



HAL
open science

Cardiopathie métabolique : un modèle de sénescence prématurée ?

Julien Ternacle

► **To cite this version:**

Julien Ternacle. Cardiopathie métabolique : un modèle de sénescence prématurée ?. Médecine humaine et pathologie. Université Paris-Est, 2017. Français. NNT : 2017PESC0064 . tel-01763137

HAL Id: tel-01763137

<https://theses.hal.science/tel-01763137>

Submitted on 10 Apr 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ PARIS-EST Créteil Val de Marne, UPEC

Ecole Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé

Année 2017

n° _____

LE DIPLÔME DE DOCTORAT

PAR

NOM : TERNACLE Prénoms : Julien
Date et Lieu de naissance : 2 mai 1984, Paris 14^{ème}

Présentée et soutenue publiquement le 14 décembre 2017

**Cardiopathie métabolique : un modèle de sénescence
prématurée ?**

Directeur de thèse : **Pr Geneviève DERUMEAUX**

JURY :

Pr Geneviève DERUMEAUX

Pr Ariel COHEN, Rapporteur

Pr Anne BERNARD, Rapporteur

Pr Jorge BOCZKOWSKI

Pr Jean-Luc DUBOIS-RANDE

Pr Stéphane HATEM

Pr Hélène THIBAUT

UNIVERSITÉ PARIS-EST Créteil Val de Marne, UPEC

Ecole Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé

Année 2017

n° _____

LE DIPLÔME DE DOCTORAT

PAR

NOM : TERNACLE Prénoms : Julien
Date et Lieu de naissance : 2 mai 1984, Paris 14^{ème}

Présentée et soutenue publiquement le 14 décembre 2017

**Cardiopathie métabolique : un modèle de sénescence
prématurée ?**

Directeur de thèse : **Pr Geneviève DERUMEAUX**

JURY :

Pr Geneviève DERUMEAUX

Pr Ariel COHEN, Rapporteur

Pr Anne BERNARD, Rapporteur

Pr Jorge BOCZKOWSKI

Pr Jean-Luc DUBOIS-RANDE

Pr Stéphane HATEM

Pr Hélène THIBAUT

REMERCIEMENTS

A Madame le **Professeur DERUMEAUX** pour avoir dirigé ce travail, mais surtout pour m'avoir guidé et accompagné durant ces 3 années de thèse. Grâce à vous j'ai découvert ce qu'est la recherche fondamentale au sein d'une équipe soudée. Je n'irai pas jusqu'à dire que j'aime les souris mais j'ai vraiment apprécié travailler dans cette équipe. Je vous prie de croire en l'expression de mon profond respect.

A Monsieur le **Professeur COHEN**, qui me fait l'honneur de juger ce travail et d'en être le rapporteur. Merci pour votre enseignement rigoureux sur l'échocardiographie et surtout pour votre confiance et soutien depuis que je suis passé comme jeune interne dans votre service. Je vous prie de croire en l'expression de mon profond respect.

A Madame le **Professeur BERNARD**, qui me fait l'honneur de juger ce travail et d'en être le rapporteur. Merci pour ton amitié, ton aide et ta disponibilité. Tu peux compter sur mon amitié et mon soutien dans le futur. Je te prie de croire en l'expression de mon profond respect.

A Monsieur le **Professeur BOCZKOWSKI**, qui me fait l'honneur de juger ce travail. Merci pour la confiance que vous m'avez accordé au sein de l'IMRB.

A Monsieur le **Professeur DUBOIS-RANDE**, qui me fait l'honneur de juger ce travail. Merci de m'avoir accueilli dans votre service, de m'avoir offert l'opportunité de m'y exprimer et de me faire confiance. Je vous prie de croire en l'expression de mon profond respect.

A Madame le **Professeur THIBAUT** et Monsieur le **Professeur HATEM**, qui me font l'honneur de juger ce travail dans lequel vous êtes des spécialistes reconnus. Je vous prie de croire en l'expression de mon profond respect.

A tous mes collègues du service de cardiologie d'Henri Mondor, des internes aux plus anciens, pour votre confiance quotidienne, vos conseils et votre motivation. Grâce à vous j'ai pu faire cette thèse de 3 ans tout en étant CCA puis PH. Merci.

A Pascal. Tu es plus qu'un chef ou un mentor, tu es un ami. Tu as donc une ligne dans mes remerciements. Merci à toi.

Aux Jackson Five. Même si on se voit moins, vous êtes dans mon cœur.

A Laura. Merci de me permettre d'être qui je suis même si c'est épuisant au quotidien. Merci de m'avoir fait évoluer. Merci pour ton amour.

A Mia, notre petite fille de 18 mois hyperactive. Quel bonheur de te voir évoluer au quotidien.

A ma mère. Merci pour tout en fait. Papa, j'espère que tu es fier.

ABREVIATIONS

AA : Agelastatine A

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

CD : chow diet, régime alimentaire équilibré

CRP : C-réactive protéine

eWAT : epididymal white adipose tissue, tissu adipeux épидидymal

EWATectomy : ablation du tissu adipeux épидидymal

FEVG : fraction d'éjection ventriculaire gauche

GTT : glucose tolerance test, test de tolérance au glucose

HFD : high fat diet, régime alimentaire riche en graisse

HTA : hypertension artérielle

IC : insuffisance cardiaque

IL : interleukine

IMC : indice de masse corporel

ITT : insulin tolerance test, test de tolérance à l'insuline

OMS : organisation mondiale de la santé

OPN : ostéopontine

PCR : polymérase chain reaction, amplification en chaîne par polymérase

prWAT : peri-rénalwhite adipose tissue, tissu adipeux péri-rénal

SAS : syndrome d'apnées du sommeil

sWAT : sub-cutaneouswhite adipose tissue, tissu adipeux sous-cutané

TGF : transforming growth factor, facteur de croissance transformant

TNF : tumor necrosis factor, facteur de nécrose tumorale

VG : ventricule gauche

Table des matières

REMERCIEMENTS	3
ABREVIATIONS	4
I. Introduction	7
II. Troubles métaboliques et pathologies cardiovasculaires	9
1) Epidémiologie de l'obésité	9
2) Epidémiologie du diabète de type 2 (selon l'OMS)	11
3) Relations entre obésité et diabète de type 2	12
4) Relation entre obésité, diabète de type 2 et pathologie cardiovasculaire	14
a) Obésité et pathologie cardiovasculaire	14
b) Diabète de type 2 et pathologie cardiovasculaire	18
c) Obésité et diabète de type 2 : action synergique ou facteurs confondants ?	21
5) Phénotypes cardiaques chez le diabétique de type 2 : une nouvelle approche du risque cardiovasculaire intégrant les facteurs d'obésité et d'hypertension artérielle	23
III. De l'obésité à l'adiposité : rôle du tissu adipeux ectopique	28
1) Rôle du tissu adipeux et conséquences de l'obésité	28
a) Altérations hémodynamiques liées à l'excès de tissu adipeux	28
b) Le tissu adipeux : un organe endocrine actif	29
c) Remodelage et dysfonction du tissu adipeux	32
2) Graisse viscérale ectopique : implication dans les troubles cardiométaboliques	36
a) Graisse viscérale ectopique épicardique	36
b) Graisse viscérale ectopique intra-abdominale : l'omentum	41
IV. Etudes précliniques sur le lien entre obésité et dysfonction cardiaque : nécessité d'un modèle animal	42
V. Problématique et Objectif du travail de cette thèse	47
VI. Etablir un modèle murin de cardiopathie métabolique	49
1) Problématique	49
2) Matériel et méthode	49
a) Le modèle animal	49
b) Echocardiographie	50
c) Evaluation hémodynamique	51
d) Les tests métaboliques	52
e) Analyse histologique	52
f) Evaluation de l'apoptose	53
g) Analyse du stress oxydatif	53
h) Analyse Luminex	54
3) Résultats	55
4) Discussion	60
VII. Rôle protecteur de l'exercice physique dans l'obésité induite par un régime riche en graisse : Impact sur la sénescence du tissu adipeux et de son sécrétome	62
1) Problématique	62
2) Matériel et méthode	62
a) Le modèle animal	62
b) Le protocole d'activité physique forcée	62
c) Les tests métaboliques et échocardiographies	63
d) Prélèvements et analyses du tissu adipeux et des biomarqueurs plasmatiques	64

e)	<i>Immunohistochimie</i>	64
f)	<i>Evaluation de la fibrose</i>	65
g)	<i>Quantification par PCR</i>	65
3)	Résultats	67
a)	<i>Modifications morphologiques et métaboliques dans le groupe HFD, et évolution selon la pratique d'une activité physique ou non</i>	67
b)	<i>Remodelage et dysfonction du tissu adipeux soumis à un régime HFD et influence de l'exercice physique</i>	69
c)	<i>Le régime HFD, un modèle de sénescence précoce du tissu adipeux ?</i>	73
d)	<i>Impact cardiovasculaire de l'exercice chez les souris soumises à un régime HFD</i>	76
4)	Discussion	81
5)	Conclusion	84

VIII. Cardiopathie métabolique : un modèle de sénescence cardiaque prématurée ?

1)	Problématique	85
2)	Matériel et méthodes	85
3)	Résultats	87

IX. L'ostéopontine : un acteur clé du dialogue entre tissu adipeux et cœur dans le contexte du vieillissement

1)	Problématique	90
2)	Matériel et méthodes	97
a)	<i>Le modèle animal</i>	97
b)	<i>Protocole d'ablation du tissu adipeux viscéral</i>	97
c)	<i>Inhibition pharmacologique de l'ostéopontine</i>	98
d)	<i>Tissus humains d'oreillette cardiaque</i>	98
e)	<i>Cultures cellulaires et traitements</i>	99
f)	<i>Tests métaboliques, échocardiographie et mesures hémodynamiques</i>	99
g)	<i>Analyse histologique et activité de la SA-β-galactosidase</i>	99
h)	<i>PCR quantitative</i>	100
i)	<i>Western Blot</i>	100
j)	<i>Dosage des cytokines et adipokines</i>	101
3)	Résultats	102
a)	<i>Le tissu adipeux viscéral est une source importante d'OPN</i>	102
b)	<i>Le tissu adipeux viscéral joue un rôle clé dans l'induction de la fibrose et la dysfonction myocardique au cours du vieillissement</i>	103
c)	<i>Les souris déficientes pour l'OPN sont protégées du vieillissement cardiaque</i>	105
d)	<i>L'OPN favorise la fibrose myocardique par modulation de la sénescence des fibroblastes</i>	107
e)	<i>L'Agelastatine A (AA), inhibiteur de l'ostéopontine, prévient la sénescence cardiaque</i>	109
4)	Discussion	111
a)	<i>Rôle de l'ostéopontine dans les pathologies cardiovasculaires</i>	112
b)	<i>Le tissu adipeux viscéral est une source importante d'OPN au cours du vieillissement</i>	114
c)	<i>Au cours du vieillissement, le tissu adipeux viscéral induit une fibrose myocardique à distance.</i>	115
d)	<i>Ostéopontine et vieillissement cardiaque</i>	115
e)	<i>Implications cliniques</i>	116
5)	Conclusion	117

X. Conclusion

XI. Bibliographie

I. Introduction

L'obésité est un problème majeur de santé publique en raison d'une part des pathologies qui y sont associées et qui sont responsables d'une lourde morbi-mortalité et d'autre part de sa prévalence qui ne fait que croître depuis 20 ans dans les pays développés, et plus récemment dans les pays en voie de développement, prévalence augmentant particulièrement chez les enfants et les femmes.

L'obésité est définie par un indice de masse corporelle (IMC) $\geq 30 \text{ kg/m}^2$ et correspond à une accumulation de graisse à différents endroits de l'organisme. Cette définition est probablement imparfaite pour définir les caractères anthropomorphiques des sujets obèses et ne permet pas de définir la composition corporelle identifiant ainsi masse musculaire et masse grasseuse mais surtout ne permet pas de quantifier spécifiquement la masse grasseuse viscérale. En effet les conséquences cardio-métaboliques de l'adiposité diffèrent en fonction de la répartition de la masse grasseuse dans les différents compartiments corporels. Les complications cardio-métaboliques sont principalement imputées à la masse grasseuse viscérale dont l'importance est associée à différents biomarqueurs d'insulino-résistance, au développement de dyslipidémie et d'athérosclérose alors que la graisse sous-cutanée n'est pas associée aux différents phénotypes dysmétaboliques (1, 2).

L'obésité liée à l'augmentation de l'adiposité viscérale favorise l'apparition de troubles métaboliques comme le diabète de type 2, mais les modifications systémiques qu'elle induit sont également pourvoyeuses de nombreuses pathologies comme les néoplasies, la cirrhose hépatique, les troubles androgéniques et les pathologies cardiovasculaires. Parmi ces dernières, l'athérosclérose avec ses différentes atteintes (notamment coronaire et carotidienne) est la plus détaillée dans la littérature en raison de l'association évidente entre obésité et facteurs de risque cardiovasculaire. Des études récentes font également le lien entre obésité, troubles

métaboliques (diabète de type 2) et altération myocardique allant du remodelage avec fibrose à l'insuffisance cardiaque, regroupées sous le nom de cardiopathie métabolique.

Les études cliniques et précliniques sur le lien entre obésité et insuffisance cardiaque sont parfois contradictoires et limitées en termes d'explications physiopathologiques. Plusieurs hypothèses sont avancées mais le rôle central du tissu adipeux, notamment viscéral, semble être prépondérant sans que les mécanismes exacts en soient totalement connus. En effet, l'accumulation de graisse viscérale au cours de l'obésité entraîne une dysfonction adipocytaire favorisant la libération de médiateurs pro-inflammatoires et pro-fibrotiques. De plus, la présence de graisse ectopique épicardique favorise le développement de fibrose myocardique, mécanisme également retrouvé dans le processus de sénescence cardiaque.

L'objet de cette thèse est donc d'étudier les caractéristiques du développement de la cardiopathie métabolique dans le contexte de l'obésité 1) en confirmant son existence sur un modèle de souris obèses permettant de décrire son délai d'apparition et les mécanismes impliqués, et 2) en évaluant le rôle physiopathologique du tissu adipeux viscéral, en faisant l'hypothèse que ce tissu développe un phénotype sécrétoire de type sénescence dans le cadre de l'obésité.

