (GALLEY et WEBSTER, 2004). Certaines substances ont la capacité de relaxer et d'autres de contracter les cellules musculaires lisses présentes en amont ou en aval des capillaires. Parmi les facteurs de relaxation sécrétés via l'endothélium, on retrouve le monoxyde d'azote (NO), la prostacycline,

l'EDHF («endothelium derived hyperpolarizing factor») et le facteur natriurétique. D'autre part, l'endothélium sécrète également des facteurs vasoconstricteurs, tels que l'endothéline-1, le PAF («platelet-activating factor») et les radicaux libres à forte concentration (LEBRANCHU, 2000). Il y a d'autres facteurs qui ont une activité sur la perméabilité vasculaire, mais cette fois, qui sont sécrétés à distance des cellules endothéliales. L'angiotensine II, un peptide vasoconstricteur, et le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), impliqué dans l'angiogénèse, en sont de bons exemples. Les prochaines sections développeront sur le NO, l'Ang II et le VEGF comme il s'agit des facteurs qui ont intéressé ce projet de maîtrise.

### 1.3.3.1 Oxyde nitrique

Le NO est le produit d'une réaction d'oxydoréduction catalysée par l'enzyme NO-synthétase (NOS). L'enzyme utilise comme substrats la L-arginine, le NADPH et l'O<sub>2</sub> afin de produire du NO et de la L-citrulline.

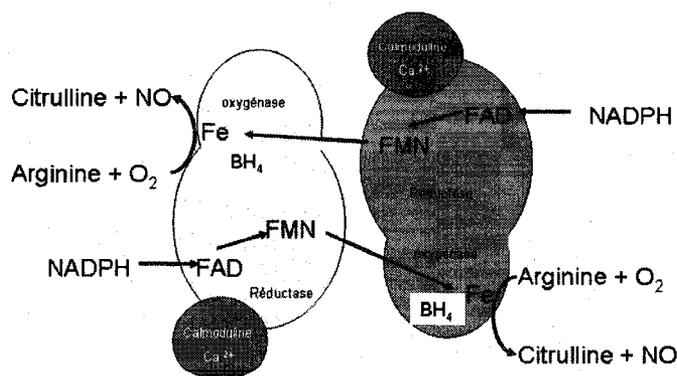


FIGURE 13 : Production de monoxyde d'azote par l'enzyme NO synthétase  
L'enzyme NOS est active sous forme de dimère. Elle utilise comme substrats le NADPH, la L-arginine et l'oxygène. Les produits de la réaction sont le NO et la L-citrulline.

### ***1.3.3.1.1 Les isoformes de la NOS***

Il existe trois différents types d'enzymes NOS : la NOS neuronale (nNOS ou NOS I), la NOS inductible (iNOS ou NOS II) et la NOS endothéliale (eNOS ou NOS III). La nNOS et eNOS sont constitutives contrairement à la iNOS. Les NOS doivent être sous forme de dimères afin d'être actives, et nécessitent le FAD (flavin adenine dinucléotide), le FMN (flavine mononucléotide) et la tétrahydrobioptérine (BH<sub>4</sub>) comme co-facteurs. Le BH<sub>4</sub> est produit *de novo* dans les cellules à partir du GTP (guanosine triphosphate), tandis que le FMN et le FAD sont synthétisés à partir de la riboflavine, aussi connue sous le nom de vitamine B<sub>2</sub>. Lorsque le dimère est formé et que les co-facteurs sont présents, chacun des monomères de la NOS doit s'associer à une calmoduline pour permettre la réaction enzymatique.

Dans le tissu adipeux, la eNOS est exprimée en conditions physiologiques à la fois dans l'adipocyte et dans le réseau microcirculatoire (ELIZALDE, RYDEN *et al.*, 2000). Étant donné la grande population de vaisseaux sanguins dans le tissu adipeux, la eNOS est l'enzyme NOS majoritaire dans ce tissu (GILMAN, HARDMAN *et al.*, 2001). En conditions pathophysiologiques, la iNOS est induite dans l'adipocyte (ELIZALDE, RYDEN *et al.*, 2000). L'activation de la eNOS se fait via l'augmentation de calcium, tandis que la iNOS est activée via la présence de cytokines et/ou de la protéine lipopolysaccharide (LPS). Le gène de la iNOS possède 26 exons (37 kpb) et est traduit en une protéine de 1153 acides aminés (aa) et d'un poids de 131 kDa. Pour sa part, le gène de la eNOS possède 26 exons (21-22 kpb), mais une fois traduite, la protéine possède 1203 aa (133 kDa) (GILMAN, HARDMAN *et al.*, 2001).

### 1.3.3.1.2 Fonctions de la NO

Le rôle premier du NO ( $t_{1/2} = 4$  secondes), synthétisé par les cellules endothéliales, est de maintenir le tonus vasculaire du réseau microcirculatoire. Lorsqu'il est produit en réponse à un cisaillement ou à un agent vasodilatateur, il induit une vasodilatation importante. Il peut également inhiber l'agrégation et l'adhésion plaquettaire (GILMAN, HARDMAN *et al.*, 2001). L'enzyme eNOS a deux mécanismes d'activation possibles, soit dépendant du calcium, soit indépendant, selon le stimulus reçu. Par exemple, la bradykinine et l'acétylcholine activent la eNOS en élevant les niveaux de calcium intracellulaires. Le calcium ainsi libéré forme un complexe avec la calmoduline qui va lier la eNOS et l'activer. Par contre, les cisaillements et l'insuline activent l'enzyme en phosphorylant les résidus sérine et thréonine via Akt (figure 14) (WHEATCROFT, WILLIAMS *et al.*, 2003).

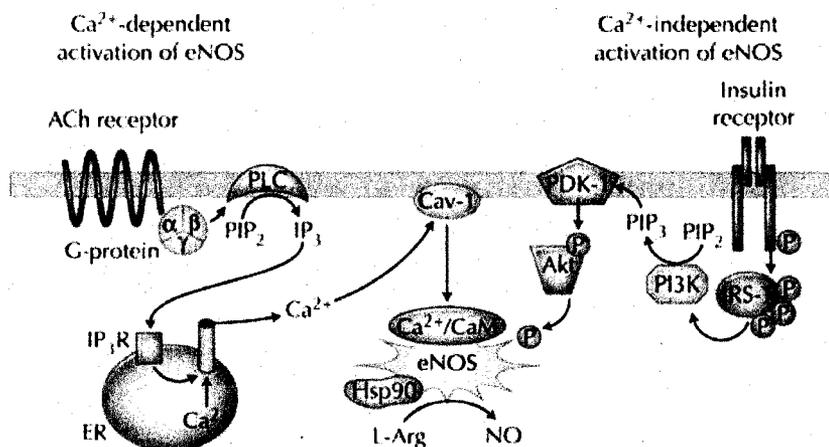


FIGURE 14 : Mécanisme d'activation de la eNOS

L'activation de la eNOS peut soit être calcium-dépendante ou indépendante selon le stimulus.

(tirée de : VINCENT, MONTAGNANI *et al.*, 2003)

Le mécanisme derrière la vasodilatation entraînée par la production de NO est dépendant des cellules musculaires lisses. Le NO diffuse passivement de la cellule endothéliale aux cellules musculaires lisses où il active la guanylate cyclase soluble, ceci entraîne la conversion du GTP en GMP cyclique. Le GMP cyclique active : pour sa part, une protéine kinase inhibant l'influx de calcium dans les cellules musculaires causant une diminution de la stimulation calcium-calmoduline, occasionnant une diminution de la phosphorylation des chaînes légères de myosine. Par conséquent, il y a relaxation des muscles lisses ainsi qu'une dilatation des vaisseaux sanguins (GALLEY et WEBSTER, 2004).

L'implication de la eNOS dans la régulation de la perméabilité endothéliale est démontrée. Par contre, le sens de son action (hyper ou hypo) fait l'objet de controverse. Des chercheurs ont démontré qu'une déficience ou une surproduction de NO pouvait mener à l'ouverture des jonctions intercellules endothéliales (PREDESCU, PREDESCU *et al.*, 2005). Le mécanisme menant à l'hyperperméabilité via la eNOS est possiblement engendré par une stimulation des MAP (mitogen activated protein) kinase (LAL, VARMA *et al.*, 2001). Cette stimulation entraîne une réorganisation du cytosquelette d'actine de la cellule endothéliale conduisant à sa contraction et ainsi, à l'augmentation de la perméabilité vasculaire via les jonctions intercellulaires (BORBIEV, BIRUKOVA *et al.*, 2004).

#### ***1.3.3.1.3 Régulation de la eNOS***

Étant donné qu'un faible changement dans les niveaux de NO a une répercussion importante au niveau physiologique, sa production est très bien régulée. La protéine

heat-shock 90, est une protéine chaperonne qui régule positivement l'activité de la eNOS. Leurs interactions sont augmentées lorsque la eNOS est activée par le VEGF, l'histamine et par les forces de cisaillements. À l'opposé, la protéine cavéoline-1, présente dans les cavéoles des cellules endothéliales, inhibe l'activité de la eNOS en modulant l'interaction calcium-calmoduline (ALDERTON, COOPER *et al.*, 2001). De plus, l'angiotensine II régule négativement l'expression du eNOS et ainsi diminue la production de NO (SCHULMAN, ZHOU *et al.*, 2006).

#### **1.3.3.2 Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire**

Le VEGF est une famille de glycoprotéines ayant comme rôle l'angiogénèse, ainsi que l'augmentation de la perméabilité vasculaire. Le VEGF A est produit dans les cellules endothéliales et épithéliales, ainsi que dans d'autres organes tels que le cerveau, les glomérules rénaux, les hépatocytes et les cellules musculaires (MAHARAJ, SAINT-GENIEZ *et al.*, 2006). Le VEGF doit lier un de ses récepteurs retrouvés principalement sur les cellules endothéliales afin d'agir comme facteur proangiogénique. Il a également été démontré que le VEGF était exprimé dans les adipocytes et majoritairement dans le tissu adipeux épiploïque (HAUSMAN et RICHARDSON, 2004).

### 1.3.3.2.1 Les isoformes du VEGF

La famille du VEGF comprend le VEGF A, B, C, D et le placenta growth factor (PIGF). Le VEGF A est celui qui est le plus exprimé et il est souvent nommé uniquement VEGF dans la littérature. Il possède maintes isoformes formées par épissage alternatif parmi les 8 exons que possède le gène (figure 15) (WOOLARD, WANG *et al.*, 2004). Chez l'humain, les isoformes principales sont le VEGF 121, 165, 189. De plus, il y a maintenant évidence de la présence du VEGF<sub>165b</sub>, un inhibiteur du VEGF<sub>165</sub> avec lequel il a 96% d'homologie. Le VEGF<sub>165</sub> est l'isoforme qui a la plus grande expression et fonctionnalité (WOOLARD, WANG *et al.*, 2004).

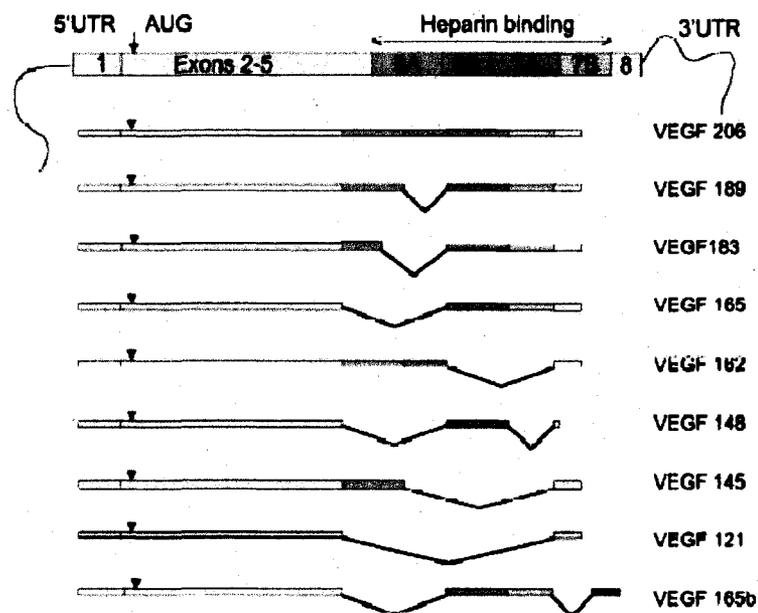


FIGURE 15 : Isoformes formées par épissage alternatif du VEGF A  
Le VEGF A possède 9 isoformes possibles, dont les principaux sont le 121, 165 et 189.

(tirée de : FERGELOT, RIOUX - LECLERCQ *et al.*, 2005)

Le VEGF<sub>121</sub> ne peut lier le sulfate d'héparan (protéoglycan), car c'est un polypeptide acide. Donc, le VEGF<sub>121</sub> est retrouvé sous une forme soluble. À l'opposé, le VEGF<sub>189</sub> et le VEGF<sub>206</sub> sont hautement basiques et sont facilement séquestrés dans la matrice extracellulaire. Pour sa part, le VEGF<sub>165</sub> se retrouve sous les deux formes, soit liée à la matrice, soit soluble (FERRARA, 2004).

Il a été démontré qu'il existe une homologie de 90% entre le VEGF<sub>165</sub> de l'humain et le VEGF<sub>164</sub> du rat. Dans l'exon 6, il n'y a qu'un acide aminé de différent, soit une tyrosine en position 134 chez l'homme et une phénylalanine en position 133 chez le rat. La différence majeure du VEGF A entre le rat et l'homme est une glycine en position 8 en moins chez le rat. C'est pour cette raison que le VEGF A du rat est composé des isoformes 120, 164 et 188 au lieu de 121, 165 et 189 chez l'homme (LADOUX et FRELIN, 1993).

### 1.3.3.2.2 Les récepteurs aux VEGF et leur signalisation

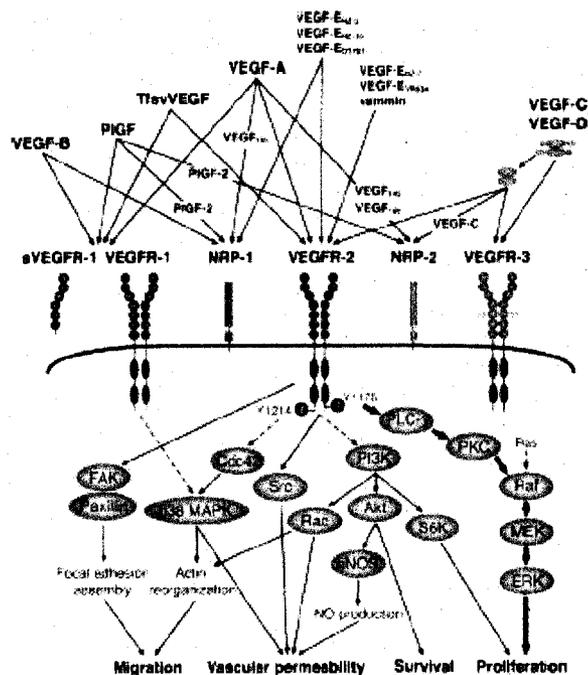


FIGURE 16 : Spécificité des récepteurs au VEGF et leurs fonctions selon la voie de signalisation empruntée.

Les différentes formes de VEGF peuvent lier 6 récepteurs distincts. Par contre, le VEGFR-2 prédomine. Les fonctions du VEGF sont l'augmentation de la perméabilité vasculaire, la survie cellulaire, la prolifération et la migration.

(tirée de : TAKAHASHI et SHIBUYA, 2005)

Comme mentionné ci-dessus, le VEGF doit se lier à son récepteur pour induire ses actions. Les différents VEGF peuvent lier un ou plusieurs des 5 récepteurs au VEGF : VEGFR-1, 2 et 3, neuropiline-1 et 2 (figure 16). Le récepteur VEGFR-1 (flt-1) et le VEGFR-2 (KDR / flk-1) possèdent 7 domaines immunoglobuline-like dans la région extracellulaire et un seul domaine transmembranaire. Ce sont deux récepteurs tyrosine-kinase exprimés dans les cellules endothéliales vasculaires, bien que le VEGFR-2 soit le récepteur majoritaire (FERRARA, 2004). Le VEGFR-2 est exprimé de façon constitutive dans le poumon, le foie, le rein et le tissu adipeux (MAHARAJ,

SAINT-GENIEZ *et al.*, 2006). Les récepteurs de type 1 et 2 peuvent lier certaines des isoformes du VEGF A contrairement au VEGFR-3 (flt-4), qui lie uniquement le VEGF-C et D et qui est principalement retrouvé dans les cellules endothéliales lymphatiques. Il existe une forme tronquée de VEGFR-1 qui est soluble. Cette dernière agit comme inhibiteur de l'activité du VEGF étant donné qu'elle séquestre la protéine, empêchant sa liaison à un récepteur fonctionnel (FERRARA, 2004). Le VEGF<sub>165</sub> a également la possibilité de lier les récepteurs neuropiline 1 et 2, qui sont des corécepteurs du VEGFR-2 (MIAO, LEE *et al.*, 2000). La liaison du VEGF à son récepteur se fait de la manière suivante : dans un premier temps, le VEGF A forme un homodimère lié en sens opposé par deux ponts disulfures. Le dimère du VEGF lie le récepteur approprié entraînant une homo- ou hétéro-dimérisation du récepteur au VEGF, suivi par un changement conformationnel menant à l'autophosphorylation de résidus tyrosine dans la région intracellulaire du récepteur. Comme la figure 16 le démontre, le VEGF a plusieurs fonctions selon la voie de signalisation empruntée. La fonction qui nous intéresse le plus est l'augmentation de la perméabilité vasculaire, principalement engendrée suite à l'activation du VEGFR-2. Les voies de signalisation impliquées sont PI3K/Rac, c-Src, p38MAPK et PI3K/Akt dépendante de la eNOS. Un second rôle important du VEGF est l'angiogénèse qui est possible via PI3K/S6K, mais principalement via raf-MEK-ERK (TAKAHASHI et SHIBUYA, 2005). D'autre part, la survie cellulaire est régie par PI3K/Akt qui prévient l'apoptose des cellules endothéliales en induisant l'expression de Bcl2 (FERRARA, 2004). Enfin, la migration cellulaire (monocytes) se fait par PI3K/Rac, p38MAPK et FAK et implique surtout le VEGFR-1 (NEUFELD, COHEN *et al.*, 1999).

### ***1.3.3.2.3 Régulation de l'expression du VEGF***

La modulation de l'expression du VEGF est régie par plusieurs molécules qui peuvent être des cytokines, des facteurs de croissance ou des hormones. L'interleukine (IL)-10 et IL-13 sont des répresseurs de l'expression du VEGF. En revanche, le facteur de croissance des fibroblastes (FGF-4), le facteur de croissance des dérivés plaquettaires (PDGF), le facteur de nécrose tumorale (TNF- $\alpha$ ), le facteur de croissance de transformation (TGF- $\beta$ ), le facteur de croissance des kéranocytes (KGF), le facteur de croissance insuline-like (IGF-I), IL-1 $\beta$ , IL-6 et le NO sont tous des molécules qui augmentent l'expression du VEGF. L'hypoxie et l'hypoglycémie sont aussi des stimulants de l'expression du VEGF (NEUFELD, COHEN *et al.*, 1999). L'expression du VEGF dans les adipocytes peut être augmentée par l'hypoxie, mais aussi via l'insuline (HAUSMAN et RICHARDSON, 2004).

### **1.3.3.3 Angiotensine II**

L'angiotensine II est un peptide qui est grandement connu pour ses effets vasoconstricteurs. L'Ang II est synthétisée via une cascade enzymatique avant de pouvoir lier un de ses récepteurs.

#### ***1.3.3.3.1 Synthèse et dégradation de l'Ang II***

À la base, il y a synthèse et sécrétion d'une glycoprotéine globulaire nommée angiotensinogène par le foie, principalement, mais également par les adipocytes et légèrement par d'autres organes, tels que le système nerveux central et les reins

(GILMAN, HARDMAN *et al.*, 2001). Par la suite, la rénine clive l'angiotensinogène après l'acide aminé 10 pour former de l'angiotensine I (figure 18). La rénine est une enzyme produite par les cellules juxtaglomérulaires du rein puis, elle est sécrétée dans la circulation sanguine (KATZUNG, 2004). Dans un deuxième temps, l'angiotensine I est clivée par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) en angiotensine II. La demi-vie de l'Ang I est très courte, c'est pourquoi l'Ang II est le peptide le plus important sur le plan physiologique (GILMAN, HARDMAN *et al.*, 2001). La voie de synthèse nécessitant la rénine est appelée le système rénine angiotensine (RAS). Par contre, il existe une autre voie de synthèse indépendante de la rénine (NRAS) qui utilise les enzymes cathépsine D et G, chymase et tonine (figure 17). Le tissu adipeux possède toute la machinerie pour synthétiser l'angiotensine II par une ou l'autre des voies de synthèse (KARLSSON, LINDELL *et al.*, 1998).

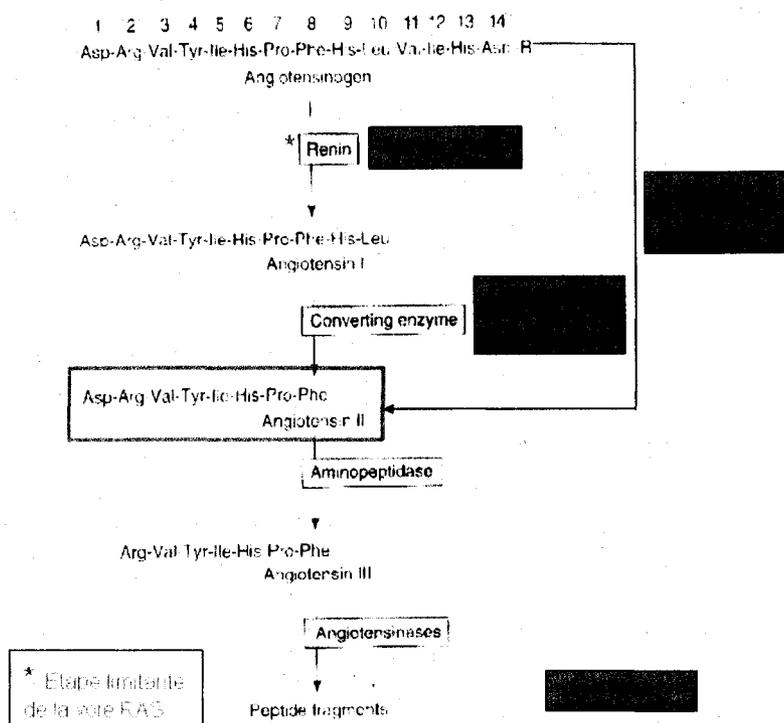


FIGURE 17 : Synthèse et dégradation de l'angiotensine II par la voie RAS et la voie NRAS

Synthèse de l'angiotensine par les deux voies possibles, ainsi que les enzymes nécessaires.

(Modifiée de : KATZUNG, 2004 et KARLSSON, LINDELL et al., 1998)

Suite à la synthèse de l'Ang II, l'enzyme aminopeptidase la dégrade en Ang III qui a les mêmes effets que l'Ang II, mais à de plus faibles amplitudes (GILMAN, HARDMAN et al., 2001). Finalement, l'Ang III est clivée en fragments inactifs par des angiotensinases.

### 1.3.3.2 Régulation de la synthèse de l'Ang II

La régulation de la synthèse se fait en grande partie par la quantité de rénine disponible. Par exemple, une augmentation de flux de NaCl au niveau du rein ou une augmentation de la pression sanguine dans le glomérule inhibe la relâche de rénine. À l'inverse, la relâche de norépinéphrine active les récepteurs  $\beta_1$  sur les cellules

juxtaglomérulaires augmentant la sécrétion de rénine. Une augmentation de la rénine augmente la formation d'Ang II puis, l'Ang II active les récepteur AT<sub>1</sub> sur les cellules juxtaglomérulaires inhibant la relâche de rénine et formant ainsi une boucle de rétrocontrôle négatif (GILMAN, HARDMAN *et al.*, 2001). Il a aussi été démontré qu'une inhibition de la production de NO entraîne une stimulation de l'activité de l'ECA, tandis qu'une production de NO induit une réduction du nombre de récepteurs AT<sub>1</sub> (SCHULMAN, ZHOU *et al.*, 2006).

#### **1.3.3.3 Les récepteurs à l'Ang II et leur signalisation**

Afin de permettre une action physiologique, l'Ang II doit se lier à un récepteur, soit AT<sub>1</sub> ou AT<sub>2</sub>. Ces deux récepteurs sont couplés aux protéines G (q, 12/13 ou i) et ont 7 domaines transmembranaires. AT<sub>1</sub>R et AT<sub>2</sub>R ont seulement une petite séquence homologue correspondant à 30% du récepteur (THOMAS et MENDELSON, 2003). Le récepteur AT<sub>1</sub> possède deux isoformes chez le rat, le A et le B. Les deux récepteurs ont une homologie de 92% en nucléotides et de 95% en acides aminés. Le récepteur AT<sub>1a</sub> est majoritaire dans tous les types cellulaires à l'exception de l'hypophyse et de la glande surrénale (DE GASPARO, CATT *et al.*, 2000). Les cellules musculaires lisses vasculaires expriment uniquement l'AT<sub>1</sub>R, tandis que les cellules endothéliales expriment les deux récepteurs. Pour leur part, les adipocytes expriment les deux types de récepteurs, mais majoritairement l'AT<sub>1</sub>R. Chez l'humain, les récepteurs se retrouvent en grande partie dans le TA O et SC, tandis que chez le rat, ils sont davantage présents dans le TA épi puis, M et finalement RP (PAUL, POYAN MEHR *et al.*, 2006). Le récepteur AT<sub>2</sub> est un récepteur majoritairement exprimé dans les tissus fœtaux. Par la suite, son expression est réduite à une faible quantité de tissu (médulla,

utérus, etc.) (THOMAS et MENDELSON, 2003). Il peut être ré-exprimé dans certaines conditions pathologiques, telles l'inflammation et l'apoptose (RUIZ-ORTEGA, ESTEBAN *et al.*, 2003). Le récepteur  $AT_1$  subit une internalisation. Lorsque l'Ang II s'y lie, il y a phosphorylation du récepteur sur un résidu sérine, ce qui mène au recrutement de la protéine  $\beta$ -arrestine puis, il y a l'endocytose dans une vésicule de clathrine. Par la suite, la vésicule peut s'accoler aux lysosomes, ce qui entraîne la dégradation du récepteur. Sinon, il peut y avoir déphosphorylation du récepteur à l'intérieur de la vésicule afin d'être recyclé à la membrane (THOMAS et MENDELSON, 2003).

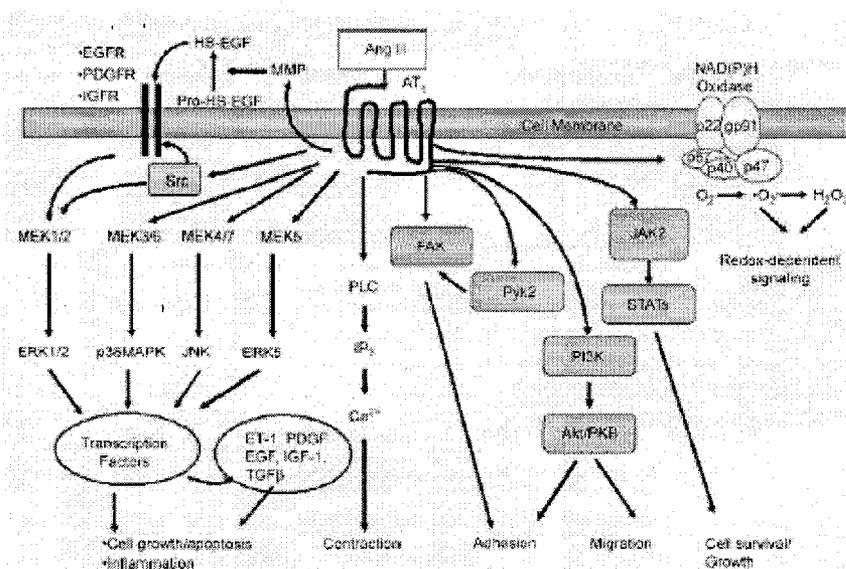


FIGURE 18 : *Cascade de signalisation de l'Ang II via son récepteur  $AT_1R$  sur les cellules musculaires lisses vasculaires*

L'Ang II lie le récepteur  $AT_1$ , ce qui active maintes cascades démontrant l'étendue d'activité de ce peptide. La voie PLC/ $IP_3$ / $Ca^{2+}$  est la voie qui est responsable de l'action vasoconstrictrice de l'Ang II.

(tirée de : TOUYZ, 2005)

L'Ang II a un rôle clé dans la régulation de l'homéostasie cardiovasculaire, car elle régule autant le volume sanguin que la résistance vasculaire en plus de favoriser la

croissance cellulaire et la prolifération (DE GASPARO, CATT *et al.*, 2000). Dans les cellules musculaires lisses vasculaires, la liaison de l'Ang II à son récepteur AT<sub>1</sub>R peut activer maintes cascades menant à la vasoconstriction, l'induction de facteurs régulant la transcription et la migration cellulaire (figure 18).

À l'inverse, le récepteur AT<sub>2</sub> antagonise souvent les effets de AT<sub>1</sub>. Ainsi, il a un effet proapoptotique, antiprolifératif et vasorelaxant. Le tonus vasculaire est la résultante des effets à la fois sur l'AT<sub>1</sub>R et l'AT<sub>2</sub>R (PAUL, POYAN MEHR *et al.*, 2006). Le tissu adipeux possède tous les substrats, enzymes et récepteurs nécessaires à la production et aux actions de l'Ang II. L'une de ses fonctions dans les adipocytes est de favoriser la lipogenèse, d'entraîner l'accumulation de triglycérides et de mener à la maturation de nouveaux adipocytes (KARLSSON, LINDELL *et al.*, 1998; AILHAUD, TEBOUL *et al.*, 2002). Une corrélation entre le poids de l'individu et les taux d'ARNm de l'angiotensinogène dans l'adipocyte a même déjà été établie (PAUL, POYAN MEHR *et al.*, 2006).

#### ***1.4 Modèles animaux d'obésité***

L'obésité est une pathologie qui peut se développer dans un grand éventail d'espèces animales. L'obésité peut résulter d'une alimentation riche en calories et/ou d'un terrain génétique prédisposant. Dans la littérature, certains groupes ont utilisé le cochon, les primates non humains, le chien et bien évidemment, le rat et la souris comme modèles animaux d'obésité créé par la suralimentation (KURTZ, MORRIS *et al.*, 1989; WEST et YORK, 1998; SPEAKMAN, HAMBLY *et al.*, 2007). Pour ce qui est des

animaux génétiquement obèses, ce sont principalement des modèles de souris ou de rats qui ont été développés. Plusieurs gènes ont été identifiés chez la souris comme inducteurs d'obésité, tels que *agouti*, *ob*, *bd*, *fat* (*fatty* ou *Lepr*) et *tub*. Une mutation récessive sur un seul de ces gènes entraîne l'obésité chez l'animal. Chez le rat, le gène le plus connu est le gène *fatty* qui est un gène homologue au gène *bd* de la souris (WEST et YORK, 1998). Chez la souris, le modèle classique d'obésité est la souris avec une mutation récessive du gène *ob*. Le gène *ob* est majoritairement exprimé dans les adipocytes et il est le gène responsable de la transcription de la leptine. La souris *ob/ob* est le résultat d'une délétion d'une paire de bases sur ce gène menant à la formation d'un codon stop en aval de la fin du gène. Une souris hétérozygote va produire moins de leptine et aura un léger surpoids (SPEAKMAN, HAMBLY *et al.*, 2007). Les souris *ob/ob* ont une absence de production de leptine menant à une hypertrophie ainsi qu'à une hyperplasie du tissu adipeux, tandis que les souris *bd/bd* (mutation du récepteur à la leptine) ont seulement une hypertrophie du tissu adipeux, ce qui porte à croire que le récepteur à la leptine serait impliqué dans l'hyperplasie (CINTI, 2005). Pour nos études sur la microcirculation du tissu adipeux, nous avons étudié le rat Zucker.

#### 1.4.1 Rats Zucker

Les rats Zucker sont génétiquement obèses en raison d'une mutation du gène *fatty* qui est apparue de façon spontanée chez les rats de la lignée 13M, découverte qui a été faite dans les laboratoires du Dr. Lois Zucker et publiée en 1961 (ZUCKER et ZUCKER, 1961).

### 1.4.1.1 Mutation au niveau du récepteur à la leptine

Les rats Zucker obèses portent une mutation sur le gène *fatty* (*Fa*) ou par son nom officiel, récepteur à la leptine (*Lepr*). Le gène *Fa* est localisé sur le 5<sup>ème</sup> chromosome et la mutation responsable de l'obésité est autosomale récessive. La nomenclature pour les rats Zucker obèses est *fa/fa*, tandis que pour les rats Zucker maigres (*Fa/?*), c'est soit *Fa/Fa* ou bien *Fa/fa*, ou le *fa*, en minuscules, exprime l'allèle muté. Les rats hétérozygotes n'ont aucune distinction avec les rats homozygotes normaux (ZUCKER et ZUCKER, 1961). La leptine est une adipokine qui est responsable du signal de satiété (voir section 1.2.5.2.). Elle se lie à son récepteur au niveau des plexus choroïdes des ventricules, pour ensuite rejoindre l'hypothalamus situé dans le diencéphale où elle régule l'appétit, la satiété et la dépense énergétique (MARIEB, 1999).

En somme, chez les rats Zucker, étant donné la mutation sur le récepteur à la leptine, le signal de satiété est absent, ce qui entraîne l'hyperphagie et par conséquent, l'obésité (figure 19). À titre comparatif, à 10 semaines, les mâles *fa/fa* ont atteint un poids au-delà des 400 g, tandis que les *Fa/?* sont légèrement en dessous des 300g.

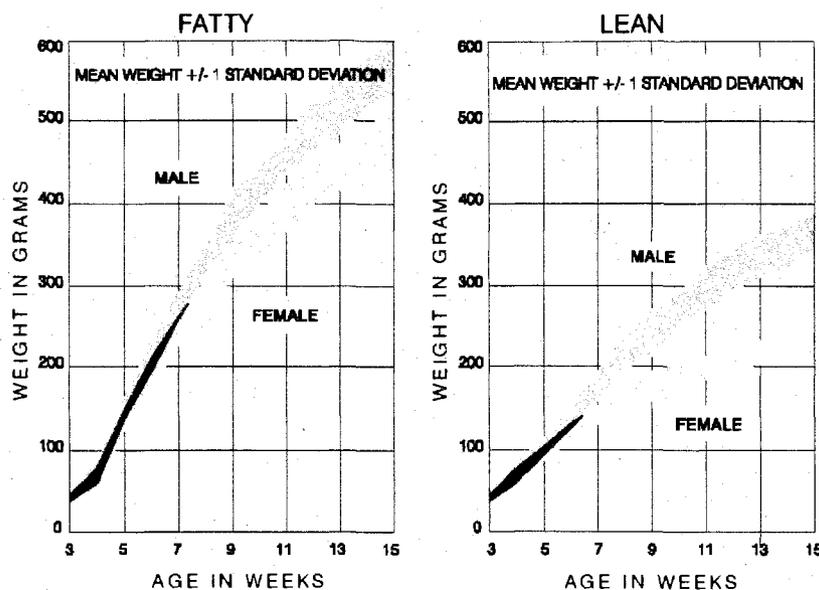


FIGURE 19 : *Courbes de croissance des rats Zucker obèses versus maigres*  
 Une différence marquée entre le poids des Zucker obèses (possédant la mutation) et des maigres est visible dès la 5<sup>ème</sup> semaine.  
 (tirée de : *Fiches technique du Laboratoire Charles River*)

Par ailleurs, les mâles *fa/fa* ont les organes génitaux d'apparence normale, mais ils ne sont qu'occasionnellement fertiles. Par contre, chez les femelles l'utérus est petit et sous-développé, ce qui les rend toutes infertiles. Étant donné que les obèses sont stériles, la lignée de rats ayant la mutation est maintenue à partir de rats hétérozygotes (*Fa/fa*) (ZUCKER et ZUCKER, 1961). ZUCKER et *al.* ont également observé une apparence laiteuse du sérum sanguin, ainsi que des taux d'acides gras (10X) et de cholestérol (4X) supérieurs chez les obèses. Par contre, les taux de glucose sanguin sont généralement égaux pour les deux groupes que ce soit à jeun ou suite à un repas. De plus, ils ont aussi rapporté des atteintes rénales qui se développent dès un an chez les *fa/fa*. Parfois, les obèses développent une hypertension et peuvent également être un modèle génétique de cette pathologie (KURTZ, MORRIS *et al.*, 1989). Enfin, les rats

Zucker fa/fa deviennent résistants à l'insuline, dû à leur surplus de tissu adipeux. En somme, ils développent le syndrome métabolique et toutes les caractéristiques qui y sont associées.

### ***1.5 Problématique, hypothèses et objectifs du projet***

En somme, le tissu adipeux est un tissu hétérogène dans sa distribution. C'est également un tissu hautement actif sur le point métabolique et très bien vascularisé pour permettre ses fonctions endocriniennes. Les adipocytes produisent maintes adipokines qui peuvent être des cytokines, des facteurs de croissance, des protéines impliquées dans l'homéostasie vasculaire, dans l'immunité et dans le métabolisme des lipides et du glucose. De plus, la eNOS, le VEGF et l'Ang II sont exprimés dans le tissu adipeux, ainsi que les récepteurs du VEGF et de l'Ang II. Compte tenu de l'importance du tissu adipeux dans certaines pathologies telles que l'obésité et le syndrome métabolique, nous avons axé nos recherches sur la microcirculation de celui-ci. Son étude nous permettra d'élucider les mécanismes par lesquels la microcirculation du tissu adipeux se modifie, de façon adaptative ou non, en présence de l'obésité.

Notre hypothèse de recherche est que la microcirculation du tissu adipeux possède un rôle primordial dans la pathologie de l'obésité, étant donné que celui-ci tient une place importante sur le plan métabolique et endocrinien. Plus précisément, étant donné que les rats Zucker fa/fa sont résistants à l'insuline, cette hormone ne peut plus avoir son effet stimulant sur le VEGF et sur l'enzyme eNOS. Dans ces conditions, nous

prévoyons une diminution dans l'expression de ces deux protéines. Par ailleurs, nous nous sommes interrogés sur l'impact de cette résistance sur l'expression du récepteur  $AT_1$  qui a un rôle primordial dans la vasoconstriction des vaisseaux. En somme, nous présageons une diminution de la perméabilité vasculaire dans le tissu adipeux (figure 20).

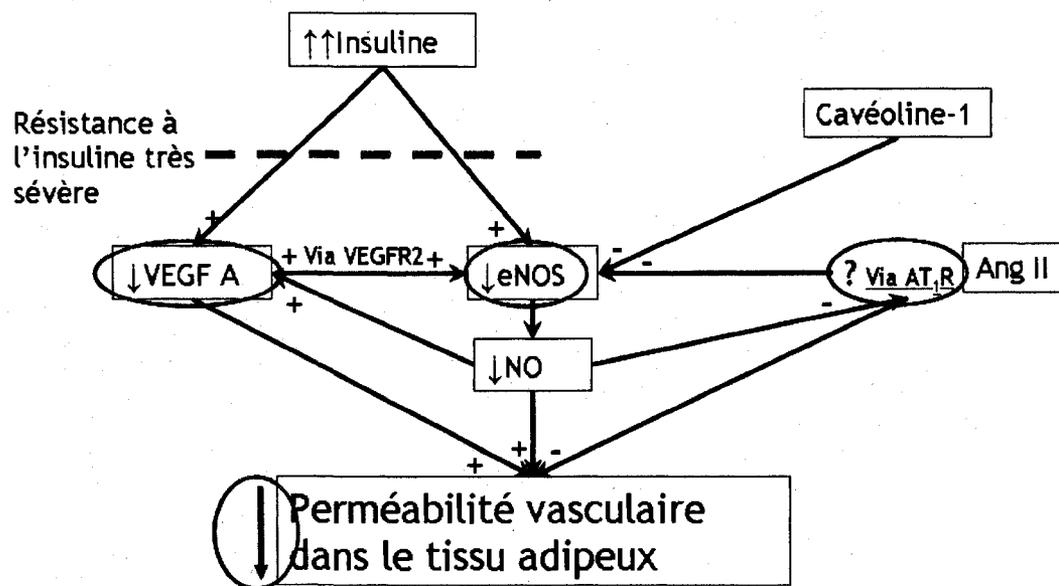


FIGURE 20 : *Hypothèses du projet*

Les rats Zucker fa/fa sont résistants à l'insuline, ce qui a pour conséquence une hyperinsulinémie. Dans ces conditions, nous prévoyons une diminution dans l'expression des protéines eNOS et VEGF A. Le sens de la variation de l'expression du récepteur  $AT_1$  est incertain, dans ces conditions pathologiques. Au final, nous présageons une diminution de la perméabilité vasculaire dans le tissu adipeux.

Par conséquent, nos objectifs sont :

- ① Évaluer s'il y a des changements dans la perméabilité endothéliale de différents types de tissus adipeux chez le rat Zucker obèse par la méthode du Bleu d'Evans.

- ② Mesurer l'expression de différents facteurs impliqués dans le contrôle de la vasoperméabilité, tels que la eNOS, l'AT<sub>1a</sub>R et le VEGF A dans différents tissus adipeux de ce modèle animal d'obésité en immunobuvardage de type Western et en qRT-PCR.
  
- ③ Observer les caractéristiques des cellules endothéliales (jonctions cellulaires, vésicules de transcytose, lumière, etc.) et des espaces interstitiels présents dans les différents tissus adipeux (sous-cutané, rétropéritonéal et épидидymique) par microscopie électronique.

## 2 MATÉRIEL ET MÉTHODE

### 2.1 Animaux :

Pour l'ensemble du projet, nous avons utilisé quatre-vingt-six (86) rats Zucker mâles âgés entre 10 et 12 semaines (Charles River Breeding Laboratories, Québec, Canada), soit 44 contrôles maigres (*Fa/?*) et 42 obèses (*fa/fa*) séparés sur trois séries d'expériences. Uniquement des mâles ont été utilisés dans nos études afin d'uniformiser les résultats. Les protocoles utilisés ont été approuvés par le comité d'éthique de la recherche avec les animaux de l'Université de Sherbrooke. Les animaux ont été nourris avec une moulée standard pour rat et gardés dans des conditions de température et d'humidité contrôlées. Les animaux de la première série ont été utilisés pour les dosages plasmatiques, ainsi que certains immunobuvardages de type Western. La deuxième série d'animaux a été utilisée pour toutes les expériences puis, la troisième série a été utilisée dans le but de reprendre certaines expériences avec le Bleu d'Evans dans un plus grand nombre de tissus adipeux.

## **2.2 Prélèvements sanguins et dosages plasmatiques**

### **2.2.1 Prélèvements sanguins**

Les prélèvements sanguins ont eu lieu 4 à 6 jours avant le sacrifice de l'animal. De plus, les rats furent à jeun pour un minimum de 5 heures avant les prélèvements, étant donné que toute nourriture fut retirée de leur cage. Ces derniers ont été effectués sous anesthésie à l'halothane, dans le sinus rétroorbital du rat à l'aide d'un capillaire (Fischer Scientific) traité à l'EDTA (Ethylene Diamine Tetra Acetic acid). Environ 3 mL de sang ont été collectés dans des tubes de 0,5 mL contenant de l'EDTA (Sarstedt). Par contre, pour la première série d'animaux, les tubes ont été traités à l'héparine puis, centrifugés à 4 °C pendant 10 minutes, à 3000 RPM (rotations par minutes). Seul le plasma a été conservé et «aliquoté» afin de pouvoir réaliser les différents dosages plasmatiques.

### **2.2.2 Dosages plasmatiques du glucose et des triglycérides**

Le dosage du glucose a été fait par colorimétrie (RAICHEM, San Diego, CA). Cela a nécessité 10 µl de plasma par échantillon et par point de la courbe standard (0 à 800 mg/dL). Tous les dosages ont été faits en duplicata. Par la suite, nous avons ajouté 1,5 mL de réactif et incubé à 37 °C pendant 10 minutes. Ensuite, nous avons procédé à la lecture de l'absorbance à 500 nm sur un spectrophotomètre. Le réactif comprenait du glucose oxydase (20000 U/L), de la peroxydase (6700 U/L), du 4-aminoantipyrine et p-hydroxybenzenesulfonate. Le produit de ces réactions enzymatiques est le

quinoneimine qui colore la solution en rouge de façon proportionnelle à la quantité de glucose.

En ce qui a trait aux dosages des triglycérides, nous avons également utilisé une trousse de colorimétrie de chez RAICHEM (San Diego, CA). Pour ce dosage, 5  $\mu$ L de plasma et de standard (0 à 600 mg/dL) ont été nécessaires. Nous avons ajouté 1 mL de réactif, puis incubé la plaque pendant 10 minutes à 37 °C. Ensuite, l'absorbance a été lue à 520 nm. Le réactif était composé de lipases, de glycérol kinase (1000 U/L), de glycérol phosphate oxydase (3500 U/L), de peroxydase (10 000 U/L), d'ATP, de 4-aminoantpyrine et de 3,5-dichloro-2-hydroxybenzène sulfonate. Cette chaîne de réactions produit aussi du quinoneimine en quantité proportionnelle aux triglycérides présents.

### **2.2.3 Dosage de l'insuline plasmatique**

Pour sa part, l'insuline plasmatique a été mesurée par un essai radio-immunologique (RIA) à l'aide d'une trousse spécifique pour l'insuline de rat (Linco, St. Charles, MO). Initialement, le tampon de dosage (phosphosaline, EDTA, sodium azide et BSA grade RIA) a été déposé dans des tubes de borosilicate à raison de 200  $\mu$ L pour mesurer la liaison non spécifique, de 50  $\mu$ L pour les échantillons et de 100  $\mu$ L pour les valeurs de référence. Par la suite, 100  $\mu$ L des contrôles internes et des standards et 50  $\mu$ L de plasma des échantillons ont été déposés dans leurs tubes correspondants. Ensuite, 100  $\mu$ L d'insuline marqué à  $^{125}$ I furent mis dans chacun des tubes. L'insuline marquée permet le dosage de l'insuline plasmatique par compétition avec celle-ci. De sorte que plus il y a d'insuline marquée, moins il y a d'insuline plasmatique. Puis, 100

$\mu$ L d'anticorps de rat contre l'insuline ont été introduits dans chacun des tubes à l'exception des tubes blancs de la courbe standard (liaison totale) et ceux de la liaison non spécifique. Enfin, les tubes furent «vortexés», couverts et incubés pour 24h à 4 °C. Suite à l'incubation, 1 mL de réactif de précipitation (capture la radioactivité libre) a été ajouté aux tubes à l'exception des blancs puis, «vortexé», incubé 20 minutes à 4 °C et centrifugé à 3 000 g pour 20 minutes à 4 °C. Le surnageant a été décanté et conservé. L'ensemble des tubes a été compté durant 1 minute dans un compteur gamma. Ainsi, l'insuline marquée permet le dosage de l'insuline plasmatique par compétition avec celle-ci, de sorte que plus il y a d'insuline marquée liée à l'anticorps dirigé contre cette protéine, moins il y a d'insuline présente dans le plasma des rats. Tous les dosages ont été faits en duplicatas. La concentration en insuline a été déterminée à l'aide de la courbe standard (0 à 10 ng/mL).

#### **2.2.4 Dosage du VEGF A plasmatique**

Pour sa part, le VEGF A plasmatique a été mesuré par ELISA utilisant le VEGF<sub>164</sub> recombinant de souris comme standard (Quantine® Mouse VEGF, R&D Systems Inc., Minneapolis, MN). On se rappellera que le VEGF A possède plusieurs isoformes. Cependant, la trousse permet la quantification de deux de ses isoformes : le VEGF<sub>120</sub> et le VEGF<sub>164</sub>. Même si la trousse est principalement conçue pour des dosages chez la souris, elle est compatible avec le rat, étant donné l'homologie de 98% entre les séquences des deux espèces. Pour que le dosage soit acceptable, le sang doit avoir été prélevé dans des tubes traités à l'EDTA. Par conséquent, les résultats de la première série d'animaux n'ont pas été pris en compte. Pour le dosage, 50  $\mu$ L de la

solution tampon RD1N ont été insérés dans chacun des puits de la plaque tapissée d'un anticorps polyclonal spécifique au VEGF de souris. Par la suite, 50  $\mu$ L de standard, contrôle ou d'échantillons furent ajoutés. Le contenu de la plaque a été mélangé délicatement pendant une minute puis, incubé durant deux heures à température de la pièce. Ensuite, chacun des puits a été aspiré et lavé avec la solution tampon, afin d'éliminer tout anticorps non lié. 100  $\mu$ L d'un deuxième anti-VEGF de souris, cette fois, couplé à une peroxydase ont été ajoutés à chacun des puits et incubés deux heures à TP. Encore une fois, les puits ont été aspirés et lavés puis, 100  $\mu$ L de solution de substrats (peroxyde d'hydrogène et tetraméthylbenzidine) incorporés. Le substrat en quantité non limitant permet l'activation de l'enzyme peroxydase présente sur l'anticorps secondaire. La plaque a été incubée 30 minutes à température de la pièce, protégée de la lumière. Un produit bleu est le résultat de la réaction enzymatique. Enfin, 100  $\mu$ L d'une solution «stop» composée d'acide hydrochlorique dilué ont été ajoutés, ce qui rend le produit de la réaction jaune. Ensuite, la plaque a été lue à 450 nm et à 540 nm (valeur de correction). Le dosage du VEGF, par cette méthode, implique que plus il y a de VEGF plasmatique plus il y aura de «sandwichs» d'anticorps formés. De ce fait, le produit jaunâtre sera produit en plus grande quantité et l'intensité de cette coloration est proportionnelle à la concentration de VEGF A plasmatique. La concentration a été obtenue par comparaison à une courbe standard de VEGF recombiné de souris (0 à 500 pg/mL).