II. Troubles métaboliques et pathologies cardiovasculaires

1) Epidémiologie de l'obésité

L'obésité est le résultat d'un déséquilibre entre apports et consommation énergétiques(3) qui entraîne divers problèmes de santé dont certains potentiellement graves. Parmi ces complications nous pouvons citer, de façon non exhaustive, l'intolérance au glucose puis le diabète de type 2, les pathologies cardiovasculaires, les cancers, les pathologies ostéo-articulaires, pathologies qui sont elles-mêmes responsables d'une morbi-mortalité et d'une altération de la qualité de vie importantes.

Ces 20 dernières années ont vu augmenter de façon dramatique la prévalence de l'obésité (définie par un IMC $>30\text{kg/m}^2$) à travers le monde(4) avec une probable sous-estimation par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) qui évaluait en Europe en 2014 à 50% le taux de personnes en surcharge pondérale (IMC $>25\text{kg/m}^2$) et à 23% le taux de personnes obèses (Figure 1).

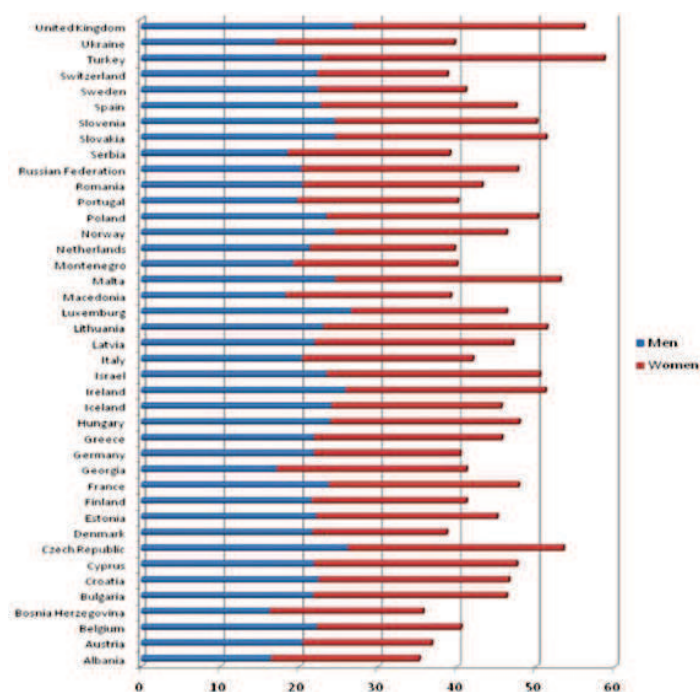


Figure 1. Prévalence de l'obésité chez les adultes en Europe (OMS 2014).

Cette augmentation de l'obésité touche tous les pays du monde, notamment les pays en voie de développement où les femmes sont particulièrement affectées (Figure 2)(4).

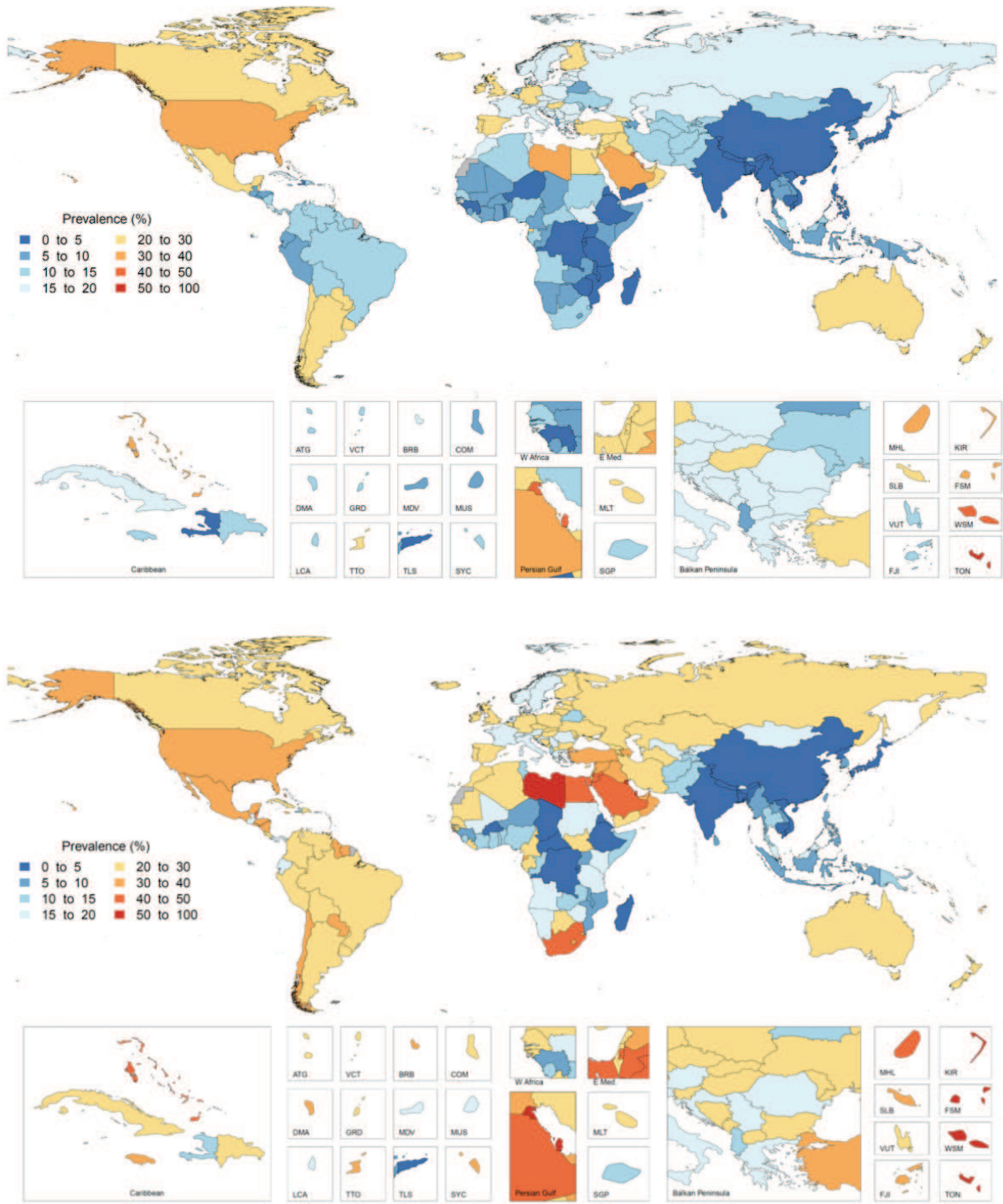


Figure 2. Prévalence de l'obésité chez les adultes dans le monde selon le sexe masculin (partie haute) et féminin (partie basse), selon Marie Ng et al. Lancet 2014.

Enfin, la prévalence de l'obésité varie selon l'âge, le sexe et l'origine ethnique. Dans deux publications récentes, l'obésité aux USA touchait 9% des enfants de 2 à 5 ans, 17% des 6 à 11 ans, 20% des 12 à 19 ans et 34% des 20 à 39 ans(5). De même, chez les hommes de 20 à 39 ans, la prévalence de l'obésité était de 29% chez les non hispaniques blancs, 33% chez les non hispaniques noirs et 39% chez les sujets hispaniques. En comparaison, l'obésité chez les femmes de 20 à 39 ans représentait 33% des non hispaniques blanches, 43% des hispaniques et 57% des non hispaniques noires.

En France, le taux d'obésité concerne approximativement 14% de la population(6). Dans le monde en 2014, plus de 1.9 milliards d'adultes étaient en surpoids et 600 millions étaient obèses, soit 11% des hommes et 15% des femmes, avec des prévisions en 2030 qui porteraient à 2,2 milliards le nombre d'adultes en surcharge et à 1,1 milliards le nombre d'obèses. A la vue de cette expansion pandémique, l'OMS a déclaré l'obésité comme l'un des principaux problèmes de santé du 21^{ème} siècle, dépassant les problèmes de malnutrition(6). Actuellement, au moins 2,8 millions de personnes décèdent chaque année des complications du surpoids et de l'obésité. L'obésité peut donc être comparée à une véritable pandémie à forte morbi-mortalité touchant l'ensemble des pays du globe et intéressant les adultes jeunes comme les enfants, mais surtout les femmes.

2) Epidémiologie du diabète de type 2 (selon l'OMS)

Le diabète de type 2 est une pathologie chronique qui correspond à une hyperglycémie chronique secondaire à une insulino-résistance non compensée par l'hypersécrétion d'insuline. Cette insulino-résistance est la résultante de l'action d'un mélange variable de facteurs environnementaux dont les infections, la sédentarité et les troubles métaboliques secondaires à un excès de graisse viscérale, et de facteurs génétiques. En 2014, l'OMS estimait que 422 millions de personnes étaient atteintes de diabète de type 2 (soit 8,5% des adultes > 18 ans) contre 108 millions de personnes en 1980 (soit 4,7% des adultes). La prévalence du diabète de

type 2 a augmenté plus rapidement dans les pays à revenu faible ou intermédiaire. En France en 2016, le diabète touchait 9,5% des hommes et 6,6% des femmes, soit 8% de la population globale. En 2015, on estimait que 1,6 millions de décès étaient directement imputables au diabète et près de la moitié de ces décès survenaient avant l'âge de 70 ans. Le diabète est une cause majeure de cécité, d'insuffisance rénale, de pathologies cardiovasculaires et d'artériopathie des membres inférieurs pouvant conduire à l'amputation. L'OMS prévoit qu'en 2030, le diabète sera la 7^{ème} cause de décès dans le monde.

3) Relations entre obésité et diabète de type 2

Les principaux troubles métaboliques associés aux pathologies cardiovasculaires incluent l'obésité et le diabète de type 2, deux pathologies très souvent associées mais pas toujours. Les patients obèses sont plus à risque de développer un diabète de type 2 que les sujets non obèses. Les mécanismes responsables du développement du diabète de type 2 sont l'insulino-résistance (essentiellement hépatique et musculaire) et la détérioration des cellules β des îlots de Langerhans du pancréas, toutes deux secondaires à un dysfonctionnement du tissu adipeux via une augmentation des taux d'acides gras libres circulants et de cytokines. Même si les adipocytes ont une importante capacité de stockage de la graisse, une accumulation chronique entraîne une dysrégulation du tissu adipeux, notamment viscéral. Cette dysrégulation est responsable d'une augmentation de la sécrétion de substances impliquées dans l'insulino-résistance comme les cytokines pro-inflammatoires (TNF) et les adipokines comme la leptine. Deux autres molécules sont également impliquées dans ce processus, à savoir la résistine qui augmente au cours de l'obésité et favorise donc l'insulino-résistance, et l'adiponectine qui diminue au cours de l'obésité alors qu'elle possède des propriétés protectrices pour le système cardiovasculaire(7).

Obésité et diabète de type 2 étant donc deux conditions pathologiques très intriquées (Figure 3), il est important d'évaluer leur rôle respectif dans la survenue d'anomalies cardiovasculaires.

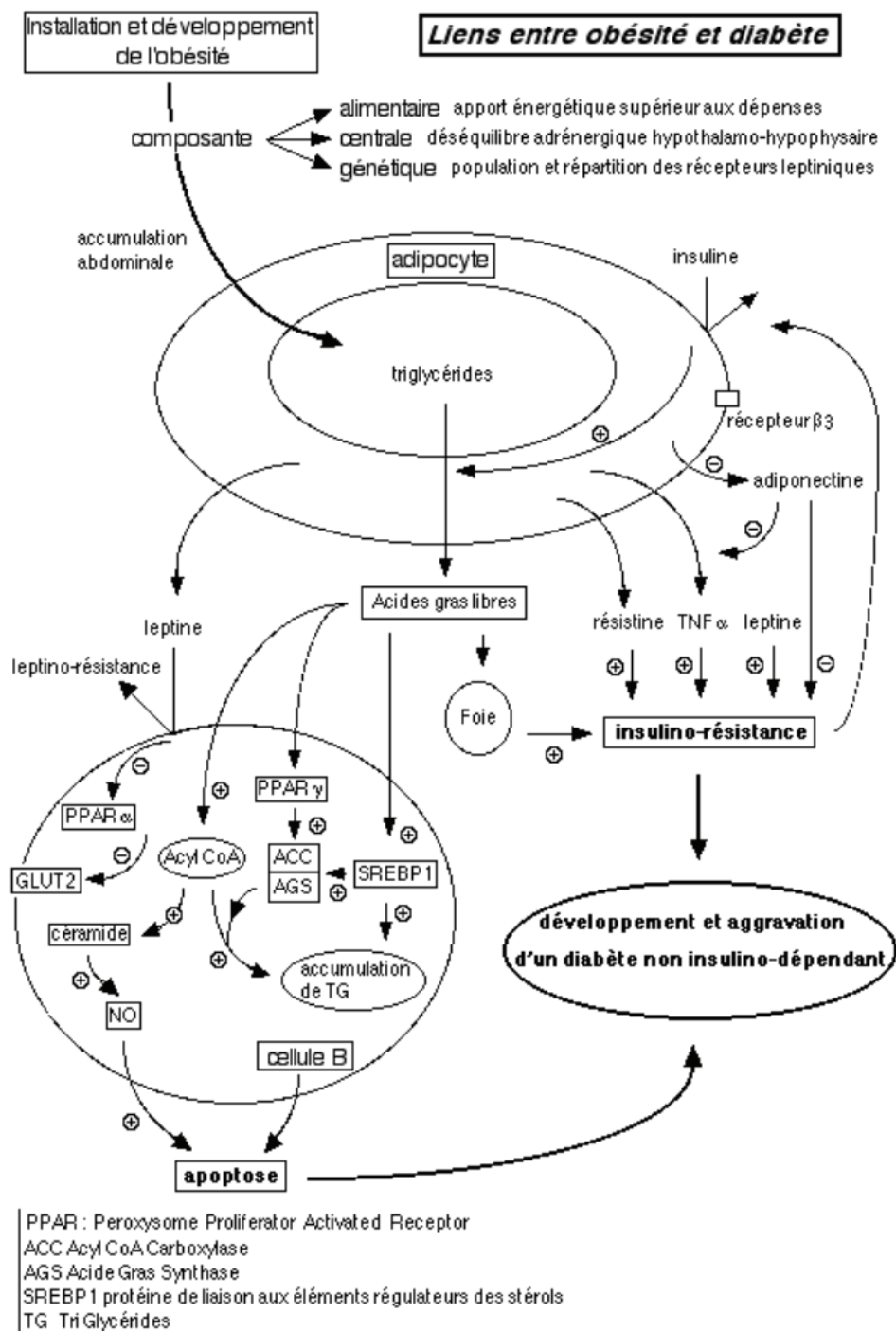


Figure 3. Mécanismes impliqués dans le développement du diabète de type 2 chez les patients obèses avec le rôle central de l'adipocyte dans l'insulino-résistance et la dégradation des cellules β du pancréas.