### 2.2.5 Dosages des nitrites et des nitrates plasmatiques

Les taux de nitrites et nitrates plasmatiques ont été dosés par fluorescence (Nitrate / Nitrite fluorometric assay kit, Cayman Chemical). Le principe de cette méthode est identique à celui des dosages par colorimétrie, à l'exception que le produit de la réaction enzymatique n'est pas coloré, mais plutôt fluorescent. Pour ces dosages, 200  $\mu\text{L}$  de plasma ont été filtrés (microtube avec filtre YM-30, Millipore) par centrifugation à 7000 RPM pendant 30 minutes, à 4 °C. Pour la quantification des nitrites et des nitrates, sur une plaque microtest, 50  $\mu\text{L}$  des standards de nitrate (0 à 3,85  $\mu\text{M}$ ) et 10  $\mu\text{L}$  du plasma filtré pour les échantillons ont été «aliquotés» et le volume a été complété à 80  $\mu\text{L}$  à l'aide de la solution tampon. 10  $\mu\text{L}$  de la solution comprenant les cofacteurs de l'enzyme et de celle contenant l'enzyme nitrate réductase ont été ajoutés aux puits et incubés deux heures à TP. Ensuite, 10  $\mu\text{L}$  de réactif DAN (2,3-diaminonaphthalène) ont été incorporés à chacun des puits. Après 10 minutes, la réaction a été arrêtée par l'ajout de 20  $\mu\text{L}$  de NaOH dans les puits. Les plaques furent lues dans un fluorimètre (excitation à 360 nm et émission à 460 nm). Pour leur part, les nitrites ont été dosés à partir de 40  $\mu\text{L}$  de plasma filtré et le volume a été complété à 100  $\mu\text{L}$ , car l'enzyme et ses cofacteurs ne sont pas requis. Les autres étapes furent identiques. Pour obtenir le dosage des nitrates, il suffit de soustraire la quantité de nitrites à celle des nitrites-nitrates.

### 2.3 Extravasation du Bleu d'Evans et prélèvements des tissus

La technique utilisée pour mesurer la perméabilité vasculaire dans les différents tissus adipeux a été l'extravasation du Bleu d'Evans (BE). Cette technique est basée sur le

fait que le BE lie fortement la charge négative de l'albumine (67 kDa), ce qui permet de mesurer l'extravasation des macromolécules (ROGERS, BOSCHETTO *et al.*, 1989). Les rats ont été préalablement pesés puis, une dose de 20 mg/kg de Bleu d'Evans a été injectée dans la veine caudale chez les animaux non anesthésiés, 10 minutes avant leur sacrifice. À ce moment, le mouvement liquidien de l'espace vasculaire vers l'espace interstitiel est maximal. Suite au sacrifice par décapitation à la guillotine, les animaux ont été vidés de leur sang. Puis, nous avons procédé au prélèvement des différents tissus. Lors de la première expérience de ce projet, nous avons prélevé trois tissus adipeux (TA SC, TA RP et TA épi), ainsi que l'aorte thoracique, le foie, les reins (cortex et médulla), le cœur, les poumons, le pancréas, la rate, le muscle strié vastus et la peau. Lors de la deuxième expérimentation, six tissus adipeux (TA SC, TA RP, TA épi, TA M, TA OM, et TA PR), l'aorte thoracique, la rate et le pancréas ont été prélevés. Par la suite, les deux tiers des organes furent déposés dans la formamide pendant 22 heures à la noirceur et l'autre tiers a été utilisé pour calculer le poids sec des organes après avoir été placé 22 heures dans l'incubateur à 60 °C. Seuls les tissus adipeux n'ont pas de poids sec étant donné qu'à haute température, ils fondent. La formamide a permis d'extraire le Bleu d'Evans des différents tissus pour ensuite les doser par spectroscopie à 620 nm. Les résultats furent calculés par comparaison à une courbe standard de BE (0,5-25 µg/mL). L'extravasation a été exprimée en µg de BE par g de tissu sec, à l'exception des tissus adipeux où elle est exprimée en µg de BE par g de tissu frais. Une partie de tous les tissus adipeux a été fixée immédiatement dans le glutaraldéhyde pour la microscopie électronique et le reste a été congelé rapidement dans l'azote liquide et conservé à -80 °C pour les immunobuvardages de type Western et les qRT-PCRs qui seront décrits ci-après.

## **2.4 Extraction d'ARN et qRT-PCR**

### **2.4.1 Extraction d'ARN et dosage**

Les ARNs totaux des tissus adipeux sous-cutané et rétro-péritonéal, de la première expérience de BE, furent extraits à l'aide de la trousse RNeasy Lipid Tissue (Qiagen). Cette trousse est spécifiquement conçue pour l'extraction des ARNs provenant de tissus hautement lipidiques, augmentant ainsi l'efficacité et la pureté des extractions grâce à l'usage de colonne de silice. Pour les extractions, des morceaux de 100 mg de tissus adipeux ont été coupés rapidement et déposés dans 1 mL de solution de lyse QIAzol avant qu'il y ait décongélation. Le QIAzol est une solution de phénol monophasique et de guanidine thiocyanate servant à faciliter la lyse des tissus gras et inhiber les RNases. Les tissus ont été homogénéisés pendant environ 30 secondes puis, laissés à 21 °C pendant 5 minutes. Ensuite, 200 µL de chloroforme ont été ajoutés aux tubes puis, bien agités et ensuite laisser reposer trois minutes de plus à température pièce avant d'être centrifugés pendant 15 minutes à 12 000 g à 4 °C. La phase aqueuse, contenant l'ARN, a été conservée et 700 µL d'éthanol 70% y ont été ajoutés. Le tout a ensuite été transféré sur une colonne RNeasy Mini Spin et centrifugé 15 secondes à 12 000 g. Ensuite, 700 µL de tampon RW1 ont été ajoutés à la colonne, afin de laver et d'éliminer certains contaminants. Les colonnes ont été centrifugées pour une autre période de 15 secondes puis, lavées deux fois à l'aide de 500 µL de tampon RPE. La membrane gel de silice des colonnes fut ensuite séchée

par centrifugation pendant 2 minutes. Pour éluer les ARN, 30  $\mu$ L d'eau RNase-free ont été déposés sur la membrane et centrifugés pendant une minute. L'éluat fut remis sur la membrane et une seconde centrifugation a lieu. L'éluat contenant l'ARN de l'échantillon a été traité à la DNase I (Ambion). L'échantillon a été incubé à 37 °C pendant une heure avec le tampon 10X de la DNase I et avec 1  $\mu$ L de DNase I. Ensuite, l'enzyme a été inactivée par l'ajout d'un réactif d'inactivation 10X en suspension, mélangé par inversion deux minutes puis, culotté par centrifugation à 10 000 g pour une minute. L'ARN a été dosé par spectrométrie à 260 nm et sa pureté a été évaluée à l'aide du ratio d'absorbance 260 sur 280 nm et par migration sur gel d'agarose en condition dénaturante. Les ARNs furent conservés à -80 °C dans une solution aqueuse jusqu'à leur utilisation.

#### **2.4.2 Réaction de transcription inverse**

La transcription inverse (400U M-MLV reverse transcriptase, Promega) a été faite à partir de 2  $\mu$ g d'ARN total dans un volume final de 25  $\mu$ L, utilisant 0,5  $\mu$ g d'amorce oligo(dT)<sub>15</sub> (Promega), de tampon 5X de la M-MLV, de 0,4 mM dNTP (GE Healthcare) et 25 U RNasin 2500 (Promega). La réaction enzymatique a eu lieu à 42 °C pendant une heure, précédée et suivie de 10 minutes à 70 °C. Des contrôles négatifs, sans enzymes, ont été faits pour tous les échantillons, afin de s'assurer que les ARN n'étaient pas contaminés par de l'ADN génomique. Suite aux réactions de transcription inverse, les produits obtenus sont des ADN complémentaires (ADNc) dont la qualité a été vérifiée par un PCR standard. Le PCR a été fait à l'aide de 1  $\mu$ L d'ADNc, du tampon de PCR, de 0,4 mM de dNTP, de 0,4  $\mu$ M d'amorce d'AT<sub>1a</sub>R sens

et anti-sens (tableau 8) et de 0,2 unité d'ADN Taq polymérase. La réaction se déroulait comme suit : 3 min à 94 °C, suivi de 40 cycles de 30 sec à 94 °C, 30 sec à 60,8 °C et de 30 sec à 72 °C et se termine par 5 min à 72 °C. Les résultats des PCR furent visualisés sur gel d'agarose 2,5%.

### **2.4.3 PCR quantitatif en temps réel**

Le PCR quantitatif en temps réel (qRT-PCR) a été fait dans le iCycler iQ Detection System à l'aide du iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories) dans un volume total de 25 µl. Le volume comprenait les amorces sens et anti-sens, les ADNc et le réactif SYBR Green (ADN polymérase iTaq, SYBR Green I, fluorescéine). Le SYBR Green a la capacité d'émettre de la fluorescence lorsqu'il lie les acides nucléiques double brins, ce qui permet une quantification des ADNc (figure 21). Les conditions de qRT-PCR et les amorces utilisées pour chacun des gènes sont représentées dans le tableau 7.

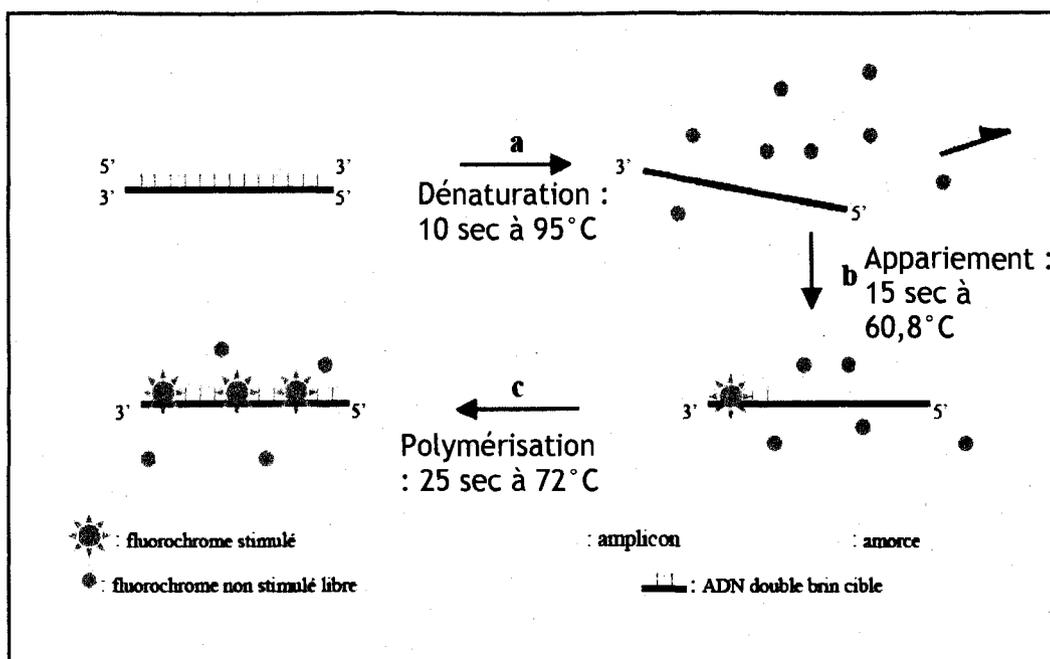


FIGURE 21 : Condition de PCR quantitatif en temps réel et activation du fluorochrome, SYBR Green (adaptée de : POITRAS, 2002)

Les amorces pour l'actine provenaient de Qiagen, tandis que les amorces de eNOS, de AT<sub>1a</sub>R et de VEGF<sub>164</sub> ont été produites chez Invitrogen. Les amorces pour le gène de la eNOS et du VEGF<sub>164</sub> ont été trouvées dans la littérature (FULTON, HARRIS *et al.*, 2004; McLAREN, MARSDEN *et al.*, 2007) et celles de AT<sub>1a</sub>R ont été dessinées à l'aide du logiciel Beacon Designer 2.0. Toutes les paires d'amorces choisies ont été disposées de part et d'autre d'un intron, afin de pouvoir distinguer l'amplification de l'ADNc provenant de l'ARNm de l'amplification provenant d'une contamination à l'ADN génomique. Seul l'AT<sub>1a</sub>R ne respectait pas cette règle, car c'est un gène avec un seul exon codant. Les gènes d'intérêts (eNOS, AT<sub>1a</sub>R et VEGF<sub>164</sub>) ont été reportés en fonction du gène de référence, la  $\beta$ -actine, qui a servi de contrôle interne.

TABLEAU 7 : Amorces utilisées pour les qRT-PCRs et la taille des amplicons

Gènes d'intérêt	Séquences	Concentrations	Tailles des amplicons
AT <sub>1a</sub> R	5' CCC TAC CCT CTA CAG CAT CAT C 3' 5' GGC GAG ATT GAG AAG AAA GAC G 3'	0,3 $\mu$ M chacune	121 pb
VEGF <sub>164</sub>	5' CAT AGG AGA GAT GAG CTT CCT GC 3' 5' CTC TGA ACA AGG CTC ACA GTG ATT TTC 3'	0,3 $\mu$ M chacune	96 pb
$\beta$ -Actine	Rn_Actb_1_SG QuantiTect Primer Assay (QT00193473) QIAGEN	1X	145 pb

(pb : paires de base)

L'efficacité d'amplification de chacune des paires d'amorces des gènes étudiées a été comparée à celle de la  $\beta$ -actine afin d'avoir des conditions expérimentales (temps et température d'hybridation) où la différence d'efficacité entre les deux était inférieure à 5%. Suite à chacun des qRT-PCRs, les produits d'amplification sont migrés sur gel d'agarose 2,5%.

#### 2.4.4 Analyses des résultats de qRT-PCR

Les résultats des qRT-PCRs furent obtenus en  $C_t$  (cycle seuil : nombre de cycles pour que la fluorescence dépasse les niveaux de base de fluorescence) (figure 22). Les  $C_t$

pour le gène de référence devaient se situer entre 13 et 23, afin que l'analyse soit fiable. Pour ce qui est du gène d'intérêt, le  $C_t$  devait être inférieur à 36, car au-delà de ce cycle, les amplifications sont trop faibles et les résultats ne sont pas fiables. Tous les échantillons ont été faits en triplicatas.

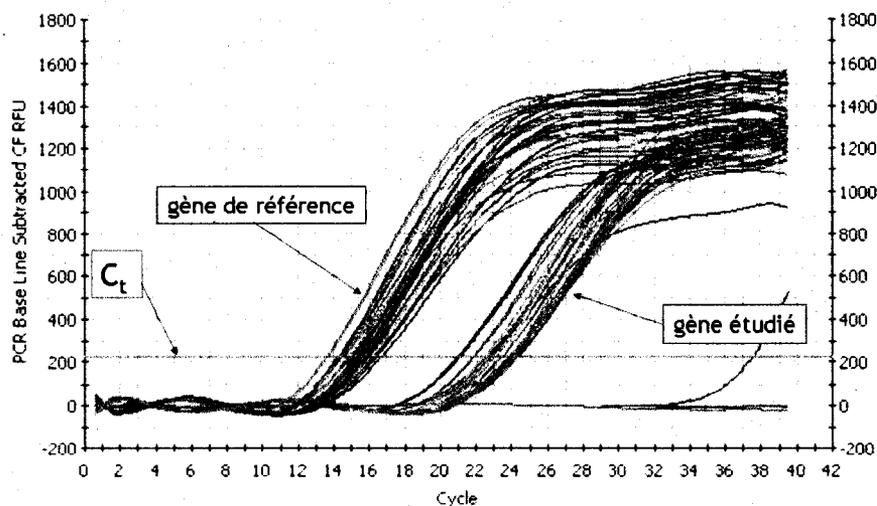


FIGURE 22 : Exemple de graphique obtenu suite à un PCR quantitatif en temps réel. Sur l'axe des ordonnées apparaît la quantité de fluorescence émise par le SyberGreen stimulé. Tandis que le nombre de cycles effectués se retrouve sur l'axe des abscisses. La valeur de fluorescence seuil ( $C_t$ ) est le cycle auquel la fluorescence dépasse les niveaux de base et où les courbes de fluorescence sont linéaires. Le premier groupe de courbes correspond à l'amplification du gène de référence, alors que le deuxième correspond au gène étudié, dans le cas présent le VEGF<sub>164</sub>.

Les données ont été analysées selon la méthode du  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (LIVAK et SCHMITTGEN, 2001). Chaque cycle d'amplification est équivalent à doubler la quantité d'ADNc présents dans le tube, de là le «2» dans la formule. Le premier « $\Delta$ » est la différence de  $C_t$  entre le gène étudié et le gène de référence, tandis que le second représente la différence entre la moyenne des  $\Delta_{\text{étudié-référence}}$  des obèses et des contrôles. Par la suite, la variation d'expression des obèses fut calculée et exprimée en pourcentage. Les statistiques (erreur-type et  $p$  de significativité) furent faites sur les  $\Delta C_{t\text{étudié-référence}}$ .

## ***2.5 Extraction de protéines et immunobuvardage de type Western***

Les différents tissus adipeux extraits lors de la première expérience de BE ont été coupés en morceau de 500 mg et déposés dans un tampon d'homogénéisation. Le tampon était composé de 25 mM de Tris-HCl, de 1 mM de EDTA, de 0,01% (p/v) de PMSF (inhibiteur de sérine protéase, Sigma) et de 5  $\mu$ L/mL d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Sigma). Les tissus furent homogénéisés puis, centrifugés 10 minutes à 2400 RPM. Seul le surnageant a été conservé. Il a été «aliquoté» en petits volumes et conservé à -80 °C, jusqu'à utilisation. La concentration protéique de chacun des échantillons a été mesurée par la méthode de BCA (acide bicinchoninique) de Pierce. Pour la réalisation des divers immunobuvardages, l'équivalent de ~20  $\mu$ g de protéines totales a été utilisé. Les échantillons ont été migrés par électrophorèse sur gel en conditions dénaturantes (SDS-PAGE). La concentration en acrylamide, le temps et le voltage de la migration variaient selon la taille de la protéine étudiée (Tableau 8).

Suite à la migration, les protéines ont été transférées sur une membrane de PVDF pendant 17 heures, à 10 volts et à 4 °C. Par la suite, les membranes furent bloquées dans une solution contenant 5% de lait pendant une heure à TP, afin de limiter la liaison non-spécifique des anticorps à la membrane. Le blocage pour la protéine AT<sub>1</sub>R a été fait dans une solution de 0,5% BSA. Ensuite, l'anticorps primaire a été ajouté puis, trois lavages de 15 minutes avec du TBS-Tween 0,1% ont été effectués.

TABLEAU 8 : Conditions des immunobuvardages selon la protéine étudiée

Protéines d'intérêt (poids kDa)	Gels SDS-PAGE (% acrylamide, temps et voltage de migration)	Anticorps primaires (dilution ; incubation)
eNOS (140 kDa)	8%, 45 min, 200V	BD 610296 (1 :500 ; 2 h à TP)
AT <sub>1</sub> R (40,45 et 60 kDa) selon les niveaux de glycosylation du récepteur	10%, 2 h, 100V	Abcam ab9391 (1 :400 ; O/N à 4°C)
VEGF A (28,31 et 50 kDa) selon les isoformes	15%, 2 h, 150V	Abcam ab1316 (1 :1000 ; 1 h à TP)
VEGF <sub>164b</sub> (22 kDa)	15%, 2 h, 150V	Abcam ab14994 (1 :1000, 2 h à TP)

Ensuite, l'anticorps secondaire couplé à l'enzyme Horseradish Peroxydase (HRP) a été ajouté pendant une heure à TP, suivi d'une seconde série de trois lavages. Les membranes ont ensuite été transférées dans une solution de révélation par chemiluminescence (SuperSignal West Pico, Pierce) pendant cinq minutes. L'enzyme HRP oxyde le Luminol et produit de la lumière qui peut être visualisée par autoradiographie. L'intensité des bandes a été mesurée à l'aide du logiciel Image Quant 5.0. Les résultats des immunobuvardages de type Western ont été exprimés en unités arbitraires de densitométrie par  $\mu\text{g}$  de protéines totales et par la suite, normalisés par rapport au contrôle maigre, pour exprimer en pourcentage la différence entre les deux groupes expérimentaux.

## ***2.6 Microscopie électronique à transmission***

De petits morceaux des différents types de tissus adipeux prélevés chez les rats ont été fixés immédiatement dans 2,5% de glutaraldéhyde puis, ont été lavés deux fois cinq minutes dans une solution de cacodylate de sodium 0,1 M pH 7,4. Par la suite, ils furent incubés dans une solution d'acide osmique 0,5% et d'imidazole 0,1 M. Puis, ils ont été lavés à l'eau bidistillée deux fois avant d'être déshydratés dans une suite de bains d'éthanol (50% à 100%). Les morceaux ont ensuite été traités à l'oxyde de propylène pour trois fois cinq minutes, avant d'être inclus dans une résine Epon pour trois fois une heure. La polymérisation a été faite à 60 °C pendant 48 heures. Des coupes de 75 nm ont été faites sur une grille en cuivre. Les coupes ont été colorées à l'acétate de plomb et au citrate de plomb pendant dix minutes pour chacun des deux colorants. L'observation des coupes de tissus fut faite à l'aide d'un microscope électronique à transmission (Hitachi). Les adipocytes et les cellules endothéliales des tissus adipeux sous-cutané, rétropéritonéal et épидидymique ont été étudiés. Environ vingt photos ont été prises par tissu et ce, sur six rats différents à deux grilles par rats.

## ***2.7 Analyses statistiques***

Tous les résultats seront présentés sous la forme de la moyenne plus ou moins l'erreur-type (moyenne  $\pm$  SEM). La moyenne a été faite pour chacun des groupes soit le groupe des contrôles maigres et le groupe des obèses. La différence entre les deux groupes fut évaluée à l'aide d'un test de t-Student non apparié. Le seuil de significativité utilisé a été une valeur de  $p$  inférieure à 0,05.

### 3 RÉSULTATS

#### 3.1 *Caractéristiques des animaux et dosages plasmatiques*

Le tableau 9 présente les différences notées entre les deux groupes d'animaux étudiés.

À environ douze semaines, les rats Zucker obèses ont un poids moyen de  $518 \pm 7$  g, tandis que les rats contrôles ont un poids moyen de  $338 \pm 4$  g.

La concentration du glucose plasmatique est légèrement plus élevée chez les rats fa/fa ( $16,1 \pm 0,8$  mmol/L) comparativement aux rats contrôles ( $14,4 \pm 0,6$  mmol/L). Par contre, cette différence est non significative ( $p = 0,08$ ). Pour ce qui est des triglycérides, le tableau 9 montre une concentration de  $1,2 \pm 0,9$  mmol/L chez les rats contrôles et de  $5,1 \pm 0,3$  mmol/L chez les rats obèses. Cela représente une différence significative ( $p < 0,0001$ ) des taux de triglycérides mesurés chez les rats obèses, étant plus de quatre fois plus élevés. De surcroît, la concentration d'insuline retrouvée chez les rats fa/fa ( $2242 \pm 261$  pmol/L) est près de six fois plus élevée que chez les rats contrôles ( $375 \pm 47$  pmol/L).

Les taux plasmatiques de nitrites ( $\text{NO}_2^-$ ) et de nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ) ont été mesurés dans les deux groupes d'animaux. Les nitrites et nitrates sont les produits finaux des réactions du NO ( $t_{1/2} = 4$  secondes) et sont donc une bonne estimation de la production totale de NO. La concentration plasmatique de nitrites chez les rats contrôles est de  $1,61 \pm 0,09$   $\mu\text{mol/L}$  et celle des nitrates, de  $11,0 \pm 0,4$   $\mu\text{mol/L}$ . Chez les rats obèses, on observe des concentrations de  $1,34 \pm 0,05$   $\mu\text{mol/L}$  pour les nitrites et de  $10,1 \pm 0,6$   $\mu\text{mol/L}$  pour les nitrates (tableau 9). La somme des nitrites et des nitrates ( $\text{NO}_x$ ) chez les rats

contrôles est de  $12,6 \pm 0,4 \mu\text{mol/L}$  et de  $11,5 \pm 0,6 \mu\text{mol/L}$  chez les obèses et cette différence n'est pas significativement, malgré une diminution significative des nitrites chez les obèses par rapport aux maigres ( $p < 0,05$ ). Enfin, la concentration de VEGF A (isoformes 120 et 164) plasmatique a été mesurée. Pour ce dosage, seulement 32 animaux ont été utilisés, car la technique nécessitait du sang traité à l'EDTA et non à l'héparine. Les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau 9. Bien qu'il y ait eu une diminution de la concentration du VEGF A chez les obèses ( $70 \pm 5 \text{ pg/mL}$  vs  $78 \pm 3 \text{ pg/mL}$ ), cette différence est non significative.

TABLEAU 9 : Caractéristiques des animaux et données métaboliques

	Maigres (Fa/?) n=29	Obèses (fa/fa) n=27	Valeurs de $p^*$
Poids (g)	$338 \pm 4$	$518 \pm 7$	$<0,0001$
Glucose plasmatique (mmol/L)	$14,4 \pm 0,6$	$16,1 \pm 0,8$	0,08
Triglycérides plasmatiques (mmol/L)	$1,2 \pm 0,9$	$5,1 \pm 0,3$	$<0,0001$
Insuline plasmatique (pmol/L)	$375 \pm 47$	$2242 \pm 261$	$<0,0001$
Nitrites plasmatiques ( $\mu\text{mol/L}$ )	$1,61 \pm 0,09$	$1,34 \pm 0,05$	$<0,05$
Nitrates plasmatiques ( $\mu\text{mol/L}$ )	$11,0 \pm 0,4$	$10,1 \pm 0,6$	NS
VEGF A plasmatique (pg/mL)	$78 \pm 3$ (n=17)	$70 \pm 5$ (n=15)	NS

Moyenne  $\pm$  erreur type (SEM), \*Student's t-test non pairé, NS : non significatif

Les rats ont été pesés la journée du sacrifice. Les prélèvements sanguins, via le sinus rétroorbital, ont eu lieu de 4 à 6 jours avant le sacrifice. La concentration plasmatique du glucose et des triglycérides a été évaluée au moyen d'un essai colorimétrique. L'insuline plasmatique, pour sa part, a été mesurée par essai radio-immunologique (RIA), le VEGF A a été établi par un essai d'immunosorption lié à l'enzyme (ELISA) et les taux de nitrites et nitrate ont été calculés à partir d'un essai fluorométrique. Tous les essais sont décrits plus précisément dans la section MATÉRIEL ET MÉTHODE.

## **3.2 Extravasation du Bleu d'Evans**

La mesure de la perméabilité vasculaire a été réalisée sur la deuxième et la troisième série d'animaux à l'aide de la méthode de l'extravasation du Bleu d'Evans.

### **3.2.1 Première série d'expériences au Bleu d'Evans**

Lors de cette première série, plusieurs organes différents ont été prélevés et les résultats sont présentés dans la figure 23. Cette figure nous permet d'apprécier la grande hétérogénéité dans la perméabilité vasculaire entre les divers organes. L'aorte thoracique n'a montré aucun changement significatif chez les rats Zucker fa/fa par rapport aux rats Zucker contrôles. Par contre, le cœur a montré une augmentation de 31,1% de l'extravasation chez les rats obèses comparativement aux rats contrôles ( $p < 0,05$ ). Toutefois, dans le muscle vastus, une diminution significative de la perméabilité de 37,1% ( $p < 0,05$ ) a été mesurée. Pour ce qui est du pancréas, une augmentation de 46,7% ( $p < 0,01$ ) a été observée chez les rats obèses et dans la peau, cette augmentation est encore plus élevée, soit de 112,9% ( $p < 0,01$ ). Les mesures de perméabilité ont également été faites dans le rein (cortex et médulla séparément). Pour le cortex, une augmentation de 47,9% a été observée, tandis que pour la médulla, ce pourcentage est beaucoup plus élevé (72,6%). De plus, la perméabilité dans le rein, chez les deux groupes d'animaux, contrôle et obèse, est supérieure à celle de tout autre organe et ceci est encore plus marqué pour la médulla. Pour ce qui est du foie, du poumon et de la rate, aucune différence significative n'a été notée entre les deux groupes d'animaux.

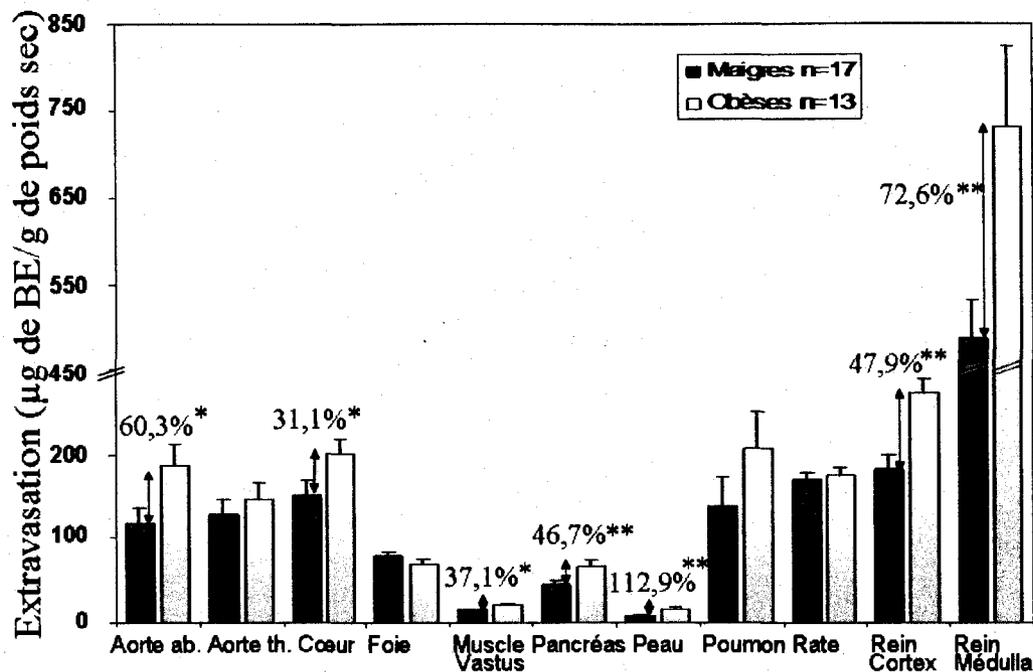


FIGURE 23 : Extravasation du Bleu d'Evans dans les organes prélevés lors de la première expérience

Le prélèvement des divers organes s'est fait suite au sacrifice de l'animal qui a lieu dix minutes après l'injection du Bleu d'Evans via la veine caudale à une dose de 20 mg/kg. Les résultats sont exprimés en µg de BE par gramme de poids sec et la différence est exprimée en pourcentage par rapport aux rats contrôles pour chacun des tissus montrant une différence significative entre les deux groupes. L'expérience est décrite plus précisément dans la section MATÉRIEL ET MÉTHODE.

Moyenne ± erreur type (SEM) La significativité fut calculée par le test de t-Student non païré ; \*  $p > 0,05$ , \*\*  $p > 0,01$

Dans cette première série d'expériences, trois différents types de tissus adipeux ont été prélevés; le TA SC, le TA RP comprenant le périrénal et le TA épi (figure 24).

Pour chacun de ces tissus, les résultats de BE proviennent d'un morceau de TA d'environ 500 mg par animal. Pour ces trois tissus adipeux, aucun changement significatif n'a été observé. Comme il existait une très grande hétérogénéité dans les valeurs de BE obtenues selon l'emplacement où on prélevait les morceaux de TA dans un même sous-type, une seconde série d'expériences au BE a été faite.

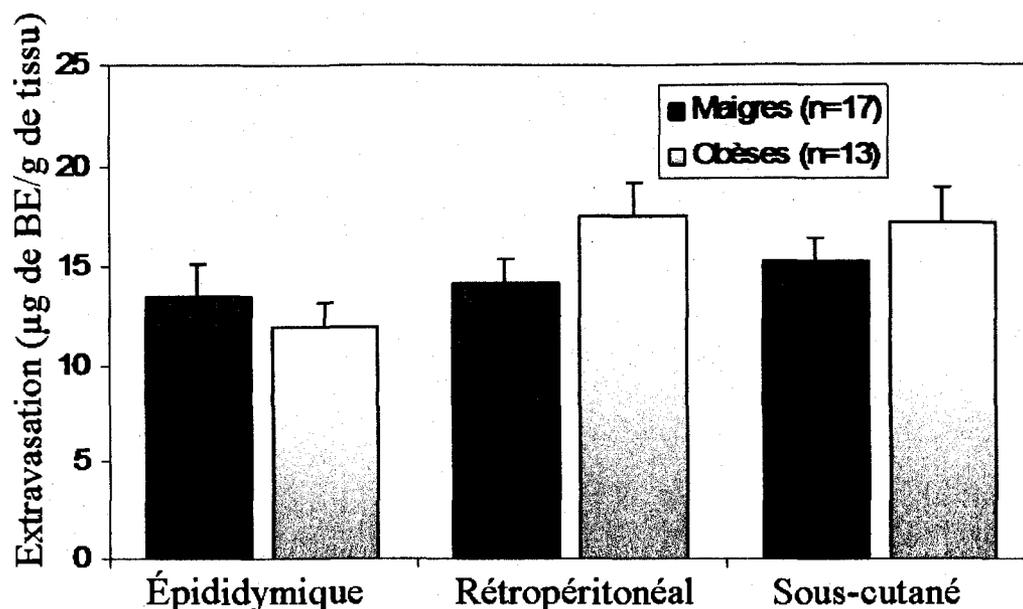


FIGURE 24 : *Extravasation du Bleu d'Evans dans trois différents types de tissu adipeux*

Les résultats sont exprimés en  $\mu\text{g}$  de BE par gramme de tissu. L'expérience est décrite plus précisément dans la section MATÉRIEL ET MÉTHODE.

Moyenne  $\pm$  erreur type (SEM) La significativité fut calculée par le test de t-Student non païré ; aucun des tissus n'a de variation significative ( $p > 0,05$ )

### 3.2.2 Deuxième série d'expériences au Bleu d'Evans

Cette deuxième série a surtout été réalisée pour étudier un plus vaste échantillon de sous-types de tissus adipeux. De façon parallèle, d'autres organes ont aussi été prélevés pour valider les résultats de la première série. L'aorte thoracique a été prélevée à nouveau afin d'augmenter la précision des observations préliminaires. Étant donné qu'elle possède un très petit poids sec, nous avons utilisé, pour cette expérience, une balance d'une plus grande précision et le résultat obtenu démontre qu'il n'y a aucune différence significative pour cet organe (figure 25). Les deux autres tissus prélevés, le pancréas et la rate, ont servi de contrôles afin de voir si les résultats

étaient reproductibles d'une expérience à l'autre. Une augmentation significative de 68,8% ( $p < 0,01$ ) de l'extravasation du BE a été observée dans le pancréas, tandis qu'aucun changement significatif n'a été démontré dans la rate. Ceci confirme les résultats obtenus lors de la première série d'expériences.

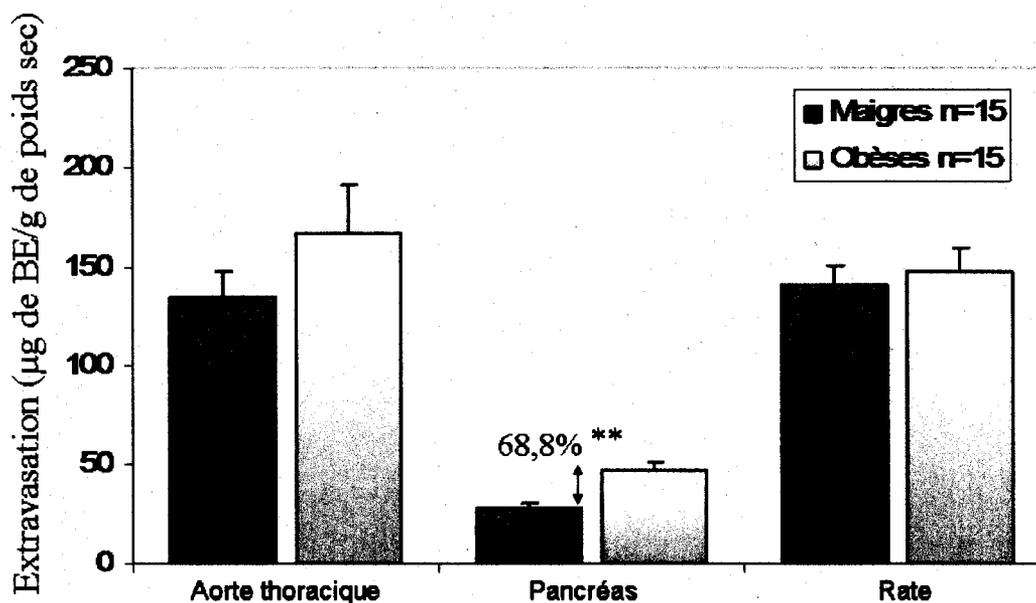


FIGURE 25 : Extravasation du Bleu d'Evans dans les organes prélevés lors de la deuxième expérience

Le prélèvement des divers organes (3) s'est fait suite au sacrifice de l'animal qui a lieu dix minutes après l'injection du Bleu d'Evans via la veine caudale à une dose de 20 mg/kg. Les résultats sont exprimés en µg de BE par gramme de poids sec et le pourcentage de variation est calculé pour chacun des tissus dont la variation est significative. L'expérience est décrite plus précisément dans la section MATÉRIEL ET MÉTHODE.

Moyenne ± erreur type (SEM) La significativité fut calculée par le test de t-Student non païré ; \*\*  $p > 0,01$

Dans cette expérience, six tissus adipeux ont été prélevés et cette fois, jusqu'à quatre morceaux de 500 mg par type de tissu adipeux par animal ont été prélevés, lorsque cela était possible. La figure 26 montre les résultats de BE obtenus pour chacun des six tissus prélevés. Une diminution significative de la perméabilité vasculaire des

deux tissus adipeux viscéraux (épiplœique et mésentérique) chez les rats Zucker obèses a été observée. Pour le tissu adipeux épiplœique, la différence se chiffre à 40,9%, tandis que pour le TA mésentérique, elle est de 48,6% ( $p < 0,01$ ). Le tissu adipeux sous-cutané montre également une diminution significative de 27,6% ( $p < 0,05$ ). Par contre, les trois autres TA (TA épi, TA RP et TA PR) ne montrent aucun changement significatif au niveau de leur perméabilité au BE. Toutefois, pour le TA RP, il y a une tendance à la hausse qui est présente ( $p > 0,06$ ). Les TA viscéraux ont une perméabilité supérieure à celle de tous les autres TA et ce, chez les deux groupes d'animaux étudiés, mais de façon plus remarquable chez les rats contrôles. Le tableau 10 montre la dispersion observée pour les résultats de BE obtenus pour un tissu donné chez un seul animal. Plus le coefficient de variation est élevé, plus les valeurs d'un même animal sont variables. Pour le calcul du coefficient de variation, la mesure de BE devait avoir été faite sur plus d'un morceau de TA pour un même animal.

TABLEAU 10 : Valeurs des coefficients de variation (CV) pour chacun des résultats de BE obtenus dans les six types de tissus adipeux prélevés lors de la deuxième expérience

	Maigres (Fa/?)			Obèses (fa/fa)		
	CV (%)	SEM (%)	n	CV (%)	SEM (%)	n
Épididymique	22,80	4,60	14	32,99	4,41	14
Rétropéritonéal	27,11	3,50	6	14,98	2,62	14
Périrénal	-	-		17,16	4,09	12
Épiploïque	-	-		15,94	3,16	14
Mésentérique	20,65	11,15	4	17,69	3,34	14
Sous-cutané	24,05	4,45	15	22,68	3,11	14

Le tableau présente la moyenne des coefficients de variation à l'intérieur des différents tissus adipeux d'un même animal. Le coefficient de variation a été calculé en divisant l'écart-type pour chaque animal par la moyenne de l'extravasation du BE pour chacun des morceaux prélevés chez ce même animal. La valeur est reportée en pourcentage. Le n représente le nombre d'animaux utilisés pour le calcul de la moyenne de ces coefficients de variation et le SEM est l'erreur-type sur cette moyenne.

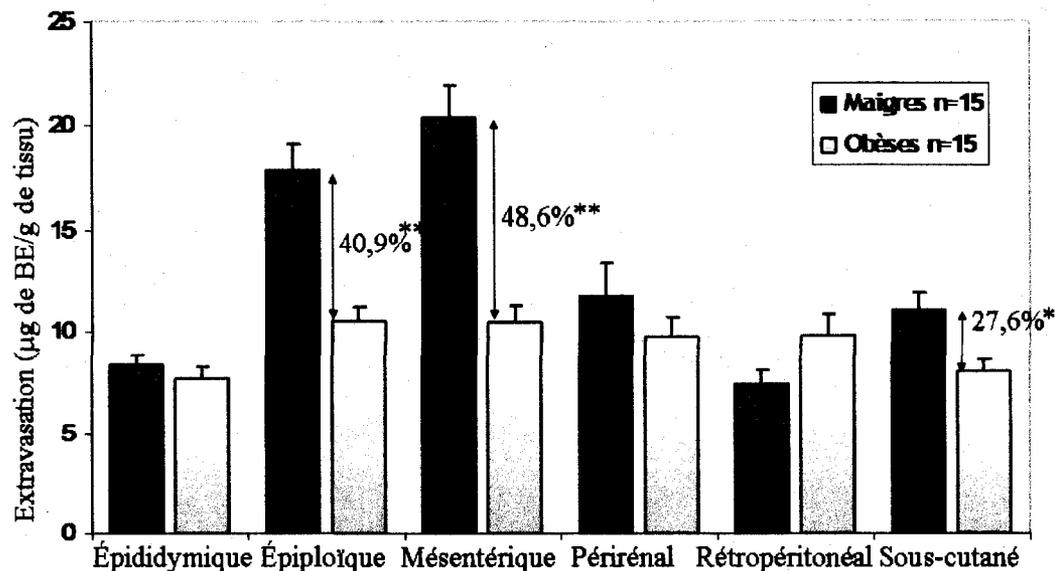


FIGURE 26 : Extravasation du Bleu d'Evans dans les six différents types de tissus adipeux

Le prélèvement des six tissus adipeux s'est fait suite au sacrifice de l'animal qui eu lieu dix minutes après l'injection du Bleu d'Evans via la veine caudale à une dose de 20 mg/kg. Les résultats sont exprimés en  $\mu\text{g}$  de BE par gramme de tissu et le pourcentage de variation est calculé pour chacun des tissus dont la variation est significative. L'expérience est décrite plus précisément dans la section MATÉRIEL ET MÉTHODE.

Moyenne  $\pm$  erreur type (SEM) La significativité fut calculée par le test de t-Student non païré ; \*  $p > 0,05$ , \*\*  $p > 0,01$

### 3.3 PCR quantitatif en temps réel

Le qRT-PCR est la méthode qui a été utilisée pour quantifier l'ARNm des gènes de la eNOS, l'AT<sub>1a</sub>R et le VEGF<sub>164</sub>.

### 3.3.1 Extraction de l'ARN et dosage

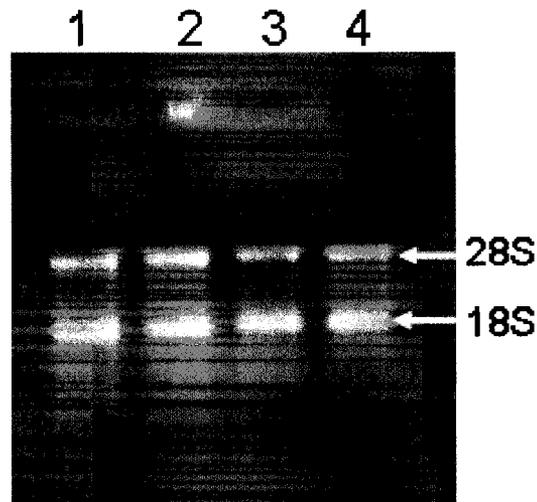


FIGURE 27 : Migration du produit de l'extraction d'ARN de tissu adipeux sous-cutané sur gel d'agarose

L'ARN extrait des tissus adipeux fut dosé par spectrométrie à 260 nm. 1  $\mu$ g d'ARN fut migré sur gel d'agarose 1% dénaturant coloré au bromure d'éthidium et visualisé par fluorescence sous ultraviolet pour vérifier la qualité de l'ARN. Les bandes 28S et 18S de l'ARN ribosomal sont majoritaires et d'intensité semblable entre les échantillons. L'extraction d'ARN est décrite plus en détails dans la section MATÉRIEL ET MÉTHODE.

Description des puits : 1 et 2  $\rightarrow$  Extraction d'ARN de deux rats contrôles maigres 3 et 4  $\rightarrow$  Extraction d'ARN de deux rats obèses.

Suite à l'extraction de l'ARN total et du dosage par spectrométrie, les ARN furent migrés sur gel d'agarose. La figure 27 montre un gel typique suite à l'extraction du tissu adipeux sous-cutané pour deux rats contrôles et deux rats obèses. Le gel permet de montrer que les préparations d'ARN étaient adéquates et non dégradées. Il permet également de vérifier la qualité de l'ARN, car en présence d'une traînée, cela signifierait qu'il y a eu dégradation.

### **3.3.2 Résultats de la réaction de transcription inverse**

Une fois la qualité de l'ARN vérifiée, les échantillons ont subi une réaction de transcription inverse (RT) qui transforme les ARN en ADNc. Afin de vérifier si la réaction de RT avait bien fonctionné et si les échantillons d'ARN n'étaient pas contaminés par de l'ADN génomique, un PCR standard avec AT<sub>1a</sub>R a été réalisé. L'amplification, à l'aide des amorces spécifiques à AT<sub>1a</sub>R, montre une bande à 121 pb qui est présente autant chez les obèses que chez les contrôles. Cette bande n'est pas amplifiée chez les contrôles négatifs, ce qui démontre l'absence de contamination par l'ADN génomique.

### **3.3.3 Mise au point et résultats des PCR quantitatifs en temps réel**

L'étape suivante est la mise au point des qRT-PCR. Pour que les valeurs obtenues à l'aide de cette méthode soient valables, l'efficacité du PCR pour le gène servant de contrôle interne doit être à plus ou moins 5 % de différence avec l'efficacité du PCR des différents gènes étudiés. Le tableau 11 montre les pourcentages d'efficacité de PCR pour chacune des paires d'amorces, ainsi que la différence d'efficacité entre les gènes étudiés et le gène de référence, c'est-à-dire la  $\beta$ -actine.

TABLEAU 11 : Valeurs des variations d'efficacité du PCR pour chacune des paires d'amorces par rapport au gène de référence ( $\beta$ -actine)

		Actine	Gène d'intérêt	delta
eNOS	%	90,3	90,0	-0,3
	r	0,991	0,998	
AT <sub>1a</sub> R	%	83,6	79,8	-3,8
	r	0,992	0,994	
VEGF <sub>164</sub>	%	77,7	74,8	-2,9
	r	0,990	0,990	

Le tableau présente les valeurs d'efficacité de chacune des paires d'amorces. Afin qu'il soit possible d'utiliser la  $\beta$ -actine comme contrôle interne, il fallait s'assurer que l'efficacité du PCR avec ces amorces était semblable à celle des amorces pour chacun des gènes de référence. L'efficacité a été calculée à partir d'un qRT-PCR effectué avec une dilution sérielle d'ADNc. Chaque point de la dilution relié donne une droite permettant au logiciel du système de détection du iCycler iQ de calculer l'efficacité de l'amplification, ainsi que le coefficient de corrélation (r). La réaction de PCR quantitatif est décrite plus précisément dans la section MATÉRIEL ET MÉTHODE.