4) Relation entre obésité, diabète de type 2 et pathologie cardiovasculaire

L'obésité, indépendamment du diabète, a largement été décrite dans la littérature comme étant un facteur de risque indépendant de pathologies cardiovasculaires. Par ailleurs, elle est également fréquemment associée et intriquée à d'autres facteurs de risque cardiovasculaire comme l'hypertension artérielle (HTA), le diabète de type 2, les dyslipidémies et le syndrome d'apnée du sommeil (SAS). D'autre part, le diabète de type 2 est également pourvoyeur de pathologies cardiovasculaires comme la coronaropathie ou l'insuffisance cardiaque. Cependant, le lien entre obésité et insuffisance cardiaque (IC), la place du diabète dans ce contexte, ainsi que le délai de survenue et les mécanismes impliqués dans ces atteintes cardiovasculaires ne sont pas encore totalement élucidés.

a) Obésité et pathologie cardiovasculaire

Sur le plan clinique, des résultats discordants ont été publiés. En 2001, Kenchaiah(8) décrit une relation entre l'IMC et le risque d'IC mais ne donne aucun seuil d'IMC critique, plutôt une relation continue entre la majoration de l'IMC et le risque d'IC (Figure 4). Ce risque d'IC augmente de 5% chez l'homme et de 7% chez la femme par point d'IMC. En cas d'obésité, le risque d'IC augmente de 100% chez la femme et de 90% chez l'homme. Les auteurs concluent que 11% des cas d'IC chez l'homme et 14% des cas d'IC chez la femme sont attribuables à l'obésité.

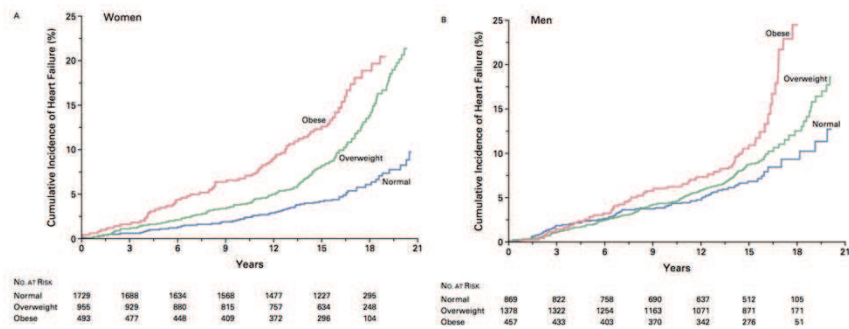


Figure 4. Incidence cumulée d'insuffisance cardiaque selon les catégories d'IMC, d'après Kenchaiah et al, NEJM 2001.

Très récemment en 2017 une étude portant sur une large cohorte d'environ 100 000 personnes, démontre qu'une prise de poids de plus de 2,5kg (surtout > 5 kg) durant la vie adulte (18 – 55 ans) est un facteur de risque majeur d'évènements cliniques (Figure 5 et 6) incluant la survenue d'un diabète de type 2, d'une HTA, d'une cardiopathie, d'un cancer lié à l'obésité (œsophage, colo-rectal, sein, endomètre et prostate), d'un décès non traumatique et enfin d'un vieillissement pathologique en termes d'autonomie, cognition et qualité de vie(9).

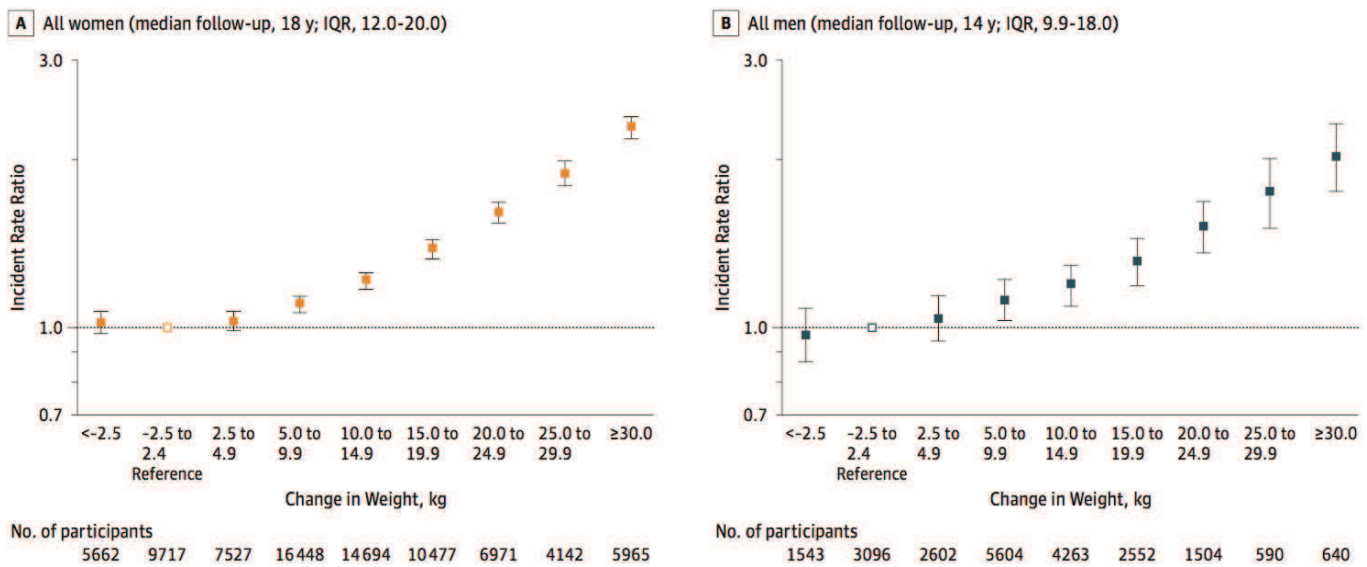


Figure 5. Incidence cumulée de pathologies chroniques majeures selon la prise de poids durant l'âge adulte chez les femmes (à gauche) et les hommes (à droite), selon Zheng et al, JAMA 2017.

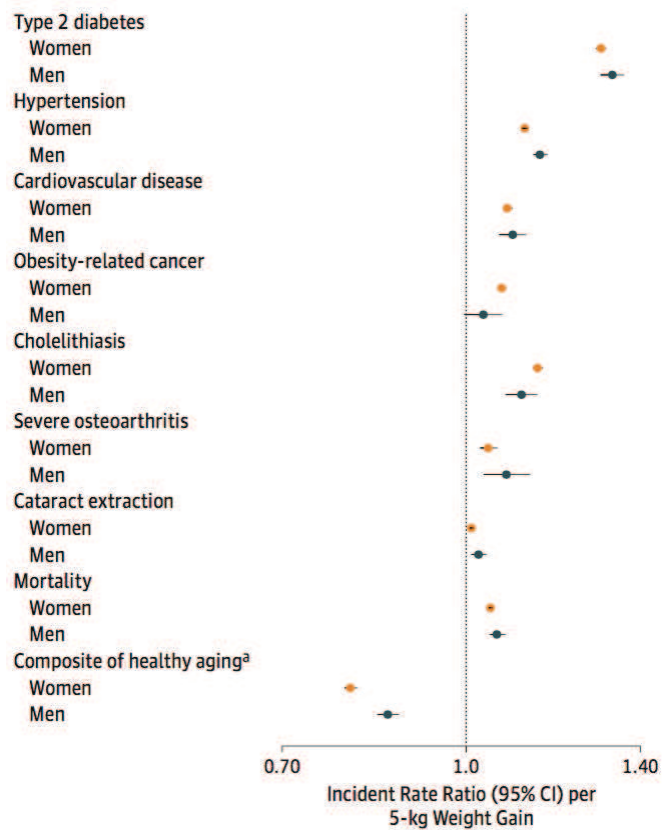


Figure 6. Association entre la prise de poids durant l'âge adulte et le risque de développement de pathologies chroniques, selon Zheng et al, JAMA 2017.

En parallèle, au début des années 2000, se développe la notion du « paradoxe de l'obésité ». Cette notion fait référence au fait que les patients obèses ont plus de risque de développer une pathologie cardiaque (pathologie coronarienne ou IC) mais une fois insuffisants cardiaques, leur risque de mortalité est plus faible que les patients avec un IMC normal, excepté en cas d'obésité morbide(10). Parmi les hypothèses avancées sont évoquées une meilleure réserve métabolique, une susceptibilité moindre aux cytokines pro-inflammatoires ainsi qu'une activité plus faible des systèmes orthosympathique et rénine-angiotensine-aldostérone.

Le substrat sous-tendant le développement de l'insuffisance cardiaque dans le cadre de l'obésité a été décrit par Alpert en 2001(11) qui regroupe sous le terme de cardiomyopathie de l'obésité les anomalies suivantes : dilatation des cavités ventriculaires avec hypertrophie excentrique, dysfonction ventriculaire gauche (VG) diastolique alors que la dysfonction VG systolique est inconstante (Figure 7). En 2006, Powell et al confirment ces données en retrouvant chez les sujets obèses un remodelage VG avec un trouble de la relaxation et une élévation des pressions de remplissage, sans altération de la fraction d'éjection du ventricule gauche (FEVG)(12).Cependant les anomalies de fonction et de structure retrouvées sur le plan cardiaque dans le cadre de l'obésité ne sont pas spécifiques de l'obésité mais sont également décrites dans le cadre du diabète, du vieillissement ainsi que dans l'hypertension artérielle.

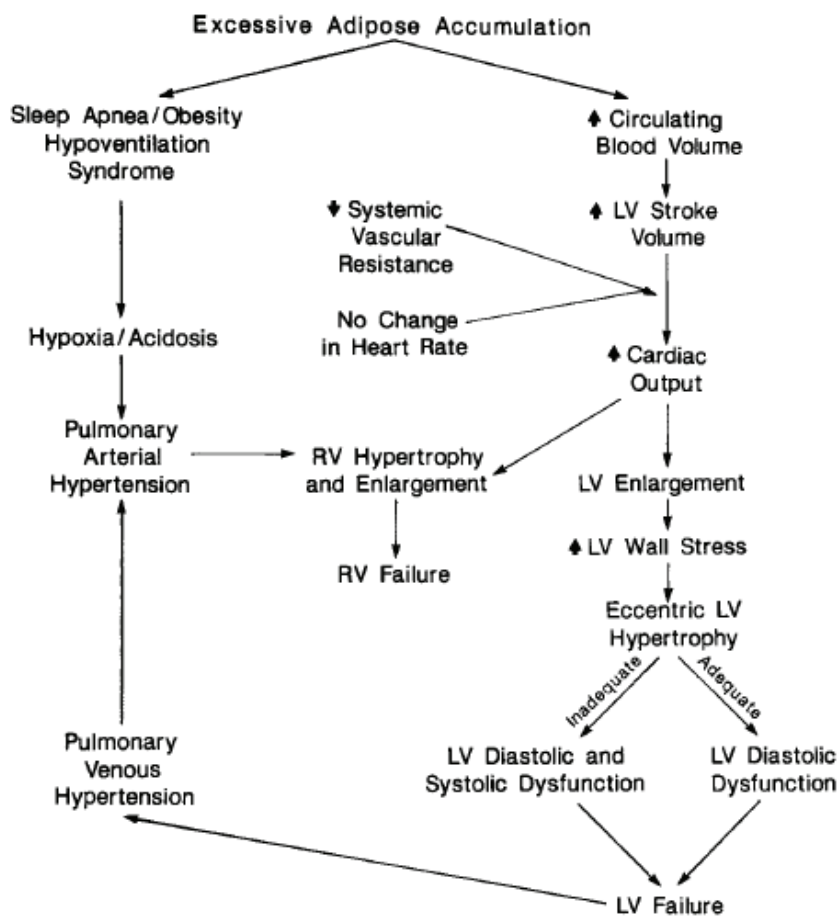


Figure 7. Pathophysiologie de la cardiomyopathie de l'obésité selon Alpert. *Am J Med Sci* 2001.

b) Diabète de type 2 et pathologie cardiovasculaire

Concernant l'imputabilité du diabète dans le développement d'une IC, les publications sont plus concordantes. La présence d'un diabète de type 2 est associé à des modifications myocardiques elles-mêmes associées à un pronostic péjoratif. Ainsi, des études anciennes(13) ont établi que le diabète pouvait à lui seul être responsable de modifications cardiaques regroupées sous le nom de « cardiomyopathie diabétique ». Devereux et al. a décrit un remodelage concentrique du VG avec hypertrophie et une discrète dysfonction systolique plus marquée chez les patients diabétiques(14) et ce, même après ajustement à l'ancienneté du diabète et à la présence d'une HTA. La troponine ultra-sensible serait un marqueur précoce

d'altération myocardique chez les diabétiques(15). Une élévation de la troponine augmenterait très significativement le risque de coronaropathie (multiplié par 3,8), d'insuffisance cardiaque (multiplié par 6) et de décès toutes causes (multiplié par 4), par rapport aux non diabétiques avec une troponine normale. Le fait d'être diabétique expose donc à un risque cardiovasculaire plus élevé et ce d'autant plus qu'il existe des arguments pour une altération myocardique. En utilisant l'imagerie de déformation (Speckle tracking ou DENSE en IRM), plusieurs études dont celles de notre groupe ont identifié une altération infra-clinique de la contractilité des patients diabétiques (Figure 8) (avec échocardiographie normale par ailleurs, notamment fraction d'éjection du VG > 55%) par rapport aux patients non diabétiques(16-19).