La figure 28 est un exemple des graphiques obtenus suite à la réalisation des qRT-PCR à l'aide du système de détection du iCycler iQ et du iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories). En a), ce sont les courbes d'émissions de fluorescences obtenues lors d'un qRT-PCR avec les amorces spécifiques à eNOS, AT<sub>1a</sub>R et  $\beta$ -actine et en b), c'est pour un qRT-PCR VEGF<sub>164</sub> et  $\beta$ -actine. Pour ces deux graphiques, la première vague de courbes correspond à l'amplification du gène de la  $\beta$ -actine dans les deux groupes d'animaux. La deuxième vague correspond aux gènes d'intérêt. Les graphiques c) et d) correspondent aux courbes de dénaturation des différents amplicons. La présence d'un seul pic par paire d'amorces est le signe d'amplification d'un seul amplicon et donc de la spécificité des amorces.

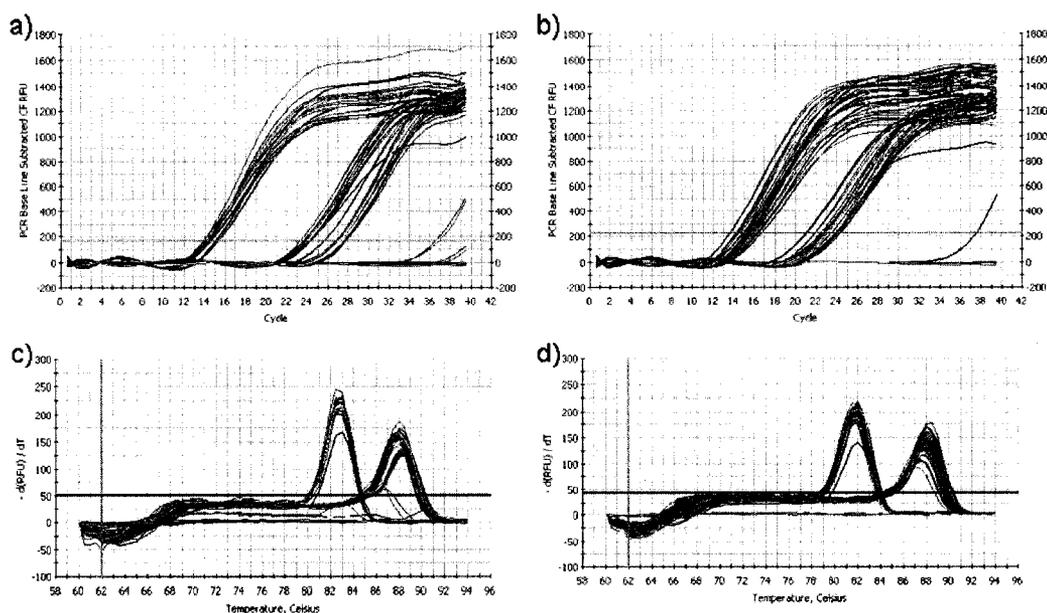


FIGURE 28 : Résultats des qRT-PCR *eNOS*, *AT<sub>1a</sub>R* et *VEGF<sub>164</sub>* avec le contrôle de  $\beta$ -actine : Courbes d'amplification et courbes de dénaturation

Le qRT-PCR fut fait à l'aide du système de détection du iCycler iQ et du iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories). Chacune des expériences fut faite en triplicatas pour chacun des gènes de chaque rat. Le graphique a) présente la fluorescence émise à chaque cycle durant l'amplification pour chacune des paires d'amorces et pour chacun des échantillons présents. La ligne horizontale montre où ont été prises les valeurs de  $C_t$ . Le premier groupe de courbes ( $C_t$  entre 14 et 16) correspond à l'amplification du gène de la  $\beta$ -actine. La deuxième zone ( $C_t$  entre 23 et 25) correspond au gène de l'*AT<sub>1a</sub>R*, tandis que pour la *eNOS*, les  $C_t$  se retrouvent entre 26 et 28. Le graphique b) présente la fluorescence émise à chaque cycle durant l'amplification pour la  $\beta$ -actine et le *VEGF<sub>164</sub>*, pour chacun des échantillons présents. Encore une fois, la première zone ( $C_t$  entre 13 et 17) correspond à l'amplification du gène de la  $\beta$ -actine. Le deuxième groupe ( $C_t$  entre 21 et 25) correspond au gène du *VEGF<sub>164</sub>*. Le graphique en c) représente les résultats de la dénaturation des amplicons. Un seul amplicon est présent par paire d'amorces ( $\beta$ -actine ;  $\sim 88^\circ\text{C}$ , *AT<sub>1a</sub>R* ;  $\sim 83^\circ\text{C}$  et *eNOS* ;  $\sim 88,5^\circ\text{C}$ ). Le graphique en d) représente les résultats de la dénaturation des amplicons. Un seul amplicon est présent par paire d'amorces ( $\beta$ -actine ;  $\sim 88^\circ\text{C}$  et *VEGF<sub>164</sub>* ;  $\sim 82^\circ\text{C}$ ). La réaction de PCR quantitatif est décrite plus précisément dans la section MATÉRIEL ET MÉTHODE.

Suite aux qRT-PCR, les échantillons furent migrés sur gel d'agarose, afin de confirmer qu'un seul amplicon a été amplifié et que celui-ci avait la taille attendue.

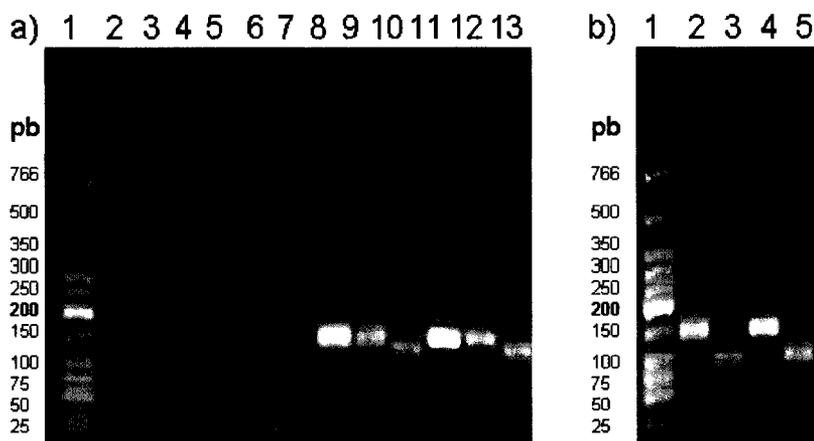


FIGURE 29 : Migration sur gel d'agarose du produit de la réaction de PCR quantitatif en temps réel avec les amorces spécifiques à  $\beta$ -actine, à eNOS, à  $AT_{1a}R$  et à  $VEGF_{164}$  à partir de tissus adipeux rétro-péritonéaux

Les produits de la qRT-PCR avec les amorces spécifiques aux gènes d'intérêt (eNOS,  $AT_{1a}R$  et  $VEGF_{164}$ ) et avec le gène servant de contrôle interne, la  $\beta$ -actine, furent migrés sur gel d'agarose 2,5% coloré au bromure d'éthidium et visualisés par fluorescence sous ultraviolet. L'amplicon de la  $\beta$ -actine possède 145 pb, celui de la eNOS 144pb, de l' $AT_{1a}R$  121 pb et celui du  $VEGF_{164}$  seulement 96 pb. Le qRT-PCR est décrit plus en détails dans la section MATÉRIEL ET MÉTHODE.

Description des puits : a) 1 → Marqueur d'ADN de bas poids moléculaire (BioLabs) 2 → Contrôle négatif (C-) de RT ( $\beta$ -actine) 3 → C- de RT (eNOS) 4 → C- de RT ( $AT_{1a}R$ ) 5 → C- rat maigre ( $\beta$ -actine) 6 → C- rat maigre (eNOS) 7 → C- rat maigre ( $AT_{1a}R$ ) 8 → Rat maigre ( $\beta$ -actine) 9 → Rat maigre (eNOS) 10 → Rat maigre ( $AT_{1a}R$ ) 11 → Rat obèse ( $\beta$ -actine) 12 → Rat obèse (eNOS) 13 → Rat obèse ( $AT_{1a}R$ ).  
b) 1 → Marqueur d'ADN de bas poids moléculaire (BioLabs) 2 → Rat maigre ( $\beta$ -actine) 3 → Rat maigre ( $VEGF_{164}$ ) 4 → Rat obèse ( $\beta$ -actine) 5 → Rat obèse ( $VEGF_{164}$ ).

La figure 29 est le résultat de l'un de ces gels. Le gel présenté en a) démontre l'absence d'amplification pour les blancs (puits 2 à 4) (absence de contamination des réactifs) ainsi que pour les contrôles négatifs (puits 5 à 7) (absence de contamination des ARNs) pour les trois gènes ( $\beta$ -actine, eNOS et  $AT_{1a}R$ ). Les puits 8 et 11 montrent une bande de 145 pb correspondant à l'amplification de la  $\beta$ -actine, chez un rat contrôle et chez un rat obèse respectivement. La bande de 144 pb des puits 9 et 12 sont le résultat du qRT-PCR pour le gène de la eNOS, tandis que la bande à 121 pb

des puits 10 et 13 est pour le gène de l'AT<sub>1a</sub>R. Le gel présenté en b) correspond à l'amplification du gène de la  $\beta$ -actine (145 pb) dans les puits 2 et 4 et au gène du VEGF<sub>164</sub> (96 pb) dans les puits 3 et 5.

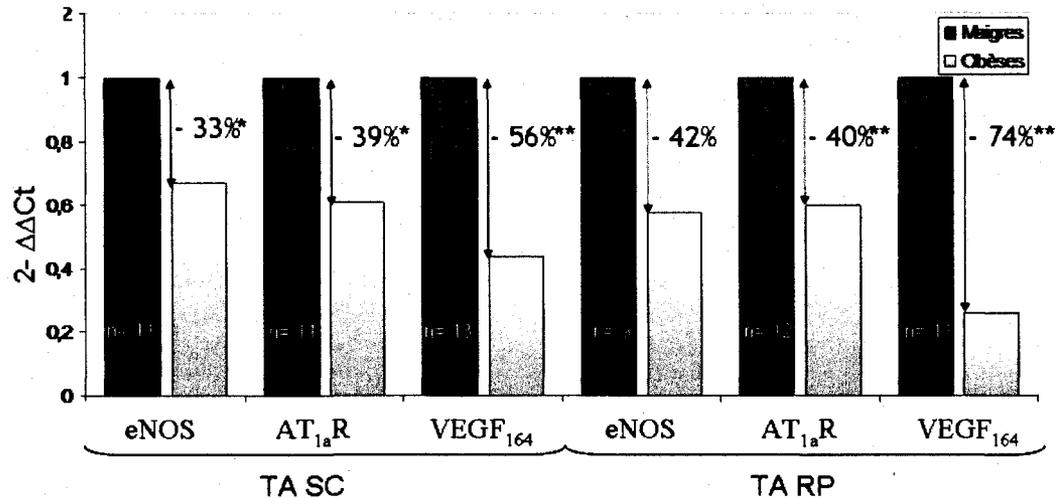


FIGURE 30 : *PCRs* quantitatifs en temps réel des gènes *eNOS*, *AT<sub>1a</sub>R* et *VEGF<sub>164</sub>* dans les tissus adipeux sous-cutanés (TA SC) et rétropéritonéaux (TA RP) analysés avec la méthode du  $2^{-\Delta\Delta C_t}$

Les gènes d'intérêt (*eNOS*, *AT<sub>1a</sub>R* et *VEGF<sub>164</sub>*) sont reportés sur l'expression du gène de la  $\beta$ -actine, servant de gène de référence. Par la suite, les résultats obtenus furent analysés selon la méthode de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . Le TA RP comprend également le tissu adipeux périrénal. L'analyse des qRT-PCR est décrite plus longuement dans la section MATÉRIEL ET MÉTHODE.

L'histogramme représente les valeurs de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . Par contre, les statistiques ont été faites sur les valeurs de  $\Delta C_t$  (gène étudié - actine). La significativité fut calculée par le test de t-Student non païré ; \*  $p > 0,05$ , \*\*  $p > 0,01$

La figure 30 montre les histogrammes de la compilation des résultats de qRT-PCR pour les trois gènes d'intérêt dans le tissu adipeux sous-cutané et dans le tissu adipeux rétropéritonéal. Les résultats ont été analysés avec la méthode du  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  décrite à la section 2.4.4. Tout d'abord, pour le TA SC, différents impacts sur les concentrations d'ARN de plusieurs gènes ont été observés. Dans le cas de la *eNOS*, la diminution est

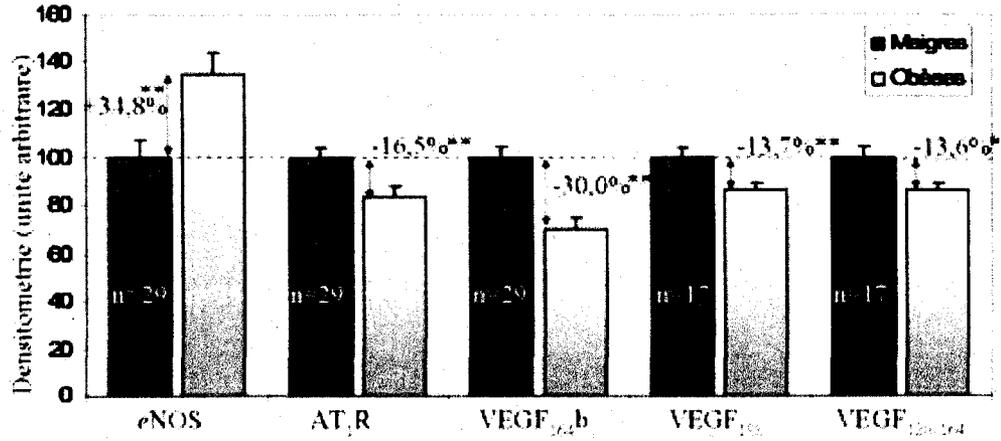
de l'ordre du 33% ( $p < 0,05$ ), pour l'AT<sub>1a</sub>R de 39% ( $p < 0,05$ ) et pour le VEGF<sub>164</sub>, elle est supérieure (56% ( $p < 0,01$ )). D'autre part, dans le TA RP, des diminutions ont également été observées pour tous les gènes. Par contre, la diminution de 42% pour le gène de la eNOS était non significative. Pour ce qui est de l'AT<sub>1a</sub>R, une diminution de 40% ( $p < 0,01$ ) fut également observée et pour le gène du VEGF<sub>164</sub> la diminution était encore plus grande, soit de 74% ( $p < 0,01$ ).

### ***3.4 Immunobuvardage de type Western***

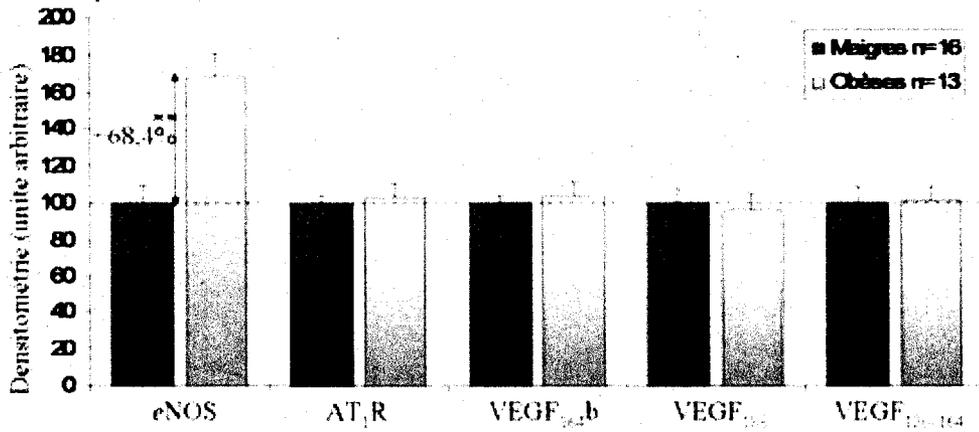
Des expériences d'immunobuvardage de type Western ont été effectuées pour quantifier l'expression protéique des différentes protéines d'intérêts. Les Western ont été réalisés sur la protéine eNOS, sur le récepteur de l'angiotensine de type 1, ainsi que sur différentes isoformes du VEGF A et ce, sur trois différents sous-types de tissus adipeux (TA SC, TA RP et TA épi). Les figures 31 A, B et C compilent les résultats de tous les immunobuvardages effectués en les séparant par tissu d'intérêt : SC, RP et épi. Pour le TA SC, on peut noter une augmentation de 34,8% ( $p < 0,01$ ) de l'expression de la eNOS chez les rats Zucker obèses comparativement aux contrôles. Pour toutes les autres protéines étudiées, une diminution de leur expression a été observée. L'AT<sub>1</sub>R est diminué de 16,5% ( $p < 0,01$ ), tandis que le VEGF<sub>164b</sub> l'est de 30,0% ( $p < 0,01$ ) chez les obèses comparativement aux maigres. Pour ce qui est des autres isoformes du VEGF A, une diminution de leurs expressions a également été observée chez les rats obèses (VEGF<sub>188</sub> 13,7%,  $p < 0,01$  et VEGF<sub>120-164</sub> 13,6%,  $p < 0,05$ ). Par contre, pour le tissu adipeux rétro-péritonéal, seule l'expression de la eNOS a changé de façon significative. Une augmentation de 68,4% ( $p < 0,01$ ) de son

expression a en effet été démontrée. Dans le troisième tissu adipeux étudié, seule l'expression de l'inhibiteur du VEGF, le VEGF<sub>164b</sub>, a montré une diminution chez le rat obèse versus chez le rat contrôle (31,2%,  $p < 0,05$ ). Toutes les autres protéines étudiées ne présentent aucun changement significatif de leur expression quand les deux groupes d'animaux sont comparés entre eux.

## a) Sous-cutané



## b) Rétropéritonéal



## c) Épididymique

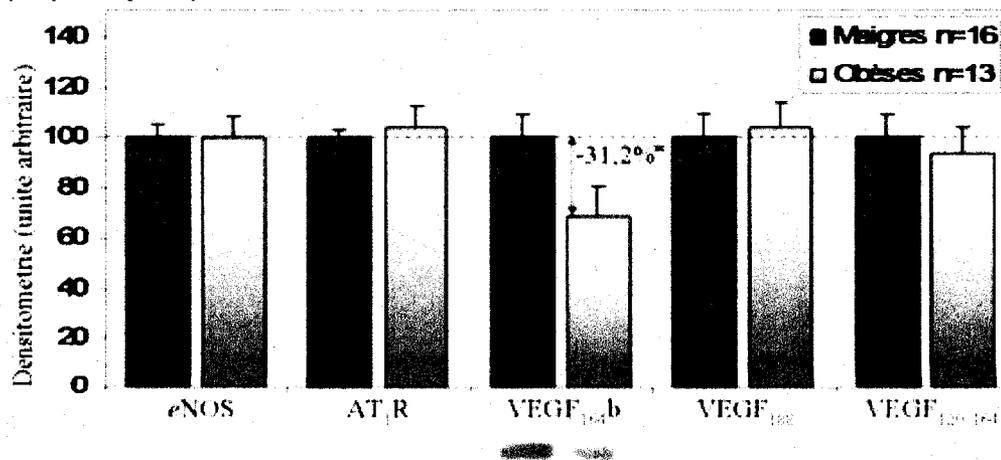


FIGURE 31 : Immunobuvardage de type Wertern (description page suivante)

FIGURE 31 : Immunobuvardage de type Western pour les protéines eNOS, AT<sub>1</sub>R, VEGF<sub>164b</sub> et VEGF A (188, 164 et 120) pour les tissus adipeux sous-cutané (a), rétropéritonéal (b) et épидидymique (c).

Le tissu adipeux rétropéritonéal comprenait le tissu adipeux périrénal. L'équivalent d'environ 20 µg de protéines extraites des divers types de tissus adipeux a été déposé par puit pour être séparé sur gel SDS-PAGE. La révélation a eu lieu par chemiluminescence et les résultats ont été exprimés en unités arbitraires de densitométrie. La bande pour le eNOS a un poids de 140 kDa, pour AT<sub>1</sub>R, une bande à 60 kDa a été observée, le VEGF<sub>164b</sub> se retrouve à 22 kDa, le VEGF<sub>188</sub> à 50 kDa, le VEGF<sub>164</sub> à 31 kDa et le VEGF<sub>120</sub> à 28 kDa. L'immunobuvardage de type Western est décrit plus en détails dans la section MATÉRIEL ET MÉTHODE.

Moyenne ± erreur type (SEM) La significativité fut calculée par test de t-Student non paillé ; \*  $p > 0,05$ , \*\*  $p > 0,01$

### 3.5 Microscopie électronique à transmission

La morphologie des cellules endothéliales, ainsi que celles des adipocytes dans trois différents tissus adipeux a été étudiée par microscopie électronique. Cette étude a consisté en l'observation attentive des jonctions cellulaires et du nombre de vésicules de transport présentes sur les cellules endothéliales. Le nombre de vésicules dans la membrane des adipocytes a également été examiné. La figure 32 montre une cellule endothéliale typique, pour chacun des groupes de TA étudiés. Au niveau du nombre de vésicules présentes sur les cellules endothéliales, aucune distinction marquante n'est ressortie entre les trois types de tissus adipeux étudiés. Par contre, il semble y avoir un nombre légèrement supérieur de vésicules dans les cellules endothéliales du tissu adipeux sous-cutané, par rapport aux deux autres sous-types de tissus adipeux chez les rats maigres.

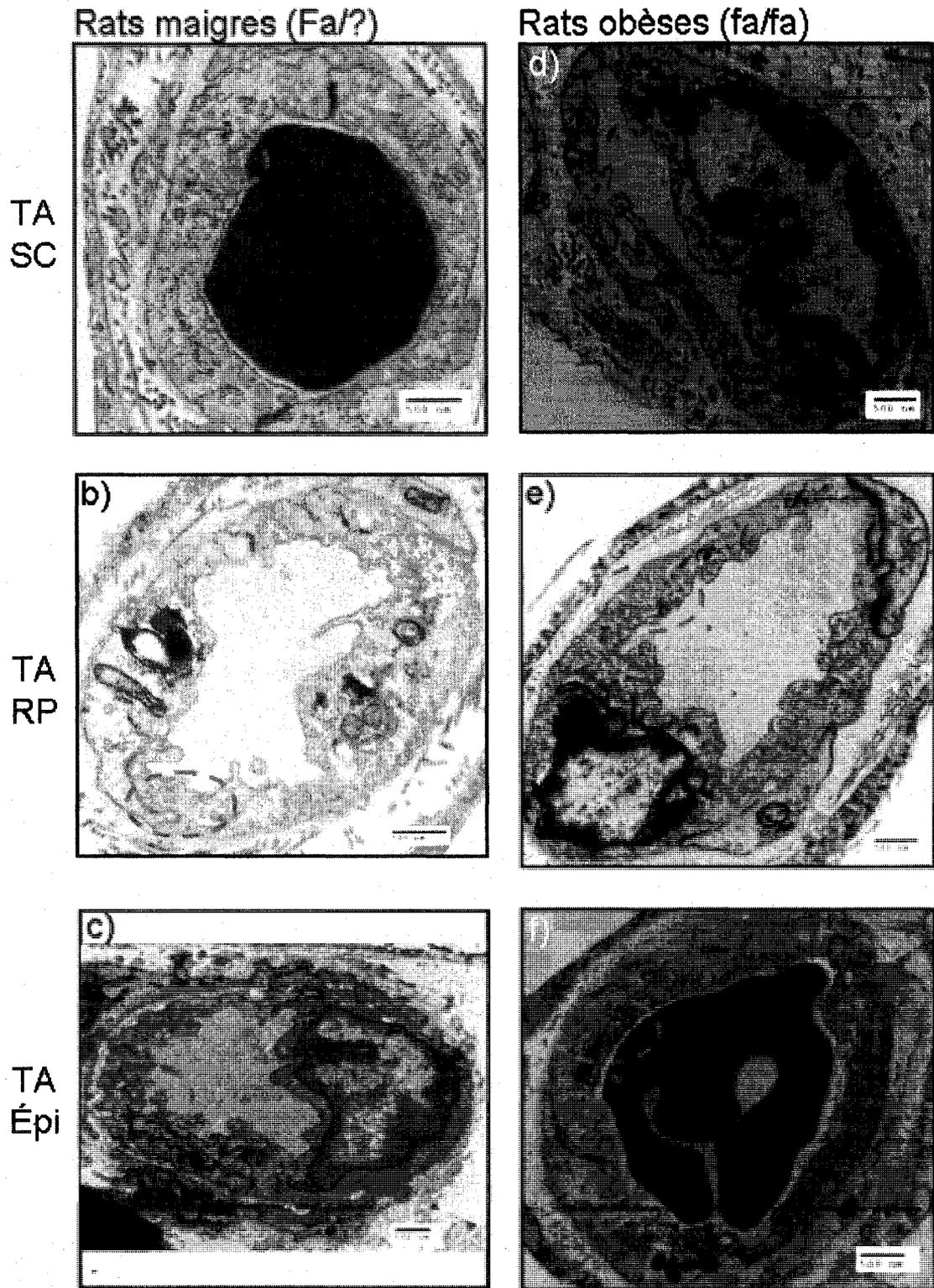


FIGURE 32 : Cellules endothéliales des divers tissus adipeux de rats Zucker Fa/? et fa/fa prises par microscopie électronique à transmission (description page suivante)

*FIGURE 32 : Cellules endothéliales des divers tissus adipeux de rats Zucker Fa/? et fa/fa prises par microscopie électronique à transmission*

Suite au prélèvement des trois tissus adipeux, un morceau de ceux-ci a été déposé dans la glutaraldéhyde, puis fixé dans la résine. Les photos ont été prises avec un grossissement de 25 000 - 30 000 X selon la photo. Les cellules endothéliales présentes en a, b et c proviennent de rats Zucker Fa/?, tandis que celles en d, e et f ont été prises chez des rats fa/fa. Les images a et d ont été prises dans le tissu adipeux sous-cutané (TA SC), celles en b et e proviennent du tissu adipeux rétro-péritonéal (TA RP) et celles en c et f du tissu adipeux épидidymique (TA Épi). Les cercles rouges montrent des régions riches en cavéoles. Les photos présentées sont représentatives de plus de vingt cellules endothéliales prises sur 6 rats à raison de deux coupes par rat. La préparation des échantillons pour la microscopie électronique est décrite plus précisément dans la section MATÉRIEL ET MÉTHODE.

La figure 33 présente avec plus de détails les jonctions cellulaires des cellules endothéliales dans le TA SC des rats obèses et maigres. En a), la jonction cellulaire exposée provient d'une cellule endothéliale du tissu adipeux sous-cutané d'un rat contrôle, alors que celle présentée en b) vient du même tissu adipeux, mais d'un rat obèse. Les jonctions chez les deux groupes ne présentent pas de différences majeures. L'image de la figure 33 c) montre que les adipocytes possèdent également des vésicules de transcytose pour permettre les échanges avec la circulation sanguine.

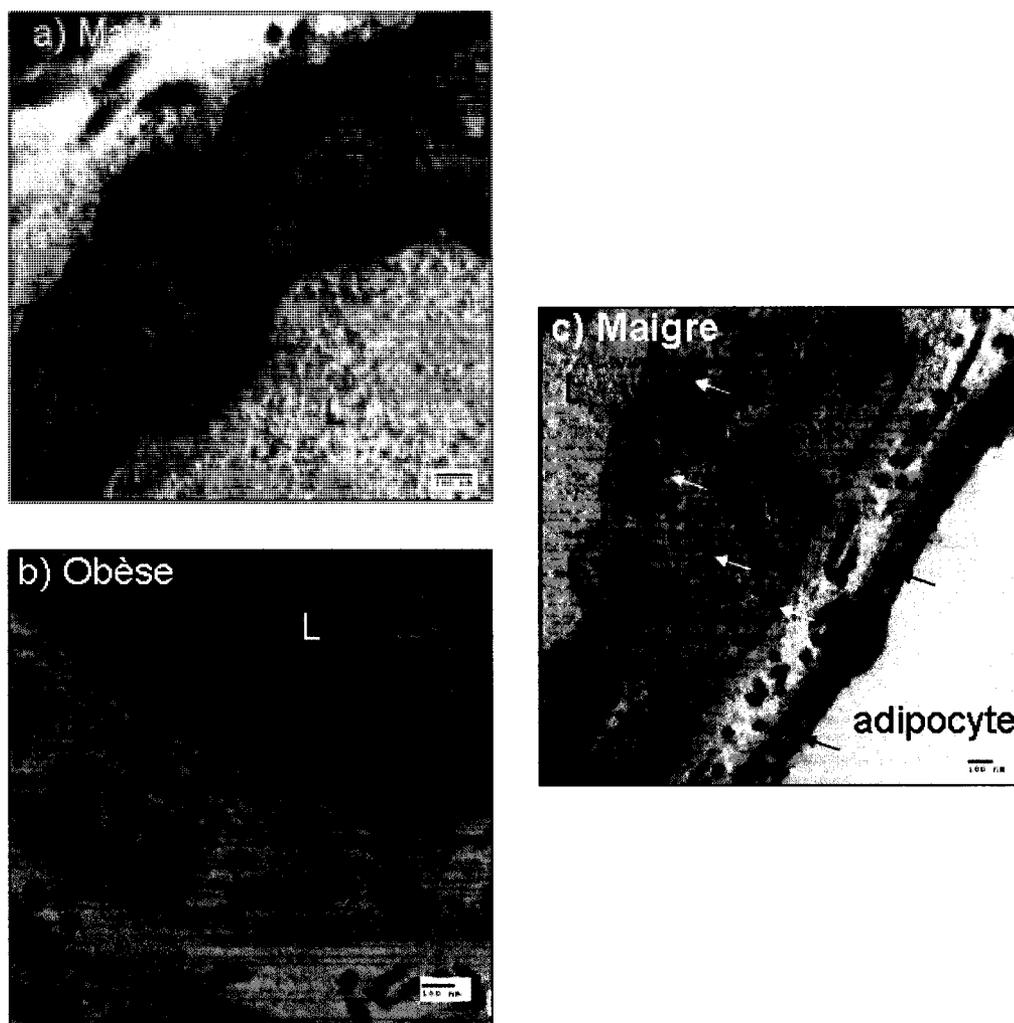


FIGURE 33 : *Jonctions des cellules endothéliales et adipocytes du tissu adipeux sous-cutané prises par microscopie électronique à transmission*

Les photos ont été prises à des grossissements entre 80 000 - 120 000 X. La photo a) représente une jonction cellulaire d'une cellule endothéliale de rat Zucker contrôle, tandis que celle en b) provient d'un rat Zucker obèse. La photo en c) représente les cavéoles présentes autant sur la cellule endothéliale que sur l'adipocyte d'un rat Zucker maigre. Les photos présentées sont représentatives de plus de vingt cellules endothéliales prises sur 6 rats à raison de deux coupes par rats. La préparation des échantillons pour la microscopie électronique est décrite plus précisément dans la section MATÉRIEL ET MÉTHODE.

L → lumière du capillaire, flèches blanches → cavéoles sur la cellule endothéliale, flèches noires → cavéoles sur l'adipocyte.

## 4 DISCUSSION

La microcirculation et de fait l'endothélium, jouent des rôles importants tant dans la physiologie normale que dans différentes conditions pathophysiologiques. Il est bien documenté que l'obésité mène à une dysfonction endothéliale entraînant des complications cardiovasculaires importantes (STEINBERG, CHAKER *et al.*, 1996; CABALLERO, 2003; POIRIER et DESPRES, 2003). Dans le modèle de rat Zucker, il a aussi été démontré qu'il y avait des changements au niveau de la perméabilité vasculaire dans le muscle strié. Il a été identifié dans notre laboratoire qu'il y avait par exemple, une augmentation de 52,8% de la perméabilité vasculaire dans le vastus lateralis du rat fa/fa par rapport au rat contrôle (ST-PIERRE, BOUFFARD *et al.*, 2006). Il n'est pas entièrement clair si ces changements pourraient, par exemple, contrecarrer l'extrême insulino-résistance observée dans le muscle strié de ce modèle animal, en permettant un meilleur accès des nutriments et de l'insuline à ce tissu cible. Jusqu'à maintenant, très peu de données de ce type existent pour le tissu adipeux; ceci est surprenant considérant le rôle important qu'ont les adipocytes dans la physiopathologie et le maintien de l'obésité chez l'humain. Mon travail de maîtrise visait à explorer la vasoperméabilité et la régulation de plusieurs protéines avec des actions endothéliales dans le tissu adipeux du modèle de rat Zucker.

#### **4.1 Le rat Zucker obèse et ses caractéristiques métaboliques**

La mutation au niveau l'hypothalamus du récepteur à la leptine dans le modèle du rat Zucker fa/fa obèse rend ces derniers hyperphagiques. Le contrôle de la prise alimentaire par la leptine est donc inexistant, ce qui cause un excès de poids important chez les rats homozygotes fa/fa. La prise de poids marquée et les augmentations plasmatiques de l'insuline et des triglycérides chez les rats obèses (tableau 9) sont cohérents avec ce que l'on retrouve dans la littérature pour ce modèle (ERINGA, STEHOUWER *et al.*, 2007; ZUCKER et ZUCKER, 1961; JANIAK, POIRIER *et al.*, 2007; NAMIKOSHI, TOMITA *et al.*, 2007). Les mesures plasmatiques des nitrites / nitrates ont révélé une faible diminution des nitrites (1,61  $\mu\text{mol/L}$  à 1,34  $\mu\text{mol/L}$ ;  $p < 0,05$ ) chez les obèses et aucun changement au niveau des nitrates (tableau 9). Bien que logiquement on aurait pu s'attendre à mesurer moins de métabolites du NO, il est possible que les concentrations plasmatiques de ce marqueur ne reflètent pas bien les phénomènes qui surviennent plus localement. Dans la littérature, une autre étude réalisée sur les rats Zucker a, elle aussi, montré aucune différence significative pour les taux de  $\text{NO}_x$  plasmatiques (RIAZI, MADALA-HALAGAPPA *et al.*, 2007). Les taux plasmatiques de VEGF A ont également été mesurés dans les deux groupes d'animaux. Ce dosage n'a décelé aucun changement significatif entre les animaux obèses et les contrôles (tableau 9). Ce résultat obtenu n'est cependant pas concordant avec les données de deux autres études sur les rats Zucker qui ont montré une augmentation des taux sériques du VEGF A (LAMARRE, RUGGIERI *et al.*, 2007; MYDLO, GERSTEIN *et al.*, 2003). Les raisons derrière ces différences ne sont actuellement pas claires mais,

pourraient être liées au type de trousse utilisé, à la spécificité des anticorps ou aux conditions de prélèvement.

#### ***4.2 Extravasation du Bleu d'Evans***

La perméabilité microvasculaire dans le tissu adipeux a été évaluée utilisant la méthode d'extravasation du Bleu d'Evans. Cette méthode s'appuie sur le principe de liaison entre cette molécule et l'albumine, ce qui permet de quantifier l'extravasation des macromolécules. La mesure de la perméabilité vasculaire a été effectuée sur deux séries d'animaux. Le pancréas et la rate ont été utilisés pour vérifier la reproductibilité des résultats entre les séries (figure 23 et 25).

En somme, les mesures de perméabilité chez le rat obèse ont montré une diminution significative de l'extravasation des macromolécules dans les tissus adipeux épiploïque, mésentérique et sous-cutané. Ces conclusions viennent essentiellement de la deuxième série d'expériences dans laquelle nous avons pris un plus grand soin à séparer les différents sous-types de tissus adipeux, et avons fait les mesures de Bleu d'Evans sur plusieurs «aliquots» d'un même tissu.

À notre avis, deux points importants sur ces résultats de perméabilité méritent d'être discutés. En premier lieu, on retrouve l'hétérogénéité observée pour les mesures de vasoperméabilité entre les différents sous-types de tissus adipeux. Les résultats obtenus avec le Bleu d'Evans montrent en effet une grande hétérogénéité au niveau du contrôle de la perméabilité vasculaire des différents tissus adipeux. Les changements les plus importants furent observés dans les tissus viscéraux (-40 à -50%) puis dans le tissu sous-cutané (-30%), tandis que dans le TA péritonéal, la perméabilité semblait

plutôt augmentée chez les rats obèses. Par ailleurs, les deux autres tissus adipeux étudiés ne semblaient pas varier d'un groupe à l'autre. Le contrôle de la perméabilité est possiblement en lien avec la fonction et l'implication du tissu adipeux au niveau métabolique. Par exemple, il a été démontré que les tissus adipeux intra-abdominaux possèdent une vascularisation et une lipolyse plus grande que les tissus adipeux sous-cutanés. Cela explique une vulnérabilité plus grande des tissus intra-abdominaux aux changements d'entreposage des lipides et pourrait également expliquer l'hétérogénéité observée dans le contrôle de la perméabilité endothéliale. De plus, dans les tissus adipeux intra-abdominaux, on retrouve des tissus adipeux portaux (mésentérique et épiploïque) et des tissus adipeux non-portaux (rétropéritonéal, péirénal et épидидymique). Il existe une grande différence dans les résultats de perméabilité entre ces deux groupes de tissus. Les tissus adipeux portaux semblent subir un contrôle beaucoup plus rigoureux que les autres tissus.

En deuxième lieu, les tissus adipeux viscéraux (épiploïque et mésentérique) sont ceux qui subissent les diminutions les plus importantes de l'extravasation du Bleu d'Evans. Ceci peut résulter d'une diminution de la perméabilité microvasculaire, mais également d'une réduction du débit sanguin ou alors d'une réduction du nombre de capillaires fonctionnels dans ce tissu. Le tissu adipeux épiploïque, recouvrant le système digestif, présente une diminution de 40,9%; tandis que le tissu adipeux mésentérique, celui retrouvé entre les anses de l'intestin, diminue de 48,6%. Parce qu'ils drainent directement dans la veine porte, ces deux sous-types de tissus adipeux sont théoriquement plus susceptibles de causer des perturbations métaboliques importantes (hypertriglycéridémie, insulino-résistance hépatique, activation de la cascade inflammatoire, etc.) (DESPRES, 2006).

Une diminution de la perméabilité endothéliale dans le tissu adipeux pourrait avoir un impact positif sur l'obésité pour différentes raisons. En fait, une diminution de la perméabilité vasculaire signifie qu'il y a moins d'échanges réalisés au niveau des lits capillaires situés dans ces tissus. Donc, une diminution des échanges de la circulation sanguine vers le tissu adipeux pourrait résulter en une diminution de l'entreposage des lipides dans ce tissu. Étant donné que les tissus adipeux n'ont pas tous la même diminution de la perméabilité, cela pourrait mener à une relocalisation des graisses à l'intérieur des divers types de tissus adipeux. Cette relocalisation pourrait, par exemple, mener à un entreposage lipidique dans des tissus adipeux qui sont métaboliquement moins actifs et qui ne drainent pas dans la veine porte. Le fait de restreindre l'entreposage des graisses dans les tissus adipeux viscéraux, au profit d'autres dépôts adipeux, pourrait limiter la relâche d'acides gras libres dans le système porte et ainsi, réduire l'accumulation de lipides au niveau du foie. Par ailleurs, une diminution de la perméabilité endothéliale pourrait réduire les échanges de l'adipocyte vers la circulation sanguine pour les acides gras libres, mais également pour toutes les autres adipokines. Parmi les adipokines, certaines, telles que TNF- $\alpha$ , IL-6 et la résistine, lorsque libérées en excès, induisent une résistance à l'insuline. Donc, une diminution de la perméabilité dans les tissus adipeux pourrait diminuer leur sécrétion et aider à diminuer l'insulinorésistance. En somme, une diminution de la perméabilité microvasculaire dans les tissus adipeux intra-abdominaux pourrait réduire la capacité de ce tissu à réaliser deux importants rôles : l'entreposage des lipides et les fonctions endocriniennes.

Les sections suivantes porteront sur des observations plus moléculaires faites dans les différents sous-types de tissu adipeux. Étant donné la quantité limitée de tissu, il ne

sera possible de faire un parallèle avec les résultats du Bleu d'Evans que pour les tissus adipeux sous-cutané, rétropéritonéal et épидидymique.

### 4.3 Tissu adipeux sous-cutané

Dans l'étude de la perméabilité vasculaire du tissu adipeux sous-cutané, nous avons observé une diminution significative de l'extravasation du Bleu d'Evans dans le rat Zucker obèse (figure 26). La figure 34 intègre tous les résultats obtenus sur l'expression en ARNm et en protéine de l'enzyme eNOS, du récepteur AT<sub>1</sub>R et du VEGF A dans le tissu adipeux sous-cutané des deux groupes d'animaux.

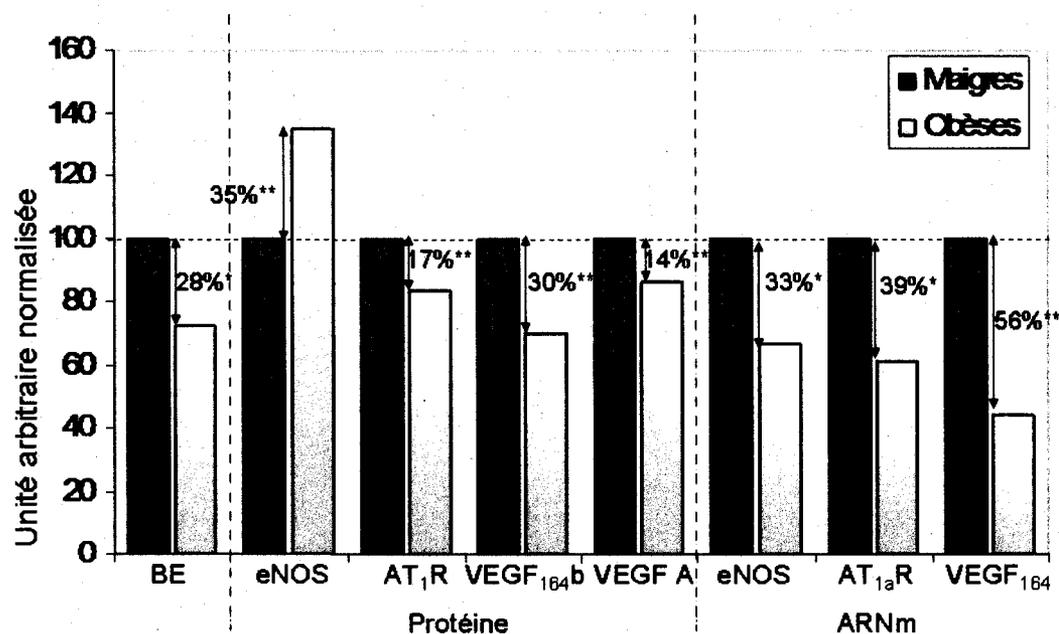


FIGURE 34 : Histogramme démontrant les changements de la perméabilité vasculaire, d'expression d'ARN et protéique en pourcentage dans le tissu adipeux sous-cutané

Compilation de tous les résultats obtenus pour le tissu adipeux sous-cutané exprimés en unités arbitraires normalisées à 100 pour les contrôles. Au niveau protéique, VEGF A comprend les isoformes 188, 164 et 120. La significativité fut calculée par le test de t-Student non-pairé ; \* $p > 0,05$ , \*\* $p > 0,01$ .

Dans un premier temps, regardons les changements d'expression de la eNOS, enzyme à l'origine de la production du monoxyde d'azote, molécule ayant la capacité d'occasionner une vasodilatation et l'ouverture des jonctions intercellulaires. Au niveau de l'ARNm, nous avons constaté une diminution de 33% de son expression chez les rats *fa/fa* (figure 30 et 34). Néanmoins, les résultats d'immunobuvardage de type Western démontrent une augmentation significative de 35% de la protéine eNOS dans ce même tissu (figure 31 et 34). Cette discordance entre l'expression en ARNm, précurseur de la protéine, et l'expression de la protéine eNOS elle-même pourrait s'expliquer par des changements post-transcriptionnels qui pourraient soit impliquer des modifications de traduction de ces ARNm dans l'appareil ribosomal de l'adipocyte, soit des facteurs qui pourraient affecter la stabilité des ARNm en augmentant, par exemple, leur dégradation dans le cytoplasme ou pendant leur transit à partir du noyau (CHEN, GHARIB *et al.*, 2002; GREENBAUM, COLANGELO *et al.*, 2003). Plusieurs études dans la littérature portent sur l'expression de la NOS dans le tissu adipeux. L'une d'elles rapporte des résultats dans le modèle de rat Zucker et démontre une diminution à la fois de l'expression de la eNOS en ARNm et en masse immunoréactive (VALERIO, CARDILE *et al.*, 2006). Pour les ARNm, ce groupe de recherche a utilisé le même contrôle interne et la même technique d'analyse que nous. Pour ce qui est des Western, le même anticorps à la même dilution que celle que nous avons utilisée a été employé. Cependant, le sous-type de tissu adipeux utilisé pour leurs analyses n'était pas spécifié et il est possible que l'hétérogénéité que nous avons observée entre les sous-types de tissu soit une variable confondante importante pour comparer nos résultats à ceux de cet autre groupe. De plus, des études portant sur l'humain ont démontré, pour leur part, une augmentation de l'expression protéique de

la eNOS, dans le tissu adipeux sous-cutané des sujets obèses (RYDEN, ELIZALDE *et al.*, 2001; GALVIN, BARAKAT *et al.*, 2005). En somme, l'observation d'une augmentation de l'expression de la protéine eNOS devrait résulter en une augmentation de perméabilité vasculaire étant donné qu'une augmentation de l'enzyme est théoriquement associée à une augmentation de la production de monoxyde d'azote. Par contre, dans nos expériences au Bleu d'Evans, nous avons observé une diminution de vasoperméabilité : ceci laisse donc suspecter que des mécanismes additionnels de contrôle doivent entrer en jeu. Il est important de se rappeler que l'enzyme eNOS nécessite plusieurs substrats et cofacteurs pour être active et nous ne connaissons effectivement pas le statut de leurs expressions dans le modèle animal étudié.

Quant au récepteur de l'angiotensine II de type 1, son activation mène à une vasoconstriction qui a pour résultante la diminution de la perméabilité vasculaire. Dans le tissu adipeux sous-cutané, les concentrations en ARNm du récepteur AT<sub>1a</sub> étaient diminuées de près de 40% chez les rats fa/fa comparativement à leurs contrôles maigres (figure 30 et 34). Pour ce qui est de l'expression protéique de ce récepteur, une diminution de 17% a été calculée (figure 31 et 34). Il est important de noter que l'anticorps utilisé dans les immunobuvardages de type Western n'était pas spécifique à AT<sub>1a</sub>, mais bien aux deux isoformes de AT<sub>1</sub> ayant une homologie de séquence de 95%. En somme, une diminution de l'expression de ce récepteur pourrait engendrer une diminution de la vasoconstriction et mener à une augmentation de la perméabilité vasculaire, phénomène n'ayant pas été observé dans nos expériences avec ce sous-type de tissu adipeux. À nouveau, les concentrations du ligand, Ang II, et de ses précurseurs n'ont pas été mesurées dans ces protocoles et il est possible que ces concentrations soient beaucoup plus importantes physiologiquement que l'expression

du récepteur AT<sub>1</sub> lui-même. Également, depuis un certain temps, des études sur des modèles animaux, mais aussi chez l'humain, montrent qu'en situations physiopathologiques (neurologique, cardiologique, néphrologique, etc.), il pourrait y avoir une réexpression du récepteur AT<sub>2</sub> qui pourrait contrebalancer les effets du récepteur AT<sub>1</sub> (CRANDALL, HERZLINGER *et al.*, 1994; THOMAS et MENDELSON, 2003; WOLF, 2002).