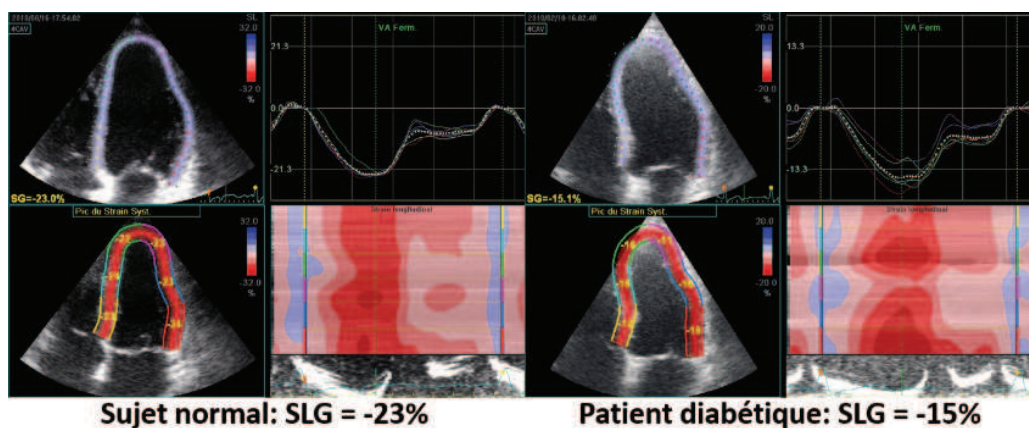


Figure 8. Exemple d'enregistrement du strain longitudinal chez un sujet sain (à gauche) et un diabétique (à droite)

Dans une étude récente de notre groupe portant sur des patients diabétiques asymptomatiques sans cardiopathie sous-jacente, le fait d'avoir un strain altéré était associé à un remodelage concentrique plus marqué lors de l'examen d'entrée dans la cohorte R2D2 et à une augmentation des volumes VG après 3 ans de suivi alors que ces volumes diminuaient chez les patients diabétiques avec strain préservé, ce qui est physiologiquement attendu avec l'âge (Figure 9)(17). Le strain pourrait donc être un marqueur précoce d'évolution vers une

cardiomyopathie chez les patients diabétiques de type 2 et a été identifié par d'autres groupes comme un marqueur de risque de mortalité chez les diabétiques(20).

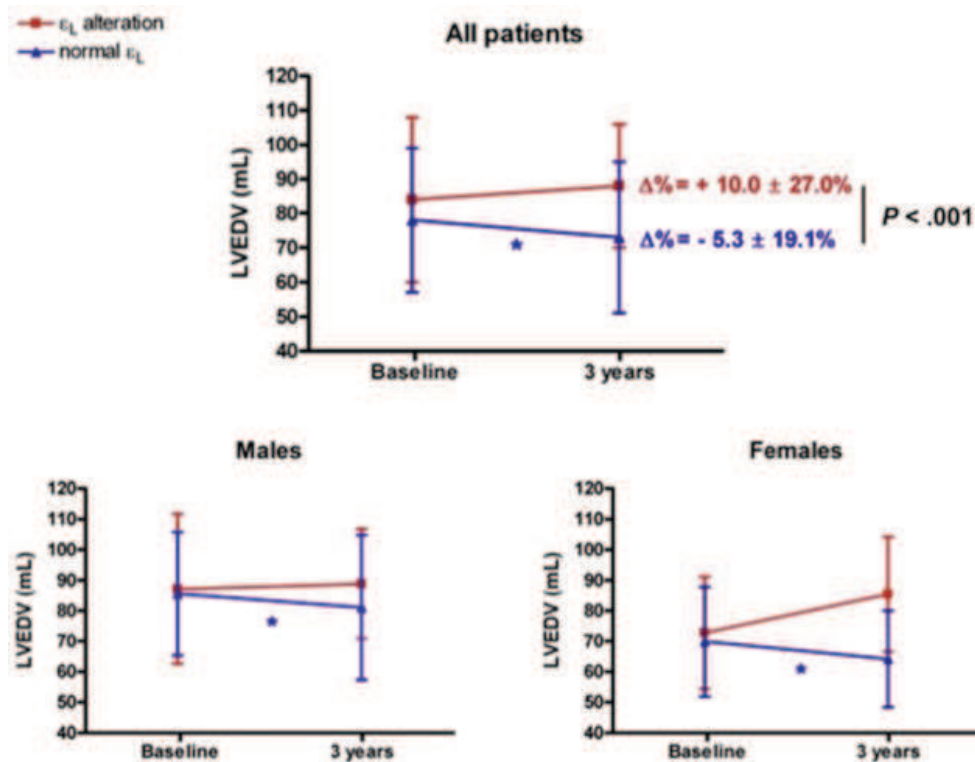


Figure 9. Evolution du volume télédiastolique ventriculaire gauche en fonction de la présence ou non d'une altération du strain après 3 ans de suivi de patients diabétiques asymptomatiques et sans cardiopathie. Ernande et al. JASE 2014.

Ces données ont été confirmées dans l'étude CARDIA publiée en 2017(21). Dans cette étude qui s'intéressait à des adultes jeunes, le suivi à long terme retrouvait une relation entre désordre du métabolisme glucidique (insulinorésistance et diabète de type 2) et altérations cardiaques associant remodelage et dysfonction. Le remodelage consistait en une hypertrophie et la dysfonction myocardique systolique était plus fréquente que la dysfonction diastolique, alors que cette dernière est souvent décrite comme survenant avant la dysfonction systolique. Ces altérations étaient d'autant plus marquées que l'ancienneté des troubles glucidiques étaient anciens (> 10 ans).

c) Obésité et diabète de type 2 : action synergique ou facteurs confondants ?

La présence d'une HTA et de l'obésité sont plus fréquents chez les patients diabétiques que chez les non-diabétiques. Cette très fréquente association rend difficile l'interprétation des études citées précédemment. La dysfonction myocardique est-elle en rapport avec le diabète, l'obésité, l'HTA ou est-ce que ces facteurs ont une action synergique ? Une étude récente du JAMA publiée en 2017 nous donne des éléments de réponse(22). Plus de 120 000 patients âgés de plus de 35 ans (USA et Europe) sans antécédents de diabète de type 2, de coronaropathie ou d'AVC ont été répartis dans différents groupes selon leur IMC. Après un suivi moyen de 10,7 années, 1627 cas de morbidité cardiométabolique ont été identifiés, incluant au moins 2 des 3 évènements cliniques suivants : développement d'un diabète de type 2, diagnostic de coronaropathie et survenue d'un AVC. En comparaison avec les patients à IMC normal (20 à 25kg/m²), les patients en surpoids (IMC : 25 à 30 kg/m²) ont 2 fois plus de risque de développer une morbidité cardiométabolique, les patients modérément obèses (IMC : 30 à 35 kg/m²) ont 5 fois plus de risque, et les patients sévèrement obèses (IMC > 35 kg/m²) ont 15 fois plus de risque. Ces résultats étaient valables quel que soit l'âge, le sexe et l'ethnie des patients. Si on analysait les combinaisons possibles entre les différentes pathologies cardiométaboliques, l'obésité sévère pouvait aussi bien être responsable de l'apparition d'un diabète ou d'une coronaropathie isolé, d'une coronaropathie suivie par un diabète, mais surtout d'un diabète suivi d'une coronaropathie. Cette étude confirme donc que l'obésité est un facteur suffisant pour développer une pathologie cardiovasculaire mais que son association avec le diabète a une action synergique sur le risque cardiovasculaire. Il est donc capital de dépister le diabète de type 2 chez les patients obèses (a fortiori en cas d'antécédents d'AVC ou de coronaropathie) et surtout de dépister et prévenir le développement d'une pathologie cardiovasculaire chez les patients obèses et diabétiques.

Une autre étude portant sur une très large cohorte de sujets (environ 3,5 millions d'hommes et de femmes) confirme l'importance du statut métabolique associé au poids des sujets en démontrant que certes les sujets obèses ont un risque cardiovasculaire supérieur au sujet de poids normal même en l'absence d'anomalie métabolique mais que ce risque augmente fortement avec le nombre de comorbidités métaboliques (diabète, dyslipidémie et hypertension artérielle) (Figure 10).

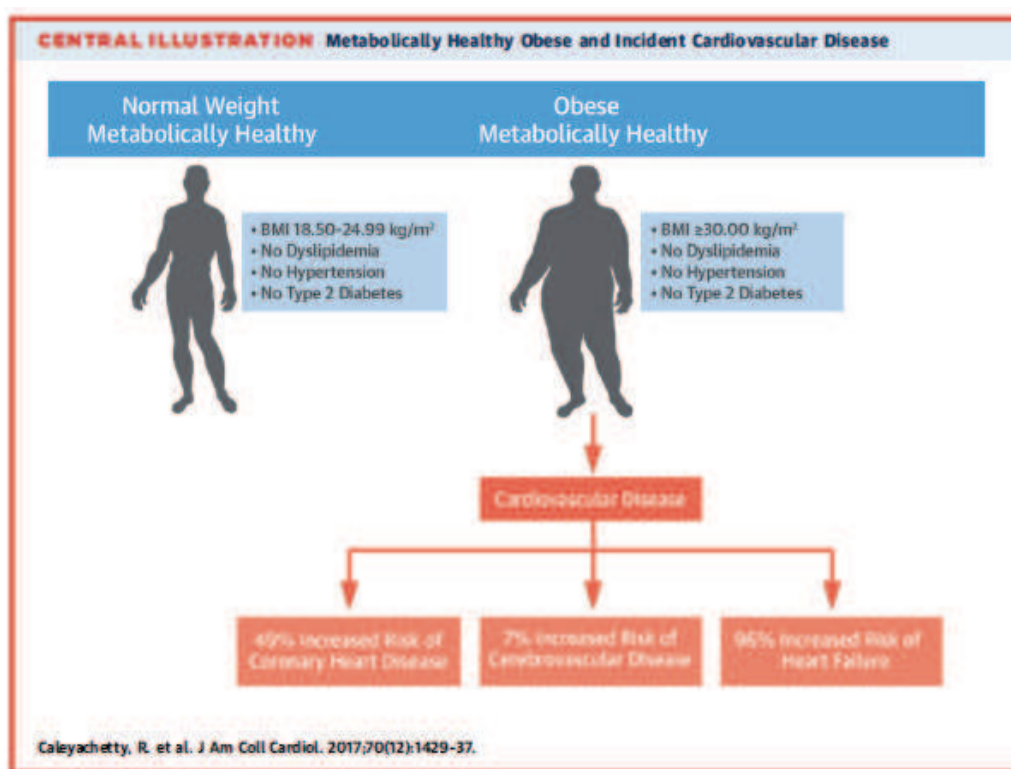


Figure 10. Influence respective du poids et des anomalies métaboliques sur le risque cardiovasculaire d'après Caleyachetty R ; JACC 2017

Cette même étude démontre également que chez les sujets de poids normal, les anomalies métaboliques sus-citées augmentent également le risque cardiovasculaire(23).

5) Phénotypes cardiaques chez le diabétique de type 2 : une nouvelle approche du risque cardiovasculaire intégrant les facteurs d'obésité et d'hypertension artérielle

Nous avons donc vu précédemment que le diabète de type 2 pouvait induire des modifications cardiaques structurelles et fonctionnelles regroupées sous le nom de cardiomyopathie diabétique, modifications identifiées comme étant précurseur d'insuffisance cardiaque, d'hospitalisation et de mortalité toute cause. Cependant, l'HTA et l'obésité, pathologies fréquemment associées au diabète de type 2, peuvent également induire les mêmes modifications cardiaques. La relation entre ces facteurs et la dysfonction cardiaque est-elle spécifique à chaque facteur ou est-elle la résultante d'une action synergique ? Même si la publication du JAMA en 2017 semble plaider pour une action synergique, nous avons voulu vérifier si l'association de plusieurs facteurs de risque augmentait le risque d'évènements cardiovasculaires et si l'identification de phénotypes cardiaques à partir d'une échocardiographie associant information précise du remodelage VG, imagerie de déformation et analyse de la fonction diastolique selon les recommandations récentes de l'ESC permettait de définir des profils cliniques et d'apprécier le risque cardiovasculaire des patients sans hypothèse *a priori* basée sur leurs facteurs de risque.

C'est la raison pour laquelle nous avons réalisé une analyse en cluster qui a été récemment publiée dans le *Journal of the American College of Cardiology*(24). Nous avons voulu voir si l'identification de groupes de patients ayant un phénotype cardiaque commun en échocardiographie permettait de mieux évaluer les profils cliniques et le pronostic que les analyses habituelles qui sont basées sur des statistiques dite *a priori*, c'est-à-dire basées sur des groupes pré-établis de patients en fonction de leurs caractéristiques cliniques (diabétiques non obèses, non hypertendus comparés aux diabétiques obèses, non hypertendus, aux diabétiques non obèses, hypertendus et enfin aux diabétiques obèses et hypertendus). Ainsi, au lieu de

classer les patients à partir de la présence d'une obésité ou d'une HTA et d'évaluer les modifications cardiaques et le pronostic qui leur sont associés, nous avons identifié des groupes de patients diabétiques de type 2 avec des profils communs en échocardiographie afin d'évaluer leur profil clinique et leur pronostic. Pour cela nous avons étudié une population constituée de 2 cohortes (453 patients de la cohorte R2D2 de Lyon, France et 389 patients de Brisbane, Australie) de patients diabétiques de type 2 asymptomatiques et sans pathologie cardiaque sous-jacente (FEVG >50%, électrocardiogramme et échocardiographie normaux). Une évaluation clinico-biologique et échocardiographique (incluant le strain) était réalisée à l'inclusion puis les patients étaient suivis cliniquement de façon prospective par des visites annuelles (délai médian de 67 mois [IQR 40-87]). Le critère de jugement principal était la survenue d'évènements cardiovasculaires majeurs incluant le décès cardiovasculaire et les hospitalisations pour arythmie, insuffisance cardiaque, coronaropathie.