Enfin, nous avons également mesuré la concentration en ARNm et en protéine de certaines isoformes du VEGF A qui sont connues pour modifier la perméabilité vasculaire via la liaison au récepteur VEGFR-2 (LAL, VARMA *et al.*, 2001). Du point de vue de l'ARNm, les amorces utilisées étaient spécifiques à l'isoforme majoritaire du VEGF A, l'isoforme 164. Les amorces pour ce gène ont été disposées dans l'exon 4 et la deuxième sur la jonction entre l'exon 5 et 7 (figure 15). Étant donné que la deuxième amorce était sur cette jonction, l'amplification de toutes les isoformes possédant l'exon 6 ou ne possédant pas l'exon 7 ne pouvait pas se produire, d'où la spécificité des amorces pour l'isoforme 164. Elles permettent, par contre, l'amplification du VEGF<sub>164b</sub>, un inhibiteur du VEGFR-2 dont on ne connaît pas encore toute l'importance (WOOLARD, WANG *et al.*, 2004). Cela dit, dans le tissu adipeux sous-cutané, nous avons observé une diminution de plus de 55% de la concentration en ARNm du VEGF<sub>164</sub> chez le rat Zucker obèse (figure 30 et 34). Parallèlement, aux niveaux protéiques, nous avons mesuré la concentration de 4 isoformes. Le premier anticorps utilisé a permis de quantifier les niveaux protéiques des isoformes 188 et du doublet 120 et 164, tandis que le second mesurait la concentration du VEGF<sub>164b</sub>. Les Western ont démontré une diminution des isoformes

120, 164 et 188 du VEGF A ainsi qu'une diminution de l'isoforme inhibitrice 164b (figure 31 et 34). En principe, une diminution de l'expression protéique des isoformes les plus importantes du VEGF A devrait s'accompagner d'une diminution de la perméabilité vasculaire et c'est ce que nous avons observé avec le Bleu d'Evans. Il n'est pas exactement clair quel pourrait être l'impact d'une diminution de 30% de la masse immunoréactive de l'isoforme 164b mais, comme son expression est reconnue comme minoritaire, il est improbable qu'elle joue un rôle dominant dans le tissu adipeux sous-cutané du rat Zucker obèse. Il a été démontré précédemment qu'une augmentation de l'expression de la eNOS pouvait entraîner une augmentation de l'expression du VEGF A (ALDERTON, COOPER *et al.*, 2001). Cependant, dans ce tissu, l'expression protéique de ces deux protéines était modifiée dans des directions opposées, ce qui suggère que ces deux protéines sont probablement régulées par une pléiade d'autres éléments.

En somme, dans le tissu adipeux sous-cutané, nous avons observé une diminution du VEGF A, favorisant ainsi la diminution de la perméabilité vasculaire, telle qu'observée dans ce tissu (figure 35). Toutefois, une augmentation de l'expression de la eNOS et une diminution de l'expression du récepteur AT<sub>1</sub> favoriseraient plutôt une augmentation de celle-ci, à condition bien sûr, que l'enzyme eNOS soit active. Les résultats obtenus suggèrent donc, que la régulation de la perméabilité vasculaire implique un nombre important de facteurs dans le tissu adipeux sous-cutané du rat Zucker obèse.

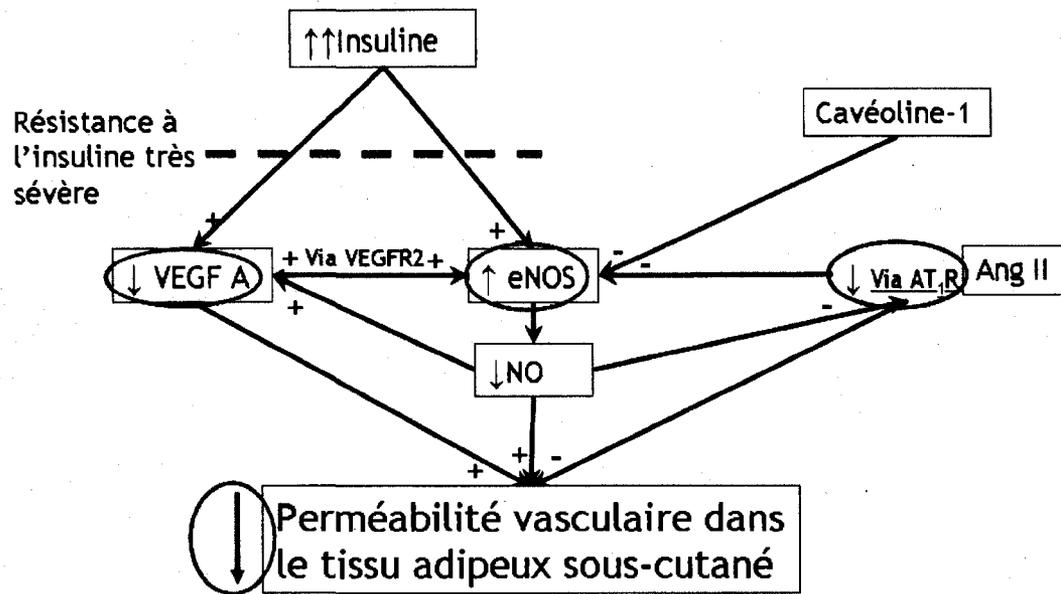


FIGURE 35 : Récapitulation des résultats obtenus au niveau de l'expression protéique des facteurs étudiés et en perméabilité vasculaire dans le tissu adipeux sous-cutané du rat Zucker fa/fa obèse.

#### 4.4 Tissu adipeux rétro-péritonéal

Le tissu adipeux rétro-péritonéal était le second sous-type de dépôt que nous avons étudié et la figure 36 résume toutes les observations faites sur ce tissu adipeux.

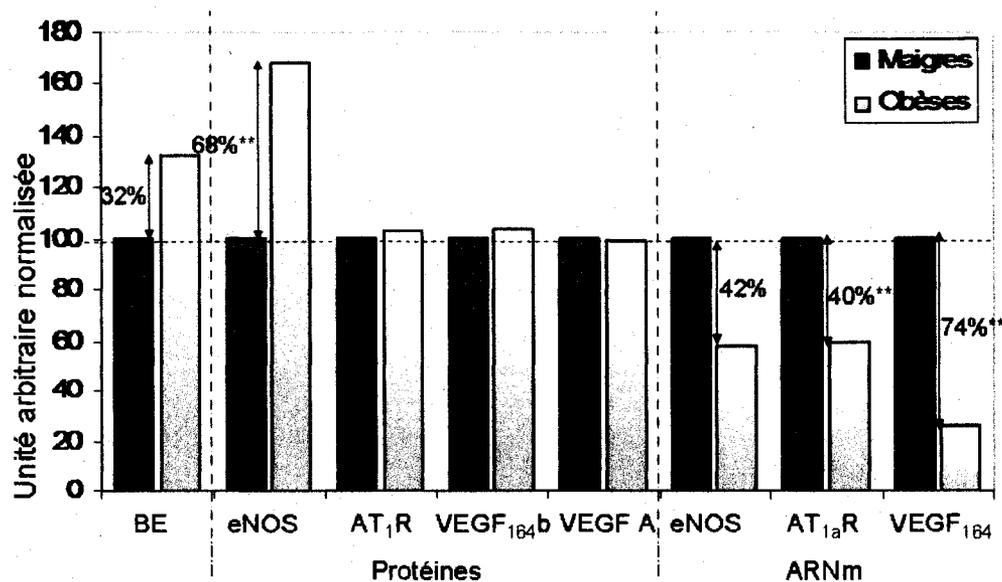


FIGURE 36 : Histogramme démontrant les changements de la perméabilité vasculaire, d'expression d'ARN et protéique en pourcentage dans le tissu adipeux rétro-péritonéal

Compilation de tous les résultats obtenus pour le tissu adipeux rétro-péritonéal exprimés en unités arbitraires normalisées à 100 pour les contrôles. Pour les changements d'expression des niveaux d'ARN et de protéine, le tissu adipeux rétro-péritonéal comprenait aussi le tissu adipeux périrénal. Au niveau protéique, le VEGF A comprend les isoformes 188, 164 et 120. La significativité fut calculée par le test de t-Student non-pairé ; \* $p > 0,05$ , \*\* $p > 0,01$ .

Parmi les protéines analysées, uniquement la eNOS montre un changement significatif de son expression (figures 32 et 37). L'enzyme montre une augmentation de son expression protéique de près de 70%. Une augmentation dans l'expression de la eNOS pourrait s'accompagner d'une augmentation de la production de monoxyde azote, étant un facteur vasoactif très important. Il permet de relaxer les cellules musculaires lisses des sphincters pré-capillaires, en plus de permettre l'ouverture des jonctions intercellulaires des cellules endothéliales (PREDESCU, PREDESCU *et al.*, 2005). Ces deux actions pourraient mener à l'augmentation de la perméabilité vasculaire, ce qui est la tendance observée avec la méthode du Bleu d'Evans dans ce tissu adipeux.

Contrairement au tissu adipeux sous-cutané, le tissu adipeux rétro-péritonéal a une expression de eNOS et des changements de la perméabilité qui vont dans le même sens. Ceci confirme la grande hétérogénéité indiquée précédemment entre les différents tissus adipeux.

Les résultats obtenus sur l'expression en ARNm de l'enzyme eNOS, suite aux PCR quantitatives en temps réel, montrent une diminution mais, la différence entre les deux groupes n'était pas significative. Le récepteur AT<sub>1a</sub> et le VEGF<sub>164</sub> présentent des diminutions d'expression chez les rats Zucker obèses, toujours comparativement aux contrôles maigres (figures 30 et 36). Une diminution de l'expression du récepteur AT<sub>1</sub> pourrait avoir comme résultante une augmentation de la perméabilité vasculaire étant donné la diminution de l'effet vasoconstricteur de l'Ang II. Pour ce qui est du troisième gène étudié, le VEGF<sub>164</sub> présente une diminution de près de 75% de son expression en ARNm dans le tissu adipeux rétro-péritonéal des rats fa/fa par rapport aux rats contrôles. Une diminution de l'isoforme majoritaire du VEGF A pourrait plutôt favoriser une diminution de la perméabilité vasculaire. En somme, seule l'augmentation de la masse immunoréactive de la eNOS et la diminution possible de l'expression du récepteur AT<sub>1R</sub> pourraient soutenir le fait que nous avons observé une augmentation de la vasoperméabilité dans ce sous-type de TA dans le modèle de rat Zucker obèse (figure 37).

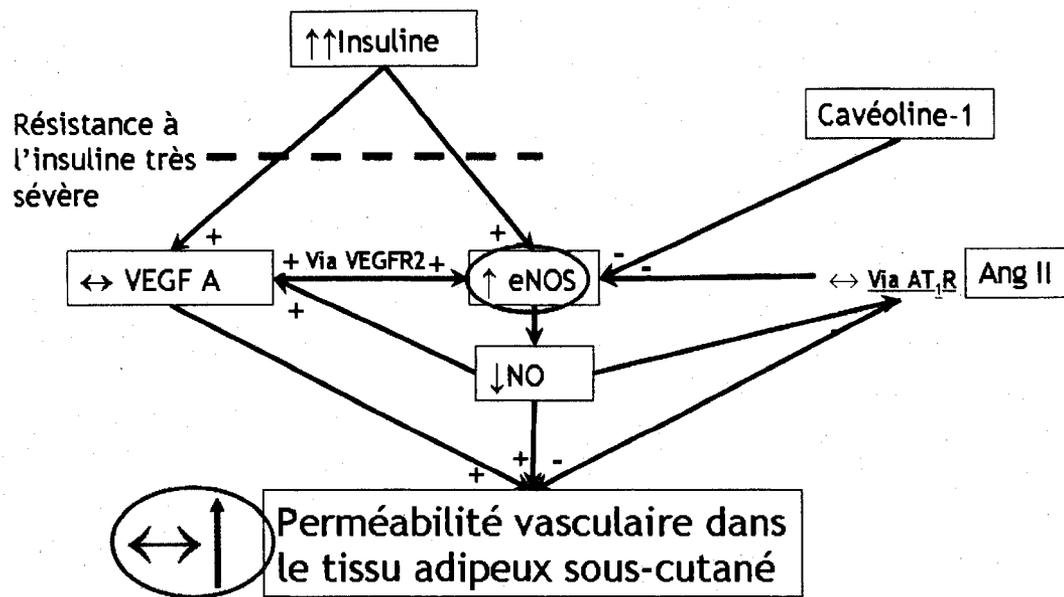


FIGURE 37 : Récapitulation des résultats obtenus au niveau de l'expression protéique des facteurs étudiés et en perméabilité vasculaire dans le tissu adipeux rétro-péritonéal du rat Zucker fa/fa obèse.

#### 4.5 Tissu adipeux épидidymique

Enfin, le dernier sous-type de tissu adipeux étudié était le TA épi et, à nouveau, nous avons résumé les résultats obtenus dans les groupes d'animaux maigres et obèses à la figure 38. Pour le TA épi, nous ne possédons que des données sur la perméabilité au Bleu d'Evans et l'expression protéique des différents facteurs approfondis.

Précédemment, nous avons indiqué que dans le TA épi, il n'y avait aucune variation de la perméabilité vasculaire (figure 26).

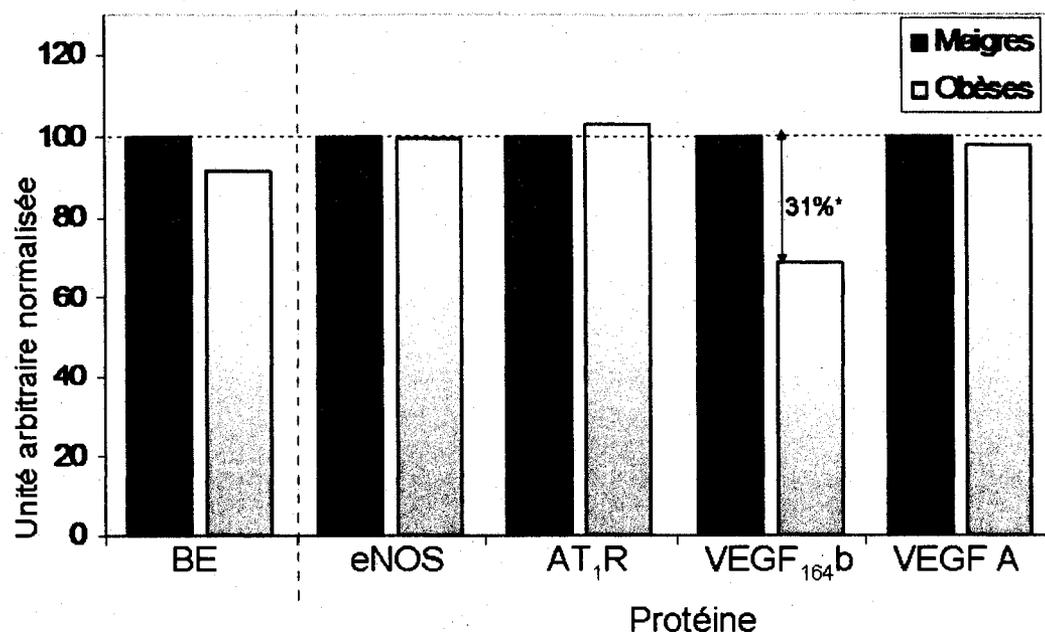


FIGURE 38 : *Histogramme démontrant les changements de la perméabilité vasculaire, d'expression d'ARN et protéique en pourcentage dans le tissu adipeux épидидymique*

Compilation de tous les résultats obtenus pour le tissu adipeux épидидymique exprimés en unités arbitraires normalisées à 100 pour les contrôles. Au niveau protéique, VEGF A comprend les isoformes 188, 164 et 120. La significativité fut calculée par le test de t-Student non-pairé ; \* $p > 0,05$ .

Les résultats obtenus par immunobuvardage montrent aussi très peu de changement pour les protéines tissulaires mesurées, sauf pour le VEGF<sub>164</sub>b qui montrait une diminution de 31% chez les rats obèses comparativement à leurs contrôles maigres (figures 31 et 37). Le VEGF<sub>164</sub>b possède la même affinité que le VEGF<sub>164</sub> pour le récepteur VEGFR-2. Toutefois, il n'a pas la capacité d'activer ni de stimuler en aval la cascade de signalisation (WOOLARD, WANG *et al.*, 2004). De ce fait, si le VEGF<sub>164</sub> augmente la perméabilité endothéliale, une diminution de son inhibiteur pourrait avoir pour effet d'augmenter son action. Cependant, au niveau de la perméabilité au Bleu d'Evans, aucune différence n'a été observée. Il y a donc d'autres facteurs qui

pourraient être impliqués mais il est aussi possible qu'une faible diminution de l'inhibiteur, par rapport à la quantité de VEGF A déjà présente, n'ait qu'un très faible impact physiologique global. Alternativement, il est possible que l'expression du récepteur VEGFR-2 dans le tissu adipeux épидидymique soit diminuée afin de compenser la diminution des concentrations tissulaires de l'isoforme inhibitrice, VEGF<sub>164b</sub> (figure 39).

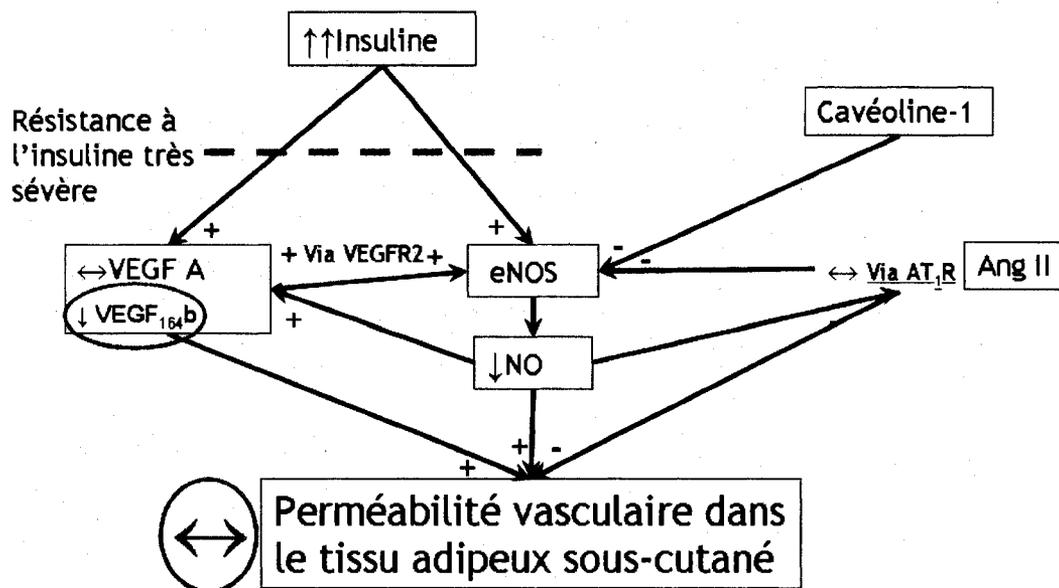


FIGURE 39 : Récapitulation des résultats obtenus au niveau de l'expression protéique des facteurs étudiés et en perméabilité vasculaire dans le tissu adipeux épидидymique du rat Zucker fa/fa obèse.

En résumé, les résultats obtenus pour ce projet ont montré une grande hétérogénéité dans la perméabilité vasculaire et dans l'expression protéique de la eNOS, de l'AT<sub>1</sub>R, du VEGF A et de son inhibiteur, VEGF<sub>164b</sub>, à travers les différents sous-types de TA (figure 40). Le contrôle de la perméabilité vasculaire peut être comparé à une balance. Il doit y avoir un équilibre entre les facteurs favorisant l'augmentation et ceux incitant une diminution de la perméabilité microvasculaire. Les changements d'expression

protéique que nous avons observés, principalement dans le tissu adipeux sous-cutané, ne corrélient pas nécessairement avec les résultats mesurés avec l'extravasation du Bleu d'Evans. Ceci suggère qu'il y a certainement plusieurs autres facteurs impliqués dans le fin contrôle de la microcirculation du tissu adipeux. Parmi ces facteurs, on pourrait retrouver la cavéoline-1, une protéine majeure dans le contrôle de l'activation de la eNOS. La cavéoline-1, se retrouvant à la surface des cavéoles, peut lier l'enzyme eNOS. Lorsque la eNOS est liée à la cavéoline-1, elle est inactive (GOVERS et RABELINK, 2001). Suite à ces résultats, nous avons voulu étudier plus en détails la morphologie des cellules endothéliales dans les différents tissus adipeux.

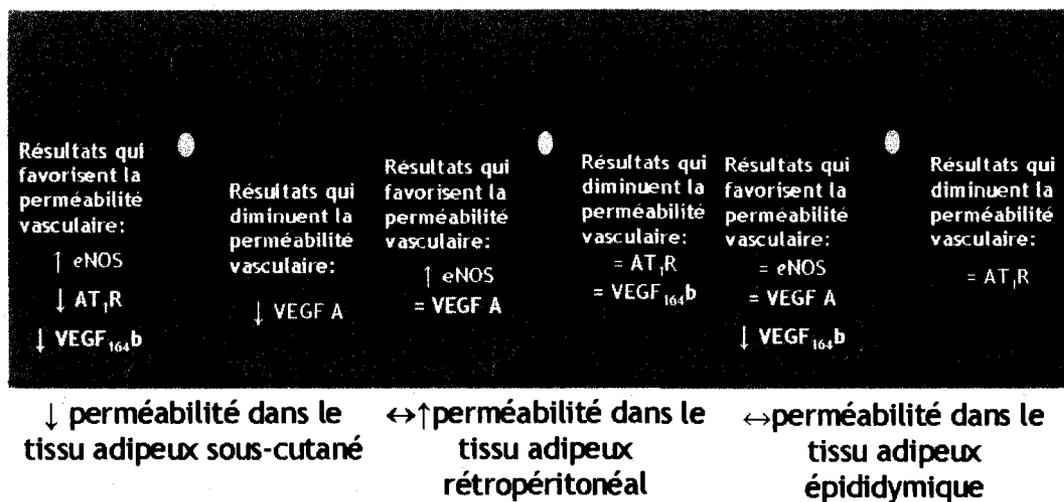


FIGURE 40 : Schématisation des résultats obtenus en perméabilité vasculaire et en expression protéique pour chacun des sous-types de tissu adipeux

#### 4.6 Microscopie électronique à transmission

Les expériences préliminaires de microscopie électronique à transmission nous ont permis d'observer les caractéristiques des cellules endothéliales telles que les

jonctions cellulaires, les vésicules de transcytose (cavéoles) et les lumières dans les tissus adipeux sous-cutané, rétropéritonéal et épидидymique (figures 32 et 33). Nous avons également porté une attention particulière aux espaces interstitiels présents entre les cellules endothéliales et les adipocytes; comme ceux-ci pourraient théoriquement témoigner de certains des changements observés dans la vasoperméabilité du tissu adipeux. L'intérêt d'examiner les jonctions intercellulaires et les cavéoles dans les cellules endothéliales vient du fait qu'elles sont grandement impliquées dans les échanges entre la circulation sanguine et les cellules avoisinantes. Nos observations préliminaires ne nous ont malheureusement pas permis de voir de distinction majeure entre les rats Fa/? et les rats fa/fa en ce qui a trait aux diamètres luminaux, à l'aspect des jonctions intercellulaires ou à l'abondance des vésicules de transcytose. Une étude, parue en 2001, montrait qu'il y avait présence de fenestrations dans les cellules endothéliales du tissu adipeux sous-cutané des souris sauvages, mais pas dans celles des souris ob/ob (CAO, BRAKENHJELM *et al.*, 2001). Par une série d'expériences additionnelles, ces chercheurs ont conclu que la leptine était impliquée dans la formation de ces fenestrations capillaires. Sur tous les capillaires que nous avons observés, nous n'avons pas remarqué de fenestrations et ce, dans les trois sous-types de tissu adipeux étudiés. Nous avons par contre fait des observations intéressantes pour la morphologie des microvaisseaux entre les tissus des rats contrôles. En effet, il semble y avoir une présence plus grande de cavéoles dans les cellules endothéliales du tissu adipeux sous-cutané que dans le tissu adipeux rétropéritonéal ou épидидymique. Cette observation corrèle bien avec la perméabilité endothéliale, qui montrait des valeurs plus élevées pour le tissu adipeux sous-cutané (figure 26). Étant donné que les cavéoles permettent le transport transcellulaire de

l'albumine, une augmentation de leur nombre pourrait avoir comme effet d'augmenter la perméabilité au Bleu d'Evans.