Nous avons d'abord démontré que la comparaison des 4 groupes de patients selon leur phénotype clinique (diabétiques +/- obèse et +/- hypertendus) sur les paramètres échocardiographiques ne permettait pas de discriminer les groupes de façon concluante. Les paramètres morphologiques et fonctionnels (excepté la fonction diastolique) en échocardiographie étaient similaires entre les 4 groupes. Cette absence de différence significative entre les groupes était liée à un important chevauchement des valeurs des différents paramètres échocardiographiques (Figure 11). Cependant, l'accumulation de facteurs de risque était associée à plus d'évènements cardiovasculaires (Figure 12), le plus mauvais pronostic concernant donc les patients diabétiques obèses et hypertendus.

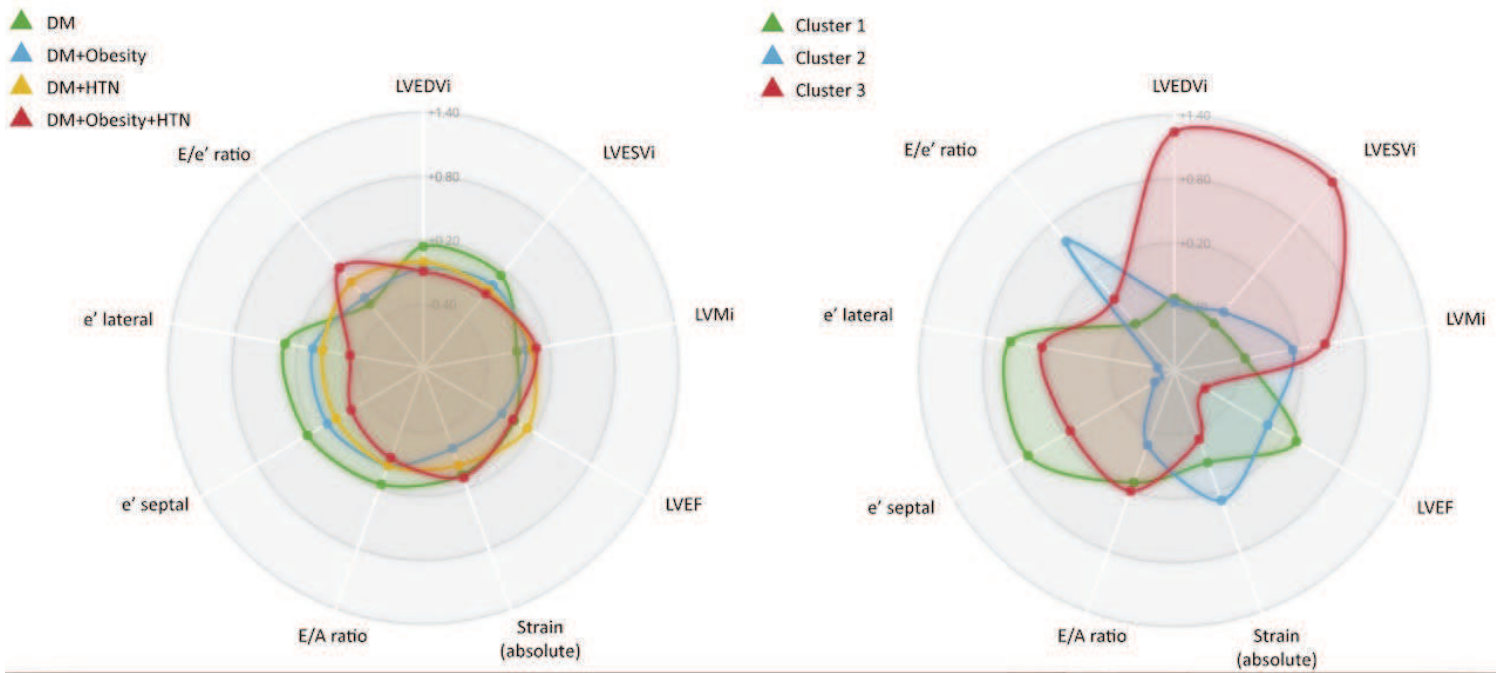


Figure 11. Répartition des paramètres échocardiographiques par facteurs de risque (à gauche) et par clusters (à droite).

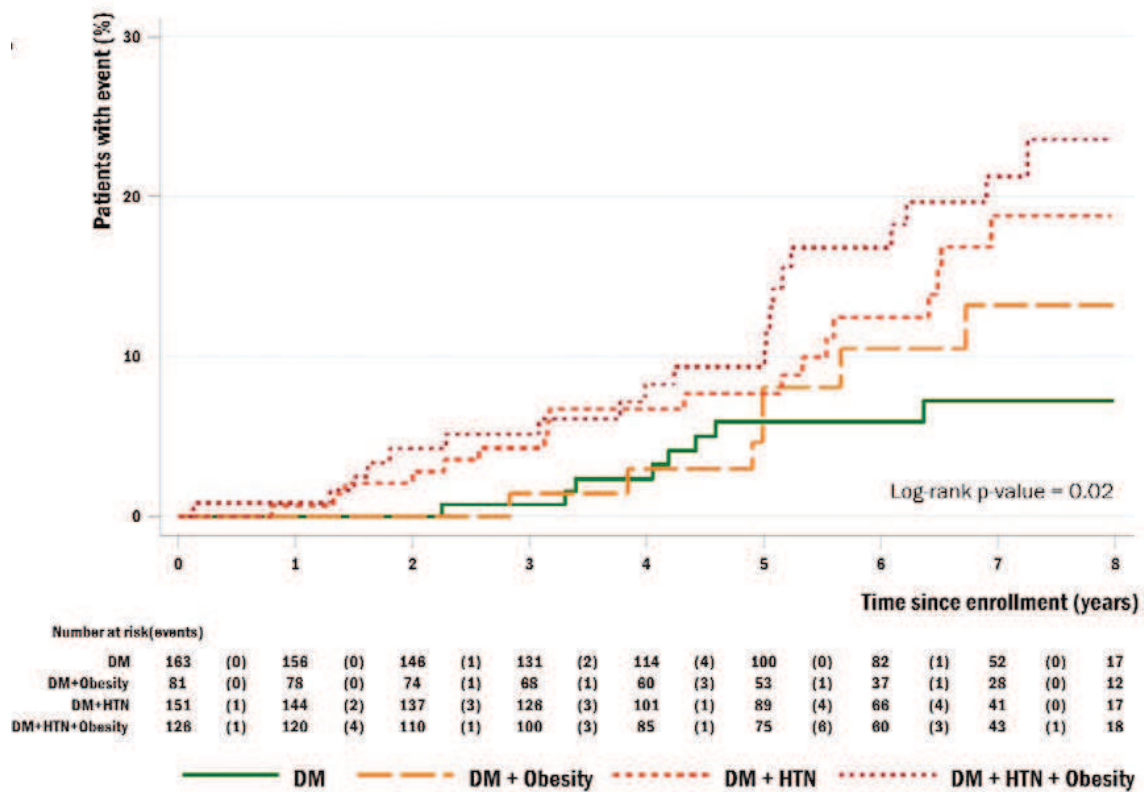


Figure 12. Courbes de Kaplan-Meier sur les évènements cardiovasculaires selon la répartition par facteurs de risque.

La classification des patients diabétiques en fonction de leur phénotype clinique permet donc de stratifier le risque cardiovasculaire mais ne permet pas de discriminer les patients sur leur phénotype cardiaque. Dans cette démarche, les résultats de l'échocardiographie sont donc ininterprétables en termes de valeur pronostique.

A contrario, l'analyse en cluster basée sur les paramètres échocardiographiques nous a permis d'identifier 3 clusters :

- Le cluster 1 correspondait aux patients à faibles comorbidités, essentiellement des hommes avec un faible pourcentage d'obèses et d'hypertendus. En comparaison aux autres clusters, le phénotype cardiaque comprenait une masse VG plus faible, des pressions de remplissage VG plus basses et d'excellents paramètres de fonction systolique.
- Le cluster 2 correspondait à des patients plus âgés, à prédominance féminine, ayant rarement un diabète de type 2 isolé sans autre facteur de risque. En comparaison aux autres clusters, le phénotype cardiaque comprenait les meilleures valeurs de strain mais les plus mauvais paramètres de pressions de remplissage VG.
- Le cluster 3 correspondait à des patients aux paramètres cliniques très proches de ceux du cluster 1. Par contre le phénotype cardiaque comprenait des volumes VG et une masse VG plus importante avec des paramètres de fonction systoliques plus bas que les autres clusters.

Les patients du cluster 1 étaient ceux qui avaient le meilleur pronostic alors que les patients des clusters 2 et 3 avaient un pronostic similaire (Figure 13).

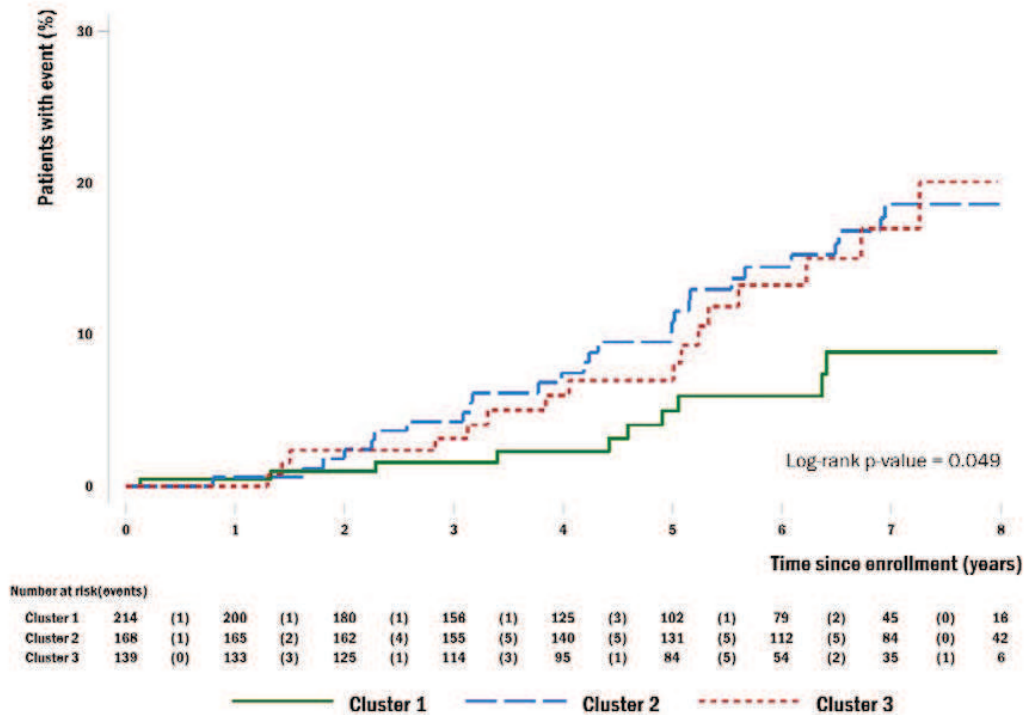


Figure 13. Courbes de Kaplan-Meier sur les évènements cardiovasculaires selon la répartition par cluster.

Cette étude met en évidence d’une part la valeur pronostique des facteurs de risque cliniques comme l’obésité et d’autre part la valeur pronostique de certains phénotypes échocardiographiques indépendamment des facteurs cliniques. Ce qui est intéressant, c’est la grande variabilité du profil clinique des patients diabétiques et l’impossibilité d’évaluer leur pronostic à partir des données d’échocardiographie si elles sont interprétées en fonction des paramètres cliniques. En raison d’un important chevauchement entre les valeurs des différents paramètres d’échocardiographie, il est impossible d’isoler des phénotypes cardiaques à partir des données cliniques, alors que ces phénotypes (dilatation VG, dysfonction diastolique) sont associés à un mauvais pronostic. L’analyse en cluster permet au contraire de mettre en évidence la valeur pronostique péjorative du remodelage (masse VG augmentée) et de la dysfonction VG (systolique et diastolique) chez des patients diabétiques malgré des profils cliniques similaires, et donc de confirmer que le diabète de type 2 isolé peut induire des anomalies cardiaques qui conditionnent le pronostic.

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the author's institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/authorsrights>

Clinical Implications of Echocardiographic Phenotypes of Patients With Diabetes Mellitus



Laura Ernande, MD, PhD,^{a,b} Etienne Audureau, MD, PhD,^c Christine L. Jellis, MD, PhD,^d Cyrille Bergerot, MD,^e Corneliu Henegar, MD, PhD,^b Daigo Sawaki, MD, PhD,^b Gabor Czibik, MD, PhD,^b Chiara Volpi, MD,^a Florence Canoui-Poittrine, MD, PhD,^c Hélène Thibault, MD, PhD,^{f,g} Julien Ternacle, MD,^{a,b} Philippe Moulin, MD, PhD,^{g,h} Thomas H. Marwick, MBBS, PhD, MPH,ⁱ Geneviève Derumeaux, MD, PhD^{a,b}

ABSTRACT

BACKGROUND Type 2 diabetes mellitus (T2DM) may alter cardiac structure and function, but obesity, hypertension (HTN), or aging can induce similar abnormalities.

OBJECTIVES This study sought to link cardiac phenotypes in T2DM patients with clinical profiles and outcomes using cluster analysis.

METHODS Baseline echocardiography and a composite endpoint (cardiovascular mortality and hospitalization) were evaluated in 842 T2DM patients from 2 prospective cohorts. A cluster analysis was performed on echocardiographic variables, and the association between clusters and clinical profiles and outcomes was assessed.

RESULTS Three clusters were identified. Cluster 1 patients had the lowest left ventricular (LV) mass index and ratio between early mitral inflow velocity and mitral annular early diastolic velocity (E/e') ratio, had the highest left ventricular ejection fraction (LVEF), and were predominantly male with the lowest rate of obesity or HTN. Cluster 2 patients had the highest strain and highest E/e' ratio, were the oldest, were predominantly female, and had the lowest rate of isolated T2DM (without HTN or obesity). Cluster 3 patients had the highest LV mass index and volumes and the lowest LVEF and strain, were predominantly male, and shared similar age and rate of obesity and HTN as cluster 1 patients. After follow-up of 67 months (interquartile range: 40 to 87), the composite endpoint occurred in 56 of 521 patients (10.8%). Clusters 2 (hazard ratio: 2.37; 95% confidence interval: 1.15 to 4.88) and 3 (hazard ratio: 2.19; 95% confidence interval: 1.00 to 4.82) had a similar outcome, which was worse than cluster 1.

CONCLUSIONS Cluster analysis of echocardiographic variables identified 3 different echocardiographic phenotypes of T2DM patients that were associated with distinct clinical profiles and highlighted the prognostic value of LV remodeling and subclinical dysfunction. (J Am Coll Cardiol 2017;70:1704-16) © 2017 by the American College of Cardiology Foundation.

From the ^aPhysiology Department, DHU Ageing-Thorax-Vessel-Blood, Henri Mondor Hospital, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Créteil, France; ^bINSERM U955, Team08, Université Paris-Est Créteil (UPEC), Créteil, France; ^cBiostatistics Department, Henri Mondor Hospital, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Créteil, France; ^dCEpiA EA7376, DHU Ageing-Thorax-Vessel-Blood, Université Paris Est (UPEC), Créteil, France; ^eCardiology Department, Cleveland Clinic, Cleveland, Ohio; ^fCentre d'Investigation Clinique INSERM 1407 Louis Pradel Hospital, Hospices Civils de Lyon, Bron, France; ^gService d'Explorations Fonctionnelles Cardiovasculaires, Groupement Hospitalier Est, Hospices Civils de Lyon, Bron, France; ^hINSERM UMR-1060, CarMeN Laboratory, Université Claude Bernard Lyon, Lyon, France; ⁱFédération d'endocrinologie, Hospices Civils de Lyon, Bron, France; and the [†]Baker Heart and Diabetes Institute, Melbourne, Australia. This work was supported by a grant from the Société Francophone du Diabète (formerly the Association of French Language for the Study of Diabetes Mellitus and Metabolic Diseases, grant number D20515) and a grant from the Programme Hospitalier de Recherche Clinique (PHRC 2009-A00089-48). This work was also supported by the French National Agency through the Recherche Hospital-Universitaire-Cardiac & Skeletal Muscle Alteration in Relation to Metabolic Diseases and Ageing: Role of Adipose Tissue (RHU-CARMMA) Grant ANR-15-RHUS-0003. Dr Canoui-Poittrine has epidemiologic expertise and participated on a scientific committee for an observational study in Parkinson's disease, and received honoraria from ABBVIE, France. Dr. Moulin has participated in investigator clinical trials for Sanofi, Pierre Fabre, and Merck Sharp & Dohme; has served on the advisory board of Sanofi; has spoken at symposia for Sanofi, Merck Sharp & Dohme, and Novo Nordisk; and has participated in academic congresses for Janssen, Boehringer, Amgen, and AstraZeneca. All other authors



Listen to this manuscript's audio summary by JACC Editor-in-Chief Dr. Valentin Fuster.



Insulin resistance and glycemic dysregulation are associated with subtle and progressive modifications in cardiac structure and function. Such a “metabolic exposome” results in left ventricular (LV) remodeling (1-3) and impaired LV systolic and diastolic function (4,5). More specifically, type 2 diabetes mellitus (T2DM), an independent risk factor for heart failure (HF) (6), can induce a diabetic cardiomyopathy (7-9). In T2DM, early cardiac modifications include LV hypertrophy (10), diastolic dysfunction (11), and decreased myocardial strain (12-14), which are precursors for the development of LV remodeling (15) and adverse outcomes, including HF (16) and all-cause mortality and hospitalization (17).

SEE PAGE 1717

Obesity and hypertension (HTN) are frequent comorbidities of T2DM (18-20), and many of the abnormalities found in diabetic cardiomyopathy are analogous to those described in both obese (21) and hypertensive patients (22,23). Moreover, parameters such as age (1,24) and sex might also influence early cardiac geometry and functional changes. The specific contribution of these causative factors is unclear, as is their synergistic contribution to cardiac dysfunction in T2DM. Whereas classic statistical analyses are built on a priori hypothesis, cluster analysis might improve cardiac phenotyping and provide new insights in heterogeneous patient groups, such as those with T2DM, by providing an innovative exploratory analysis (25). Therefore, we hypothesized that cluster analysis might allow identification of T2DM patient groups (clusters) with common cardiac phenotypes based on ultrasound data and that those cardiac phenotypes are associated with distinct clinical profiles and different prognosis.

METHODS

This analysis used data from 2 large prospective cohorts (453 from Lyon, France, and 389 from Brisbane, Australia) of asymptomatic T2DM patients free of overt heart disease. Although similar inclusion criteria were shared between the 2 cohorts in terms of age, T2DM, and absence of overt cardiac disease, the different characteristics of the 2 populations, especially the prevalence of obesity and HTN,

provided a heterogeneity suitable for cluster analysis (Online Table 1).

Inclusion criteria were T2DM with normal left ventricular ejection fraction (LVEF; >50%) and taking oral hypoglycemic or insulin treatment (12,15,26). Exclusion criteria were type 1 diabetes mellitus; symptoms, signs (clinical or electrocardiographic), or history of heart disease; presence of regional LV wall motion abnormalities; absence of sinus rhythm; history of cardiomyopathy, coronary artery disease, or valvular heart disease; severe renal failure (defined as creatinine clearance <30 ml/min); echocardiographic images unsuitable for quantification; severely uncontrolled diabetes (glycosylated hemoglobin [HbA_{1c}] >12% or glycemia >3 g/l); and uncontrolled resting blood pressure (>180/100 mm Hg). Silent ischemia and/or coronary artery disease was excluded by a negative stress electrocardiogram, echocardiogram, or myocardial perfusion scintigraphy, and/or by normal coronary angiogram.

Ethics committee approval was obtained from both institutions, and all subjects provided informed consent to participate.

CLINICAL AND BIOLOGICAL DATA. All patients underwent physical examination, echocardiography, and biochemical analysis on the same day at inclusion. Clinical data were collected regarding the age, sex, diabetes duration, height, weight, smoking status, and medication use of subjects. A complete physical examination was performed. Hemodynamic parameters, including heart rate and blood pressure, were measured. Obesity was defined as a body mass index (BMI) ≥ 30 kg/m². Diagnosis of HTN was based on medical history and the use of antihypertensive medications and/or office blood pressure measurement confirmed by ambulatory blood pressure monitoring (27).

The presence or absence of diabetic retinopathy was assessed by dilated eye examination performed by an ophthalmologist (7). The diagnosis of neuropathy was determined based on interview and physical examination. Blood samples were taken for biochemical analysis of creatinine, cholesterol, triglyceride, HbA_{1c}, and brain natriuretic peptide

ABBREVIATIONS AND ACRONYMS

- A** = peak late diastolic velocity
- BMI** = body mass index
- CI** = confidence interval
- E** = peak early diastolic velocity
- e'** = mitral annular early diastolic velocity
- e' lateral** = early diastolic velocity at the lateral site of the mitral annulus
- e' septal** = early diastolic velocity at the septal site of the mitral annulus
- HbA_{1c}** = glycosylated hemoglobin
- HF** = heart failure
- HR** = hazard ratio
- HTN** = hypertension
- LA** = left atrium
- LV** = left ventricle
- LVEDV** = left ventricular end-diastolic volume
- LVEF** = left ventricular ejection fraction
- LVESV** = left ventricular end-systolic volume
- LVMI** = left ventricular mass indexed to body surface area
- T2DM** = type 2 diabetes mellitus

have reported that they have no relationships relevant to the contents of this paper to disclose. Drs. Ernande and Audureau contributed equally to this work. Drs. Marwick and Derumeaux contributed equally to this work and are joint senior authors. Maurizio Galderisi, MD, served as Guest Editor for this paper.

Manuscript received July 3, 2017; accepted July 31, 2017.

levels. Estimated glomerular filtration rate was determined using the Modification of Diet in Renal Disease Study equation (28).

ECHOCARDIOGRAPHY. Transthoracic echocardiography was performed at rest using a commercially available ultrasound system. Acquisitions from at least 3 consecutive heart beats were stored in raw data format for off-line analysis. Left ventricular end-diastolic volume (LVEDV), left ventricular end-systolic volume (LVESV), and LVEF were calculated using the Simpson biplane method (29). LVEDV and LVESV were indexed to body surface area, and LV mass was determined using the recommended formula (29) and indexed to body surface area.

Using pulsed wave Doppler, mitral inflow velocities and peak early (E) and late (A) diastolic velocities were measured, and E/A ratio was calculated. The mitral annular early diastolic velocity (e') was assessed at the septal (e' septal) and lateral (e' lateral) sites of the mitral annulus using pulsed wave Doppler tissue imaging, and the mean e' value and E/ e' ratio were calculated (30,31). The left atrial area (LA) was measured in an apical 4-chamber view by planimetry, and the LA volume was measured by the Simpson method and indexed to body surface area (29).

The peak systolic longitudinal strain of the LV basal segments was measured using 2-dimensional speckle tracking imaging on the apical views. The endocardial border was manually traced from an end-systolic frame. The software automatically detected the epicardial border, and the region of interest was manually adjusted to include the entire myocardial wall. The quality of tracking was verified both automatically and visually, and the region of interest was modified and corrected by the observer if judged necessary to obtain optimal tracking. The peak systolic longitudinal strain of the LV basal segments was collected to calculate the mean basal strain value (reported using absolute value).

Major adverse cardiac events were obtained from annual follow-up visits and medical records. The endpoint for the study was a composite of cardiovascular mortality and hospitalization (arrhythmia, HF, coronary artery disease).

CLUSTER ANALYSIS. The initial analysis sought to assess whether differences in clinical, biological, and echocardiographic features existed between patients with T2DM according to the presence or absence of obesity and/or HTN. Four clinically defined groups were thus constituted: 1) patients with isolated T2DM; 2) T2DM and obesity; 3) T2DM and HTN; and 4) T2DM, obesity, and HTN.

In the second part of the analysis, we sequentially conducted various unsupervised analyses to more deeply investigate the associations between echocardiographic features and the other phenotypic characteristics or major cardiac adverse events. We then sought to identify novel specific patient profiles to improve the characterization of T2DM without overt heart disease. To do so, a principal component analysis was first performed to inform correlations between parameters. A Gabriel biplot was built to project the patients along the principal components axes, based on their own individual echocardiographic characteristics (32). The biplot was used to map cluster solutions by attributing different colors to patient groups according to the results of the cluster analysis conducted afterward.

Agglomerative hierarchical clustering analysis was used to identify echocardiographic patterns that would define subsets of patients. This analysis combines similar subjects based on selected features (here, restricted to echocardiographic parameters, i.e., LV mass indexed to body surface area [LVMI], LVEDV indexed to body surface area, LVESV indexed to body surface area, LVEF, strain, E/A ratio, e' septal, e' lateral, and E/ e' mean ratio) to create homogeneous clusters of T2DM patients characterized by an overall similar functional profile. Hierarchical clustering was performed on standardized raw (e' septal and e' lateral) or log-transformed (all other variables) values, depending on the normality of distribution, based on Euclidean distance as the similarity metric and using the Ward linkage approach (33). All clustering was performed by 1 investigator (E.A.) blinded to clinical data.

A heat map was generated to illustrate the findings and a dendrogram to demonstrate combinations between patients and distances between groupings, with horizontal branches representing the combination of 2 clusters and vertical branches the degree of dissimilarity between combined clusters. The optimal number of clusters was determined based on statistical indexes, with an a priori minimal cluster size of 100 patients designated to improve stability of the results. Because no unique statistical approach provides definitive guidance on the number of clusters to retain, we used a combination of 30 different tests, as provided by the R function NbClust (34), to determine the optimal number of clusters, finally choosing the most-picked number of clusters across the tests. Radar plots were charted to visualize echocardiographic characteristics across clusters. Finally, clinical and biological characteristics were compared across clusters to characterize their clinical significance.

Cluster analysis was performed on patients with complete information for echocardiographic

TABLE 1 Clinical and Biological Characteristics

	N	All Patients (N = 745)	Isolated T2DM (n = 201)	T2DM and Obesity (n = 120)	T2DM and HTN (n = 211)	T2DM, Obesity, and HTN (n = 213)	p Value*
Clinical characteristics							
Age, yrs	745	57.4 ± 9.1	55.6 ± 9.3	54.0 ± 8.6	60.0 ± 8.4†‡	58.4 ± 8.8†‡	<0.0001
Females	745	322 (43.2)	75 (37.3)	54 (45.0)	87 (41.2)	106 (49.8)	0.070
Diabetes duration, yrs	728	9.5 ± 7.6	9.3 ± 7.6	7.7 ± 6.3	11.1 ± 8.3‡	9.2 ± 7.1	0.001
BMI, kg/m ²	745	30.2 ± 5.1	26.2 ± 2.3	34.5 ± 3.6	26.9 ± 2.1	34.8 ± 4.1	–
Obesity	745	333 (44.7)	–	120 (100.0)	–	213 (100.0)	–
HTN	745	424 (56.9)	–	–	211 (100.0)	213 (100.0)	–
Dyslipidemia	595	346 (58.2)	67 (41.4)	41 (45.1)	117 (66.9)†‡	121 (72.5)†‡	<0.0001
Smokers	732	206 (28.1)	45 (22.5)	37 (31.4)	50 (24.4)	74 (35.4)†	0.014
Retinopathy/neuropathy	739	175 (23.6)	42 (21.0)	24 (20.2)	61 (29.1)	48 (22.6)	0.165
Hemodynamics							
Heart rate, beats/min	745	75.7 ± 12.8	72.5 ± 12.4	77.1 ± 11.9†	75.0 ± 12.7	78.7 ± 12.8†§	<0.0001
SBP, mm Hg	745	134.9 ± 17.5	125.7 ± 13.6	127.8 ± 12.3	140.8 ± 17.0†‡	141.8 ± 18.4†‡	<0.0001
DBP, mm Hg	745	79.1 ± 10.6	75.2 ± 8.8	77.7 ± 10.2	79.8 ± 10.6†	82.8 ± 10.8†‡§	<0.0001
Biochemistry							
HbA _{1c} , %	736	7.6 ± 1.5	7.4 ± 1.5	7.8 ± 1.3	7.5 ± 1.4	7.7 ± 1.5	0.116
HDL cholesterol, mmol/l	743	1.2 ± 0.3	1.3 ± 0.3	1.2 ± 0.3†	1.2 ± 0.3	1.2 ± 0.3†	0.013
LDL cholesterol, mmol/l	726	2.7 ± 0.9	2.9 ± 0.9	2.9 ± 1.0	2.6 ± 0.9†‡	2.5 ± 0.8†‡	<0.0001
Triglycerides, mmol/l	726	1.8 ± 1.5	1.5 ± 0.8	2.2 ± 2.2†	1.7 ± 1.5‡	2.1 ± 1.6†§	<0.0001
eGFR, mL/min/1.73 m ²	598	89.7 ± 23.1	95.2 ± 22.8	90.6 ± 22.9	87.1 ± 24.2†	86.4 ± 21.3†	0.002
BNP, ng/ml	559	25.0 (11.0-25.0)	17.5 (9.0-25.0)	25.0 (9.0-25.0)	25.0 (11.0-27.0)	25.0 (19.0-28.0)	0.063
Medications							
Metformin	745	539 (72.3)	135 (67.2)	95 (79.2)	143 (67.8)	166 (77.9)	0.012
Insulin	745	215 (28.9)	48 (23.9)	26 (21.7)	70 (33.2)	71 (33.3)	0.024
ACE inhibitor or ARB	745	405 (54.4)	38 (18.9)	21 (17.5)	170 (80.6)†‡	176 (82.6)†‡	<0.0001

Values are mean ± SD, n (%), or median (interquartile range). ***Bold** results are statistically significant at the p < 0.05 level. Sidak correction: †p < 0.05 compared to T2DM; ‡p < 0.05 compared to T2DM and obesity; §p < 0.05 compared to T2DM and HTN.