## CONCLUSIONS

Tout bien considérée, la perméabilité microvasculaire dans les tissus adipeux ne suit pas la même tendance que celle décrite précédemment, dans le muscle strié du modèle du rat Zucker obèse. En effet, alors qu'une augmentation dans l'extravasation des macromolécules avait été documentée pour le muscle, nous avons essentiellement observé une diminution dans le tissu adipeux du rat Zucker. Les raisons expliquant ces différences ne sont pas tout à fait claires pour le moment mais pourraient impliquer des phénomènes tels que la diminution de sécrétion par le tissu adipeux de plusieurs facteurs vasodilatateurs, l'augmentation de facteurs vasoconstricteurs ou limitation de la capacité d'angiogénèse du tissu adipeux ou la raréfaction capillaire dû à la constriction des microvaisseaux par l'hypertrophie des adipocytes. Une deuxième grande observation faite par ces travaux démontre qu'il existe une grande hétérogénéité dans la perméabilité des divers tissus adipeux. Les tissus adipeux viscéraux (mésentériques et épiploïques), ainsi que le tissu adipeux sous-cutané voient une diminution de leur perméabilité, tandis que les tissus adipeux rétropéritonéal ont une tendance à la hausse et les tissus adipeux épидидymiques et périrénaux ne montrent aucun changement. Une diminution de la perméabilité vasculaire des tissus adipeux drainant dans des carrefours métaboliquement plus importants (veine porte, foie) pourrait être vue comme un mécanisme de protection contre une accumulation encore plus néfaste de graisses intraviscérales. Une diminution de la perméabilité endothéliale dans les tissus adipeux intra-abdominaux pourrait avoir comme conséquence de limiter les échanges entre la circulation sanguine et les adipocytes et

restreindre leur fonction endocrinienne. De fait, les adipocytes pourraient mettre moins d'adipokines et d'acides gras libres en circulation, et ainsi protéger l'individu obèse des effets métaboliques délétères de ces substances sur les taux sanguins de lipoprotéines et l'insulinorésistance. Nos expériences ont aussi permis d'observer plusieurs changements significatifs dans l'expression protéique de la eNOS, de l'AT<sub>1</sub>R et du VEGF A et ceci, principalement dans le tissu adipeux sous-cutané. Plusieurs des changements observés pour ces importants protagonistes vasculaires ne vont pas toujours dans des directions expliquant ce que nous avons observés *in vivo* dans les expériences au Bleu d'Evans. Par conséquent, il est clair que d'autres facteurs sont impliqués dans le contrôle de la microcirculation du tissu adipeux et que ce contrôle est d'une extrême complexité. Enfin, les résultats préliminaires obtenus en microscopie électronique ne nous ont pas permis de visualiser de changements marquants au niveau de la morphologie des cellules endothéliales, ce qui suggère que les changements de perméabilité sont la conséquence de changements plutôt fonctionnels, probablement en relation avec différents facteurs vasoactifs.

## LIMITES EXPÉRIMENTALES ET PERSPECTIVES

Les expériences que nous avons réalisées possèdent certaines limites expérimentales. Le résultat des expériences avec le Bleu d'Evans sur les tissus adipeux furent exprimées en  $\mu\text{g}$  de BE par gramme de tissu adipeux frais. Cependant, dans un volume égal de tissu adipeux, il y a théoriquement beaucoup plus de cellules endothéliales dans les tissus adipeux des rats maigres que dans ceux des rats obèses. Par conséquent, cette différence potentielle dans la densité capillaire (nombre de capillaires par unité de poids) entre les animaux maigres et les obèses pourrait avoir introduit une variable confondante importante dans nos mesures d'extravasation du Bleu d'Evans. Ceci pourrait aussi expliquer un certain manque de parallèle observé entre les résultats du Bleu d'Evans et l'expression de protéines telles que eNOS, VEGF A et  $\text{AT}_1\text{R}$ . Pour pallier à ce problème, nous travaillerons dans le futur à plutôt exprimer les résultats du BE en  $\mu\text{g}$  de BE par unité arbitraire d'isolectine par exemple, qui est une protéine dont l'expression est stable et qui est exclusive aux cellules endothéliales.

Pour ce qui est des résultats présentés pour la eNOS, nous avons mesuré des changements au niveau de son expression en ARNm qui étaient parfois diamétralement opposés aux changements de son expression protéique. Il serait intéressant de mesurer l'activité NOS tissulaire afin d'élucider jusqu'à quel point des changements post-traductionnels pourraient intervenir.

Enfin, l'obtention de résultats quantitatifs en microscopie optique ou électronique pourrait permettre de mieux évaluer l'anatomie et la fonctionnalité des cellules

endothéliales. Par exemple, des expériences d'immunofluorescence avec des marqueurs spécifiques, tels que l'isolectine (cellules endothéliales), la cavéoline-1 (cavéoles) ou certains facteurs vasoactifs (eNOS, VEGFR-2) pourraient nous permettre de tirer des éclaircissements additionnels.

En somme, nos résultats ont permis d'établir qu'il y avait une grande hétérogénéité entre les différents sous-types de tissus adipeux, au point de vue de leur perméabilité et de l'expression de plusieurs facteurs vasculaires. De plus, nos expériences ont suggéré que le contrôle de la perméabilité vasculaire dans le tissu adipeux était un phénomène très complexe, impliquant d'innombrables mécanismes physiopathologiques. La compréhension de ces phénomènes dans le tissu adipeux pourrait être à la base de traitements permettant de limiter l'expansion de ce tissu et restreindre les effets néfastes de l'obésité à long terme.

## REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je voudrais remercier mes directeurs de recherche, Dr. Pierre Maheux et Dr. Gérard E. Plante, qui m'ont permis de réaliser ma maîtrise sous leur supervision et qui ont partagé avec moi leur savoir scientifique.

De plus, je voudrais remercier les gens qui ont collaboré de près ou de loin à mon projet de maîtrise, Lucie Bouffard (assistante de recherche), Julie Vromandt (stagiaire), Blandine Perrotte (stagiaire) et Alexandre Gagné-Deland (stagiaire). Merci à Dr. Daniel Ménard pour son expertise en microscopie électronique.

Également, j'aimerais remercier tous les étudiants et le personnel du laboratoire du Dre. Nicole Gallo-Payet pour m'avoir accueillie dans leurs réunions de laboratoire. Un merci tout spécial à Claude Roberge qui m'a introduite à la technique du PCR en temps réel en plus de me fournir la séquence des amorces pour AT<sub>1a</sub>R. Aussi, merci à Marie-Odile Guimond qui m'a aidée tout au long de ma maîtrise.

Finalement, un dernier merci à Linda, Richard, Jean-Philippe, Léa, tous les autres membres de ma famille et à mes précieux amis, pour leur support et encouragements durant les vingt derniers mois.

## LISTE DES RÉFÉRENCES

- Ailhaud, G. (2006). «Adipose tissue as a secretory organ: from adipogenesis to the metabolic syndrome.» C R Biol **329**(8): 570-7.
- Ailhaud, G., M. Teboul and F. Massiera (2002). «Angiotensinogen, adipocyte differentiation and fat mass enlargement.» Curr Opin Clin Nutr Metab Care **5**(4): 385-9.
- Alderton, W. K., C. E. Cooper and R. G. Knowles (2001). «Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition.» Biochem J **357**(Pt 3): 593-615.
- Anderson, R. G. (1998). «The caveolae membrane system.» Annu Rev Biochem **67**: 199-225.
- Avram, A. S., M. M. Avram and W. D. James (2005). «Subcutaneous fat in normal and diseased states: 2. Anatomy and physiology of white and brown adipose tissue.» J Am Acad Dermatol **53**(4): 671-83.
- Avram, A. S., M. M. Avram and W. D. James (2005). «Subcutaneous fat in normal and diseased states: 1. Introduction.» J Am Acad Dermatol **53**(4): 663-70.
- Borbiev, T., A. Birukova, F. Liu, S. Nurmukhambetova, W. T. Gerthoffer, J. G. Garcia and A. D. Verin (2004). «p38 MAP kinase-dependent regulation of endothelial cell permeability.» Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **287**(5): L911-8.
- Boron, W. F. and E. L. Boulpaep (2005). Medical Physiology. Philadelphia, Chap.18-19-57.

- Caballero, A. E. (2003). «Endothelial dysfunction in obesity and insulin resistance: a road to diabetes and heart disease.» Obes Res **11**(11): 1278-89.
- Cao, R., E. Brakenhielm, C. Wahlestedt, J. Thyberg and Y. Cao (2001). «Leptin induces vascular permeability and synergistically stimulates angiogenesis with FGF-2 and VEGF.» Proc Natl Acad Sci U S A **98**(11): 6390-5.
- Chen, G., T. G. Gharib, C. C. Huang, J. M. Taylor, D. E. Misek, S. L. Kardia, T. J. Giordano, M. D. Iannettoni, M. B. Orringer, S. M. Hanash and D. G. Beer (2002). «Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas.» Mol Cell Proteomics **1**(4): 304-13.
- Cinti, S. (2005). «The adipose organ.» Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **73**(1): 9-15.
- Collins, V. R., G. K. Dowse, P. M. Toelupe, T. T. Imo, F. L. Aloaina, R. A. Spark and P. Z. Zimmet (1994). «Increasing prevalence of NIDDM in the Pacific island population of Western Samoa over a 13-year period.» Diabetes Care **17**(4): 288-96.
- Crandall, D. L., H. E. Herzlinger, B. D. Saunders, D. C. Armellino and J. G. Kral (1994). «Distribution of angiotensin II receptors in rat and human adipocytes.» J Lipid Res **35**(8): 1378-85.
- de Gasparo, M., K. J. Catt, T. Inagami, J. W. Wright and T. Unger (2000). «International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors.» Pharmacol Rev **52**(3): 415-72.
- Despres, J. P. (2006). «Is visceral obesity the cause of the metabolic syndrome?» Ann Med **38**(1): 52-63.

- Després, J. P., J. Dallongeville, L. Dauchet and P. Amouyel (2007). L'obésité abdominale, une maladie métabolique. France, John Libbey Eurotext, 176 pages.
- Despres, J. P., S. Moorjani, P. J. Lupien, A. Tremblay, A. Nadeau and C. Bouchard (1990). «Regional distribution of body fat, plasma lipoproteins, and cardiovascular disease.» Arteriosclerosis **10**(4): 497-511.
- Elizalde, M., M. Ryden, V. van Harmelen, P. Eneroth, H. Gyllenhammar, C. Holm, S. Ramel, A. Olund, P. Arner and K. Andersson (2000). «Expression of nitric oxide synthases in subcutaneous adipose tissue of nonobese and obese humans.» J Lipid Res **41**(8): 1244-51.
- Enzi, G., M. Gasparo, P. R. Biondetti, D. Fiore, M. Semisa and F. Zurlo (1986). «Subcutaneous and visceral fat distribution according to sex, age, and overweight, evaluated by computed tomography.» Am J Clin Nutr **44**(6): 739-46.
- Eringa, E. C., C. D. Stehouwer, M. H. Roos, N. Westerhof and P. Sipkema (2007). «Selective resistance to vasoactive effects of insulin in muscle resistance arteries of obese Zucker (fa/fa) rats.» Am J Physiol Endocrinol Metab **293**(5): E1134-9.
- Fantuzzi, G. and T. Mazzone (2007). «Adipose tissue and atherosclerosis: exploring the connection.» Arterioscler Thromb Vasc Biol **27**(5): 996-1003.
- Fergelot, P., N. Rioux-Leclercq and J. J. Patard (2005). «Voies moléculaires de l'angiogenèse tumorale et nouvelles approches thérapeutiques ciblées dans le cancer du rein.» Prog Urol **15**(6): 1021-9.

- Ferrara, N. (2004). «Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress.» Endocr Rev **25**(4): 581-611.
- Fukuhara, A., M. Matsuda, M. Nishizawa, K. Segawa, M. Tanaka, K. Kishimoto, Y. Matsuki, M. Murakami, T. Ichisaka, H. Murakami, E. Watanabe, T. Takagi, M. Akiyoshi, T. Ohtsubo, S. Kihara, S. Yamashita, M. Makishima, T. Funahashi, S. Yamanaka, R. Hiramatsu, Y. Matsuzawa and I. Shimomura (2005). «Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin.» Science **307**(5708): 426-30.
- Fulton, D., M. B. Harris, B. E. Kemp, R. C. Venema, M. B. Marrero and D. W. Stepp (2004). «Insulin resistance does not diminish eNOS expression, phosphorylation, or binding to HSP-90.» Am J Physiol Heart Circ Physiol **287**(6): H2384-93.
- Galley, H. F. and N. R. Webster (2004). «Physiology of the endothelium.» Br J Anaesth **93**(1): 105-13.
- Galvin, V. B., H. Barakat, G. Kemeny, K. G. Macdonald, W. J. Pories and R. C. Hickner (2005). «Endothelial nitric oxide synthase content in adipose tissue from obese and lean African American and white American women.» Metabolism **54**(10): 1368-73.
- Gilman, G. A., J. G. Hardman and L. E. Limbird (2001). Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics. USA, Mc Graw-Hill, Chap.31-34.
- Govers, R. and T. J. Rabelink (2001). «Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase.» Am J Physiol Renal Physiol **280**(2): F193-206.

- Greenbaum, D., C. Colangelo, K. Williams and M. Gerstein (2003). «Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale» Genome Biol 4(9): 117.
- Hartz, A. J., D. C. Rupley, Jr., R. D. Kalkhoff and A. A. Rimm (1983). «Relationship of obesity to diabetes: influence of obesity level and body fat distribution.» Prev Med 12(2): 351-7.
- Hausman, D. B., M. DiGirolamo, T. J. Bartness, G. J. Hausman and R. J. Martin (2001). «The biology of white adipocyte proliferation.» Obes Rev 2(4): 239-54.
- Hausman, G. J. and R. L. Richardson (2004). «Adipose tissue angiogenesis.» J Anim Sci 82(3): 925-34.
- Janiak, P., B. Poirier, J. P. Bidouard, C. Cadrouvele, F. Pierre, L. Gouraud, I. Barbosa, J. Dedio, J. P. Maffrand, G. Le Fur, S. O'Connor and J. M. Herbert (2007). «Blockade of cannabinoid CB1 receptors improves renal function, metabolic profile, and increased survival of obese Zucker rats.» Kidney Int 72(11): 1345-57.
- Johnson, L. W. and R. S. Weinstock (2006). «The metabolic syndrome: concepts and controversy.» Mayo Clin Proc 81(12): 1615-20.
- Karlsson, C., K. Lindell, M. Ottosson, L. Sjostrom, B. Carlsson and L. M. Carlsson (1998). «Human adipose tissue expresses angiotensinogen and enzymes required for its conversion to angiotensin II.» J Clin Endocrinol Metab 83(11): 3925-9.
- Katzung, B. G. (2004). Basic & Clinical Pharmacology. USA, The McGraw-Hill Companies, Chap.11-17-19.

- Kurtz, T. W., R. C. Morris and H. A. Pershadsingh (1989). «The Zucker fatty rat as a genetic model of obesity and hypertension.» Hypertension **13**(6 Pt 2): 896-901.
- Ladoux, A. and C. Frelin (1993). «Expression of vascular endothelial growth factor by cultured endothelial cells from brain microvessels.» Biochem Biophys Res Commun **194**(2): 799-803.
- Lal, B. K., S. Varma, P. J. Pappas, R. W. Hobson, 2nd and W. N. Duran (2001). «VEGF increases permeability of the endothelial cell monolayer by activation of PKB/akt, endothelial nitric-oxide synthase, and MAP kinase pathways.» Microvasc Res **62**(3): 252-62.
- Lamarre, N. S., M. R. Ruggieri, Sr., A. S. Braverman, M. I. Gerstein and J. H. Mydlo (2007). «Effect of obese and lean Zucker rat sera on human and rat prostate cancer cells: implications in obesity-related prostate tumor biology.» Urology **69**(1): 191-5.
- Le Petit, C. B., JM (2006). «L'obésité : un enjeu en croissance.» Rapports sur la santé, Statistique Canada **17**(3): 45-53.
- Lean, M. (1989). «Brown adipose tissue in humans.» Proceedings of the Nutrition Society **48**: 243-56.
- Lebranchu, Y. (2000). «Lipides et dysfonctionnement de l'endothélium.» Néphrologie **21**(7): 373-6.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). «Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  Method.» Methods **25**(4): 402-8.

- Maharaj, A. S., M. Saint-Geniez, A. E. Maldonado and P. A. D'Amore (2006).  
«Vascular endothelial growth factor localization in the adult.» Am J Pathol  
**168**(2): 639-48.
- Marieb, E. N. (1999). Anatomie et physiologie humaines. Canada, Chap.19-24.
- McLaren, A. T., P. A. Marsden, C. D. Mazer, A. J. Baker, D. J. Stewart, A. K. Tsui,  
X. Li, Y. Yucel, M. Robb, S. R. Boyd, E. Liu, J. Yu and G. M. Hare (2007).  
«Increased expression of HIF-1 $\alpha$ , nNOS, and VEGF in the cerebral cortex  
of anemic rats.» Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **292**(1): R403-14.
- Miao, H. Q., P. Lee, H. Lin, S. Soker and M. Klagsbrun (2000). «Neuropilin-1  
expression by tumor cells promotes tumor angiogenesis and progression.»  
Faseb J **14**(15): 2532-9.
- Miyazawa-Hoshimoto, S., K. Takahashi, H. Bujo, N. Hashimoto, K. Yagui and Y.  
Saito (2005). «Roles of degree of fat deposition and its localization on VEGF  
expression in adipocytes.» Am J Physiol Endocrinol Metab **288**(6): E1128-36.
- Moraes, R. C., A. Blondet, K. Birkenkamp-Demtroeder, J. Tirard, T. F. Orntoft, A.  
Gertler, P. Durand, D. Naville and M. Begeot (2003). «Study of the alteration  
of gene expression in adipose tissue of diet-induced obese mice by microarray  
and reverse transcription-polymerase chain reaction analyses.» Endocrinology  
**144**(11): 4773-82.
- Mydlo, J. H., M. I. Gerstein, C. F. Harris and A. S. Braverman (2003). «Immune  
function, mitogenicity, and angiogenic growth factor concentrations in lean  
and obese rodent sera: implications in obesity-related prostate tumor biology.»  
Prostate Cancer Prostatic Dis **6**(4): 286-9.

- Namikoshi, T., N. Tomita, M. Satoh, Y. Haruna, S. Kobayashi, N. Komai, T. Sasaki and N. Kashihara (2007). «Olmesartan ameliorates renovascular injury and oxidative stress in Zucker obese rats enhanced by dietary protein.» Am J Hypertens **20**(10): 1085-91.
- Neufeld, G., T. Cohen, S. Gengrinovitch and Z. Poltorak (1999). «Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors.» Faseb J **13**(1): 9-22.
- OMS (1997). Obésité : prévention et prise en charge de l'épidémie mondiale. Consultation OMS sur l'obésité, Genève, Suisse.
- Paul, M., A. Poyan Mehr and R. Kreutz (2006). «Physiology of local renin-angiotensin systems.» Physiol Rev **86**(3): 747-803.
- Poirier, P. and J. P. Despres (2003). «Obésité et maladies cardiovasculaires.» Med Sci (Paris) **19**(10): 943-9.
- Poitras, E. a. H., A. (2002). «La PCR en temps réel: principes et applications.» Reviews in Biology and Biotechnology **2**(2): 2-11.
- Predescu, D., S. Predescu, J. Shimizu, K. Miyawaki-Shimizu and A. B. Malik (2005). «Constitutive eNOS-derived nitric oxide is a determinant of endothelial junctional integrity.» Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **289**(3): L371-81.
- Riazi, S., V. K. Madala-Halagappa, A. P. Dantas, X. Hu and C. A. Ecelbarger (2007). «Sex differences in renal nitric oxide synthase, NAD(P)H oxidase, and blood pressure in obese Zucker rats.» Gend Med **4**(3): 214-29.
- Rogers, D. F., P. Boschetto and P. J. Barnes (1989). «Plasma exudation. Correlation between Evans blue dye and radiolabeled albumin in guinea pig airways in vivo.» J Pharmacol Methods **21**(4): 309-15.

- Ruiz-Ortega, M., V. Esteban, Y. Suzuki, M. Ruperez, S. Mezzano, L. Ardiles, P. Justo, A. Ortiz and J. Egido (2003). «Renal expression of angiotensin type 2 (AT2) receptors during kidney damage.» Kidney Int (86): S21-6.
- Ryden, M., M. Elizalde, V. van Harmelen, A. Ohlund, J. Hoffstedt, S. Bringman and K. Andersson (2001). «Increased expression of eNOS protein in omental versus subcutaneous adipose tissue in obese human subjects.» Int J Obes Relat Metab Disord 25(6): 811-5.
- St-Pierre, P., L. Bouffard, M. E. Papirakis and P. Maheux (2006). «Increased extravasation of macromolecules in skeletal muscles of the Zucker rat model.» Obesity 14(5): 787-93.
- Schulman, I. H., M. S. Zhou and L. Raij (2006). «Interaction between nitric oxide and angiotensin II in the endothelium: role in atherosclerosis and hypertension.» J Hypertens Suppl 24(1): S45-50.
- Serne, E. H., R. T. de Jongh, E. C. Eringa, I. J. RG and C. D. Stehouwer (2007). «Microvascular dysfunction: a potential pathophysiological role in the metabolic syndrome.» Hypertension 50(1): 204-11.
- Shen, W., Z. Wang, M. Punyanita, J. Lei, A. Sinav, J. G. Kral, C. Imielinska, R. Ross and S. B. Heymsfield (2003). «Adipose tissue quantification by imaging methods: a proposed classification.» Obes Res 11(1): 5-16.
- Speakman, J., C. Hambly, S. Mitchell and E. Krol (2007). «Animal models of obesity.» Obes Rev 8 Suppl 1: 55-61.
- Steinberg, H. O., H. Chaker, R. Leaming, A. Johnson, G. Brechtel and A. D. Baron (1996). «Obesity/insulin resistance is associated with endothelial dysfunction.

- Implications for the syndrome of insulin resistance.» J Clin Invest **97**(11): 2601-10.
- Takahashi, H. and M. Shibuya (2005). «The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions.» Clin Sci **109**(3): 227-41.
- Thomas, W. G. and F. A. Mendelsohn (2003). «Angiotensin receptors: form and function and distribution.» Int J Biochem Cell Biol **35**(6): 774-9.
- Tjepkema, M. (2006). «Obésité chez les adultes.» Rapports sur la santé, Statistique Canada **17**(3): 9-25.
- Touyz, R. M. (2005). «Intracellular mechanisms involved in vascular remodelling of resistance arteries in hypertension: role of angiotensin II.» Exp Physiol **90**(4): 449-55.
- Trayhurn, P. (2005). «Endocrine and signalling role of adipose tissue: new perspectives on fat.» Acta Physiol Scand **184**(4): 285-93.
- Trayhurn, P. and I. S. Wood (2004). «Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue.» Br J Nutr **92**(3): 347-55.
- Valerio, A., A. Cardile, V. Cozzi, R. Bracale, L. Tedesco, A. Pisconti, L. Palomba, O. Cantoni, E. Clementi, S. Moncada, M. O. Carruba and E. Nisoli (2006). «TNF-alpha downregulates eNOS expression and mitochondrial biogenesis in fat and muscle of obese rodents.» J Clin Invest **116**(10): 2791-8.
- Vincent, M. A., M. Montagnani and M. J. Quon (2003). «Molecular and physiologic actions of insulin related to production of nitric oxide in vascular endothelium.» Curr Diab Rep **3**(4): 279-88.

- Wajchenberg, B. L. (2000). «Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome.» Endocr Rev **21**(6): 697-738.
- West, D. B. and B. York (1998). «Dietary fat, genetic predisposition, and obesity: lessons from animal models.» Am J Clin Nutr **67**(3 Suppl): 505S-512S.
- Wheatcroft, S. B., I. L. Williams, A. M. Shah and M. T. Kearney (2003). «Pathophysiological implications of insulin resistance on vascular endothelial function.» Diabet Med **20**(4): 255-68.
- Whitaker, R. C., J. A. Wright, M. S. Pepe, K. D. Seidel and W. H. Dietz (1997). «Predicting obesity in young adulthood from childhood and parental obesity.» N Engl J Med **337**(13): 869-73.
- Wolf, G. (2002). «"The road not taken": role of angiotensin II type 2 receptor in pathophysiology.» Nephrol Dial Transplant **17**(2): 195-8.
- Woolard, J., W. Y. Wang, H. S. Bevan, Y. Qiu, L. Morbidelli, R. O. Pritchard-Jones, T. G. Cui, M. Sugiono, E. Waive, R. Perrin, R. Foster, J. Digby-Bell, J. D. Shields, C. E. Whittles, R. E. Mushens, D. A. Gillatt, M. Ziche, S. J. Harper and D. O. Bates (2004). «VEGF165b, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant: mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression.» Cancer Res **64**(21): 7822-35.
- Yang, R. Z., M. J. Lee, H. Hu, J. Pray, H. B. Wu, B. C. Hansen, A. R. Shuldiner, S. K. Fried, J. C. McLenithan and D. W. Gong (2006). «Identification of omentin as a novel depot-specific adipokine in human adipose tissue: possible role in modulating insulin action.» Am J Physiol Endocrinol Metab **290**(6): E1253-61.

Yang, X. and U. Smith (2007). «Adipose tissue distribution and risk of metabolic disease: does thiazolidinedione-induced adipose tissue redistribution provide a clue to the answer?» Diabetologia **50**(6): 1127-39.

Zucker, L. M. and T. F. Zucker (1961). «Fatty, a new mutation in the rat » J. Hered. **52**: 275-278.