ACE = angiotensin-converting enzyme; ARB = angiotensin receptor blocker; BMI = body mass index; BNP = B-type natriuretic peptide; DBP = diastolic blood pressure; eGFR = estimated glomerular filtration rate; HbA_{1c} = glycosylated hemoglobin; HDL = high-density lipoprotein; HTN = hypertension; LDL = low-density lipoprotein; SBP = systolic blood pressure; T2DM = type 2 diabetes mellitus.

variables. The proportions of missing values for all variables are shown in [Online Figure 1](#). Although most variables had <5% missing data, 2 echocardiographic variables had higher missing data rates: LA area (37.4%) and LA volume index (57.0%). These 2 variables were deliberately not used for building clusters to preserve an appropriate sample size for clustering analysis. A sensitivity analysis was further conducted to assess the robustness of our findings when also using these variables. To do so, we included all patients with available data for LA area and other variables used for the main analysis (n = 462), while imputing missing LA volumes using k-nearest neighbors methodology.

STATISTICAL ANALYSIS. Descriptive results are presented as percentage for categorical data and mean ± SD or median (interquartile range) for continuous variables, depending on the normality of their distribution as assessed by Shapiro-Wilk test.

Comparisons between groups for continuous data were conducted using 1-way analysis of variance or Kruskal-Wallis tests, followed by post hoc tests for

pairwise comparisons in case of overall significance and applying Sidak correction for test multiplicity. Categorical data were compared using the chi-square test or Fisher exact test, as appropriate. Echocardiographic parameters were further compared across groups using linear regression models adjusting for age, sex, and diabetes duration.

Survival analyses based on time-to-event data were performed to assess the prognostic value of the identified clusters or the clinical groups according to presence of obesity and/or HTN. Unadjusted cumulative incidence curves were plotted by the Kaplan-Meier method for the composite study endpoint (cardiovascular hospitalization or death), using log-rank tests to assess significance for group comparison. Cox proportional hazards regression models were also constructed to compute crude hazard ratios (HRs) and 95% confidence intervals (CIs).

A p value < 0.05 was considered significant. Descriptive analyses and comparisons between clinically defined and clusters groups were performed

TABLE 2 Echocardiographic Variables

	All Patients (N = 745)	Isolated T2DM (n = 201)	T2DM and Obesity (n = 120)	T2DM and HTN (n = 211)	T2DM, Obesity, and HTN (n = 213)	p Value for ANOVA*
LVMi, g/m ²						
Crude	89.3 ± 23.3	86.8 ± 22.5	88.8 ± 26.6	90.4 ± 23.0	90.8 ± 22.4	0.320
Adjusted†	–	86.5 ± 1.7	88.7 ± 2.2	90.5 ± 1.6	91.0 ± 1.6	0.220
LVEDV, ml						
Crude	79.5 ± 23.7	78.4 ± 21.8	82.2 ± 24.8	76.2 ± 23.9	82.3 ± 24.1	0.031
Adjusted†	–	76.7 ± 1.5	81.4 ± 2.0	76.4 ± 1.5	84.2 ± 1.5‡	<0.0001
LVEDVi, ml/m ²						
Crude	40.7 ± 10.7	42.0 ± 10.1	39.8 ± 11.3	40.9 ± 11.2	39.9 ± 10.4	0.160
Adjusted†	–	41.5 ± 0.7	39.6 ± 1.0	40.9 ± 0.7	40.4 ± 0.7	0.448
LVESV, ml						
Crude	27.6 ± 11.4	27.6 ± 10.6	29.4 ± 12.0	26.1 ± 11.8	28.2 ± 11.4	0.069
Adjusted†	–	26.8 ± 0.8	28.9 ± 1.0	26.3 ± 0.7	29.1 ± 0.7	0.016
LVESVi, ml/m ²						
Crude	14.1 ± 5.4	14.7 ± 5.2	14.2 ± 5.4	14.0 ± 5.8	13.6 ± 5.1	0.220
Adjusted†	–	14.5 ± 0.4	14.0 ± 0.5	14.0 ± 0.4	13.9 ± 0.4	0.731
LVEF, %						
Crude	66.1 ± 6.3	66.0 ± 6.3	65.0 ± 6.4	66.9 ± 5.9	66.0 ± 6.6	0.089
Adjusted†	–	66.2 ± 0.4	65.2 ± 0.6	66.8 ± 0.4	65.8 ± 0.4	0.179
Basal longitudinal strain, %						
Crude	–20.3 ± 2.9	–20.4 ± 2.6	–19.7 ± 2.9	–20.2 ± 2.7	–20.5 ± 3.3	0.104
Adjusted†	–	–20.5 ± 0.2	–19.7 ± 0.3	–20.2 ± 0.2	–20.4 ± 0.2	0.113
E/A ratio						
Crude	1.0 ± 0.3	1.1 ± 0.3	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.3	1.0 ± 0.3	0.078
Adjusted†	–	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0	0.132
e' mean, cm/s						
Crude	7.7 ± 2.5	8.4 ± 2.6	7.8 ± 2.4	7.5 ± 2.3‡	7.0 ± 2.3‡§	<0.0001
Adjusted†	–	8.3 ± 0.2	7.5 ± 0.2‡	7.7 ± 0.2	7.2 ± 0.2‡	<0.0001
E/e' mean ratio						
Crude	10.9 ± 5.4	9.7 ± 4.7	10.0 ± 3.5	11.2 ± 6.5	12.1 ± 5.3‡§	<0.0001
Adjusted†	–	10.0 ± 0.4	10.3 ± 0.5	11.0 ± 0.4	11.9 ± 0.4‡	0.003
LA area, cm ² (n = 462)						
Crude	17.2 ± 3.2	16.3 ± 2.9	17.9 ± 2.9‡	17.0 ± 3.3	18.1 ± 3.2‡	<0.0001
Adjusted†	–	16.3 ± 0.3	17.7 ± 0.4‡	17.1 ± 0.3	18.2 ± 0.3‡	<0.0001
LA volume index, ml/m ² (n = 312)						
Crude	47.2 ± 12.6	43.3 ± 10.8	50.1 ± 12.3‡	45.0 ± 12.0	53.6 ± 13.2‡	<0.0001
Adjusted†	–	43.0 ± 1.2	50.1 ± 1.7‡	45.2 ± 1.3	53.8 ± 1.4‡	<0.0001

Values are crude mean ± SD and adjusted mean ± SE. ***Bold** results are statistically significant at the p < 0.05 level. †Linear regression (adjustment for age, sex, and diabetes duration). ‡Sidak correction: ‡p < 0.05 compared to T2DM; §p < 0.05 compared to T2DM and obesity; ||p < 0.05 compared to T2DM and HTN.

ANOVA = analysis of variance; e' mean = mean value of early diastolic velocity at the septal and lateral sites of the mitral annulus; E/A = ratio between peak early and late diastolic velocities; E/e' = ratio between early mitral inflow velocity and mitral annular early diastolic velocity; LA = left atrium; LVEDV = left ventricular end-diastolic volume; LVEDVi = left ventricular end-diastolic volume indexed to body surface area; LVEF = left ventricular ejection fraction; LVESV = left ventricular end-systolic volume; LVESVi = left ventricular end-systolic volume mass indexed to body surface area; LVMi = left ventricular mass indexed to body surface area; other abbreviations as in [Table 1](#).

using Stata 14.1 (StataCorp LLC, College Station, Texas). R statistical software (3.1.3) was used for clustering analyses and visualizations (stats, NbClust, mclust, pca3d, d3heatmap, and ggplot2 packages). Radar charts were specifically plotted based on the D3.js library.

RESULTS

The main analyses were performed on 745 of 842 patients (88%) who had complete echocardiographic

information. Most variables were similar between excluded and included patients, except for diabetes duration and BMI ([Online Table 2](#)).

Table 1 summarizes the characteristics of subgroups of T2DM alone (n = 201 [27.0%]) or associated with both obesity and HTN (n = 213 [28.6%]), obesity (n = 120 [16.1%]), or HTN (n = 211 [28.3%]). The group with T2DM and HTN were older, had longer diabetes duration, and had a higher prevalence of retinopathy or neuropathy compared with the other groups.

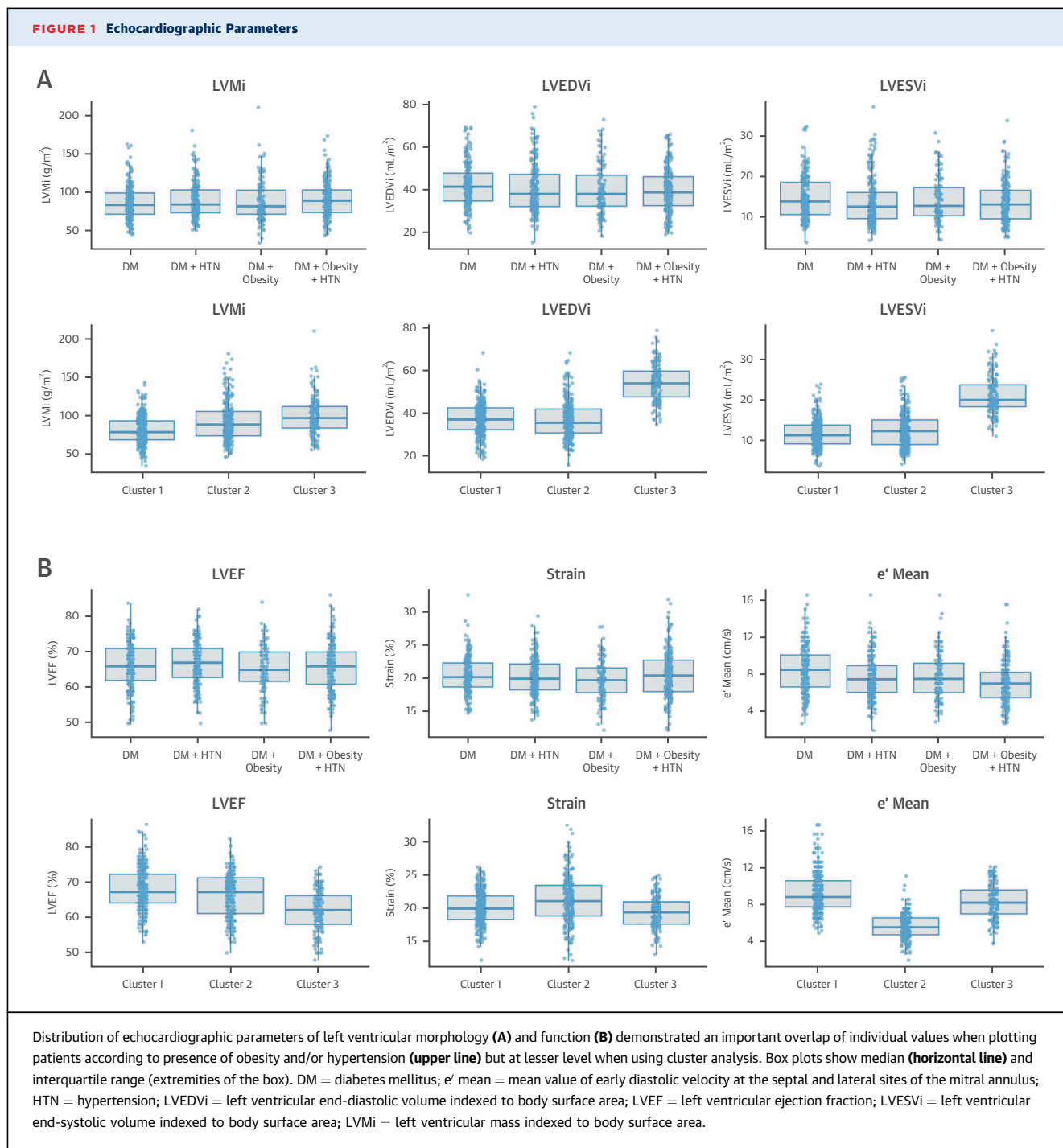
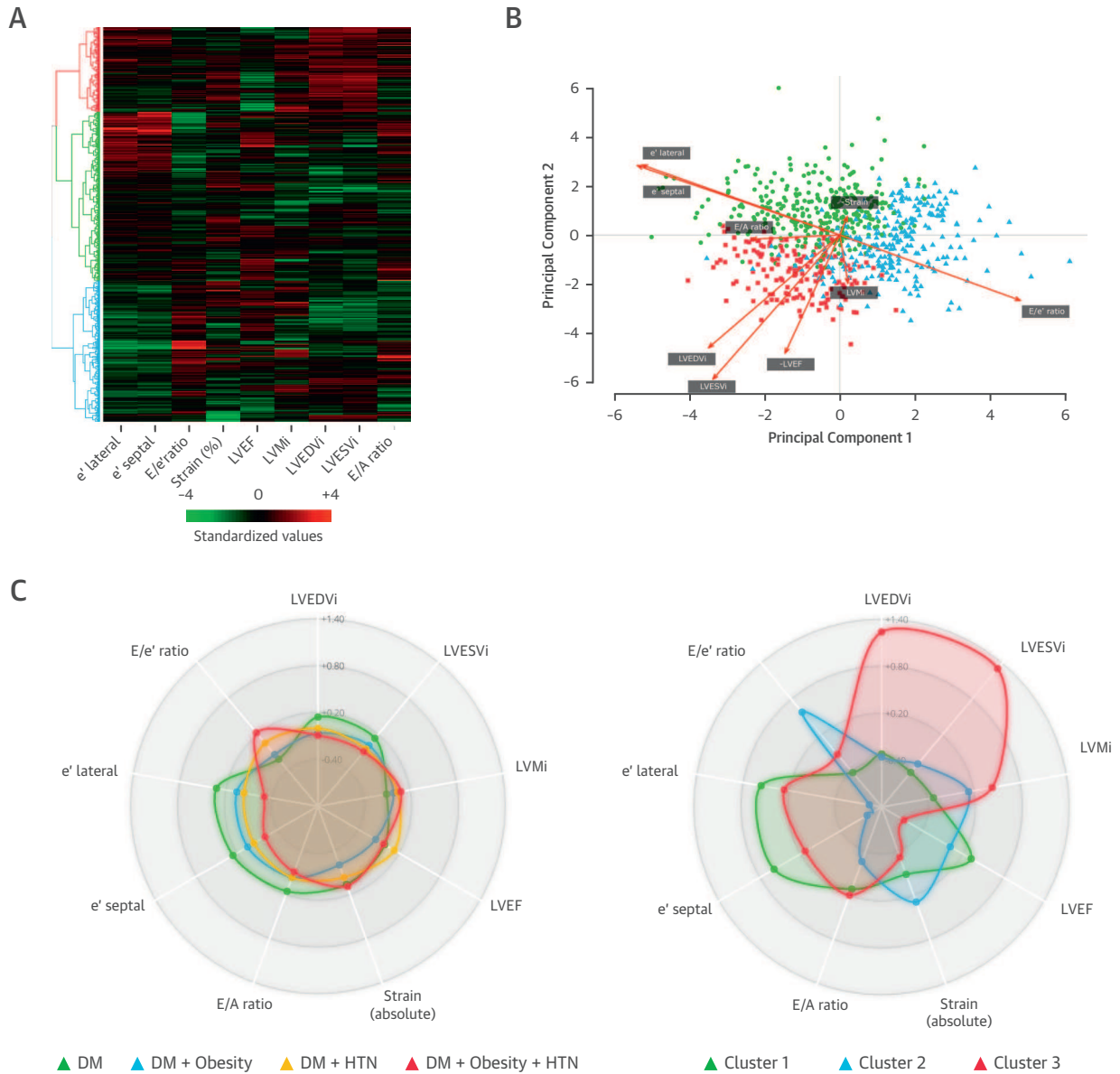


Table 2 compares the echocardiographic data among the 4 groups. The presence of obesity and HTN did not significantly alter LV morphology (LVMi and indexed LV volumes) and systolic function (LVEF and longitudinal strain) (**Figure 1**). In contrast, groups with obesity and HTN had an impact on diastolic function (lower e' velocities and higher E/e' ratio, but in normal ranges) compared with the other

groups. Despite significant differences between mean values, an important overlap of individual values of diastolic parameters was observed among the 4 groups (**Figure 1**).

CLUSTER ANALYSIS OF ECHOCARDIOGRAPHIC PHENOTYPES. Echocardiographic variables identified 3 clusters of cardiac phenotypes (**Figure 2**, **Tables 3 and 4**, **Online Video 1**):

FIGURE 2 Cluster Analysis



(A) Heat map showing grouping of patients based on cluster analysis of echocardiographic variables. **Red** indicates increased standardized values expressed in SD; **green** indicates decreased values. Three clusters were identified and colored in the adjunct dendrogram: cluster 1 (**green**), 2 (**blue**), and 3 (**red**). **(B)** Biplot representation visualizes the relationships between variables (**arrows**) used for building clusters while simultaneously displaying the patients (**dots**) based on their individual echocardiographic characteristics. Results are projected onto the 2 first dimensions yielded by principal component analysis. Colors for observations correspond to the 3-group solution from cluster analysis, demonstrating the very clear partitioning between patients based on their echographic characteristics ([Online Video 1](#)). **(C)** Left and right radar charts of the cardiac phenotypes illustrate the superposition of echocardiographic parameters in the 4 clinical groups defined on the presence of obesity and/or HTN and the 3 clusters, respectively. Values are standardized values expressed as z-scores (SD) from average values. e' lateral = early diastolic velocity at the lateral site of the mitral annulus; e' septal = early diastolic velocity at the septal site of the mitral annulus; E/A = ratio between peak early and late diastolic velocities; E/e' = ratio between early mitral inflow velocity and mitral annular early diastolic velocity; other abbreviations as in [Figure 1](#).

Cluster 1 (low comorbidity) had the lowest LVMI and E/e' ratio values, the highest LVEF, and the second highest strain values. This cluster comprised predominantly male patients, with the lowest rate of obesity or HTN.

Cluster 2 (elderly, diastolic dysfunction) had the highest strain values but the lowest e' velocities and the highest E/e' ratio. This cluster gathered the oldest patients and was predominantly female with the lowest rate of isolated T2DM. Blood pressure levels, BMI, and heart rate were the highest compared with the 2 other clusters.

Cluster 3 (hypertrophic systolic dysfunction) had both the highest LVMI and LV volumes and the lowest LVEF and strain. This cluster comprised predominantly males, with similar age and rate of obesity and HTN as cluster 1 (Figure 3).

Additionally, cluster analysis blunted the overlap in patients (Figure 1). Of note, diabetes duration and HbA_{1c} were similar among the 3 clusters.

OUTCOMES. Follow-up data were available for 521 of the 745 (70%) patients included in the cluster analysis (follow-up duration: 67 months [interquartile range: 40 to 87 months]). The composite endpoint occurred in 56 patients (10.8%), including 3 cardiac deaths (0.6%) and 53 cardiovascular hospitalizations (10.2%). Raw event rates ranged from 4.7% (cluster 1) to 17.9% (cluster 2), and from 5.5% (isolated T2DM) to 17.5% (T2DM + obesity + HTN).

Survival analysis found significant differences across clusters for the composite endpoint (log-rank p = 0.049) (Figure 4A). Using Cox proportional hazards modeling, patients with the best prognosis were from cluster 1, whereas patients from clusters 2 and 3 shared HRs of similar magnitude (cluster 1 HR: 1.00 [reference]; cluster 2 HR: 2.37; 95% CI: 1.15 to 4.88; cluster 3 HR: 2.19; 95% CI: 1.00 to 4.82). Similar results were obtained after adjusting for age, sex, and diabetes duration (data not shown).

The presence of obesity and HTN also had an impact on composite endpoints (log-rank p = 0.02) (Figure 4B). Increasing HRs were observed with accumulating risk factors, with maximal HRs found in T2DM + obesity + HTN patients: isolated T2DM HR: 1.00 (reference); T2DM + obesity HR: 1.56; 95% CI: 0.58 to 4.19; T2DM + HTN HR: 2.25; 95% CI: 1.01 to 5.00; and T2DM + obesity + HTN HR: 3.13; 95% CI: 1.44 to 6.81. Again, similar results were found after adjusting for age, sex, and diabetes duration (data not shown).

Results from the sensitivity analysis conducted using LA area and volume (n = 462) are shown in Online Tables 3 and 4 for cardiac and clinical features and in Online Figures 2 and 3 for principal

TABLE 3 Cardiac Phenotypes According to Patient Clusters

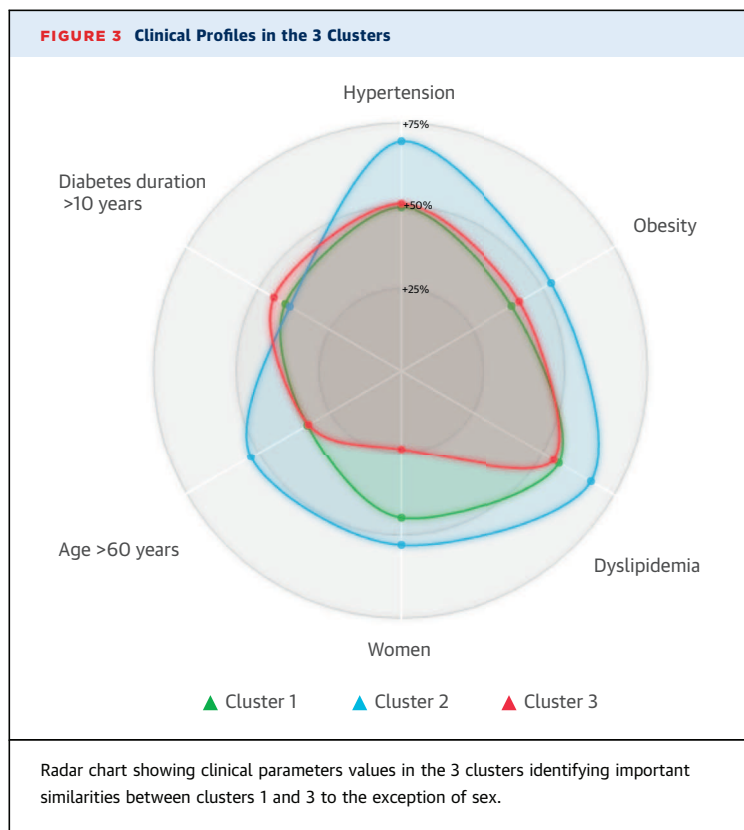
Echocardiographic Characteristics	Cluster 1 (n = 319)	Cluster 2 (n = 266)	Cluster 3 (n = 160)	p Value for ANOVA*
LVMI, g/m ²	81.7 ± 18.0	92.4 ± 25.8†	99.5 ± 23.7††	<0.0001
LVEDV, ml	72.0 ± 17.1	72.0 ± 19.9	107.1 ± 20.2††	<0.0001
LVEDVi, ml/m ²	37.2 ± 7.6	36.8 ± 8.8	54.1 ± 8.6††	<0.0001
LVESV, ml	23.0 ± 7.4	24.7 ± 9.1†	42.1 ± 9.9††	<0.0001
LVESVi, ml/m ²	11.9 ± 3.3	12.6 ± 4.2†	21.3 ± 4.6††	<0.0001
LVEF, %	68.1 ± 5.8	66.1 ± 6.1†	61.8 ± 5.7††	<0.0001
Basal longitudinal strain, %	-20.0 ± 2.5	-21.1 ± 3.5†	-19.4 ± 2.4††	<0.0001
E/A ratio	1.0 ± 0.3	0.9 ± 0.3†	1.1 ± 0.3‡	<0.0001
e' mean, cm/s	9.2 ± 2.1	5.5 ± 1.4†	8.2 ± 1.9††	<0.0001
E/e' mean ratio	8.6 ± 2.4	14.0 ± 7.3†	10.2 ± 2.5††	<0.0001
LA area, cm ² (n = 462)	16.7 ± 2.9	17.6 ± 3.5†	17.6 ± 3.2‡	0.011
LA volume index, ml/m ² (n = 312)	45.2 ± 11.1	45.4 ± 12.1	51.3 ± 14.2††	0.0003

Values are mean ± SD. *Bold results are statistically significant at the p < 0.05 level. Sidak correction: †p < 0.05 compared to cluster 1; ‡p < 0.05 compared to cluster 2. Abbreviations as in Table 2.

TABLE 4 Clinical Phenotypes According to Patient Clusters

	Cluster 1 (n = 319)	Cluster 2 (n = 266)	Cluster 3 (n = 160)	p Value*
Clinical characteristics				
Age, yrs	55.7 ± 9.0	60.0 ± 8.9†	56.3 ± 8.3‡	<0.0001
Females	143 (44.8)	141 (53.0)	38 (23.8)††	<0.0001
Diabetes duration, yrs	9.6 ± 7.6	9.2 ± 7.6	10.0 ± 7.5	0.550
BMI, kg/m ²	29.6 ± 5.0	31.1 ± 5.0†	29.9 ± 5.1‡	0.001
Obesity	125 (39.2)	141 (53.0)†	67 (41.9)	0.003
HTN	158 (49.5)	185 (69.5)†	81 (50.6)‡	<0.0001
Dyslipidemia	166 (55.7)	103 (66.9)	77 (53.8)	0.036
Current smokers	68 (21.9)	94 (35.9)†	44 (27.7)	0.001
Retinopathy/neuropathy	81 (25.5)	47 (17.8)	47 (29.6)‡	0.013
Group				
Isolated T2DM	104 (32.6)	45 (16.9)†	52 (32.5)‡	<0.0001
T2DM + obesity	57 (17.9)	36 (13.5)	27 (16.9)	
T2DM + HTN	90 (28.2)	80 (30.1)	41 (25.6)	
T2DM + obesity + HTN	68 (21.3)	105 (39.5)	40 (25.0)	
Hemodynamics				
Heart rate, beats/min	74.3 ± 12.1	80.2 ± 13.4†	71.1 ± 10.6††	<0.0001
SBP, mm Hg	131.3 ± 16.4	138.7 ± 17.5†	135.9 ± 18.3†	<0.0001
DBP, mm Hg	77.5 ± 10.9	81.5 ± 10.1†	78.3 ± 10.0‡	<0.0001
Biochemistry				
HbA _{1c} , %	7.5 ± 1.5	7.7 ± 1.5	7.4 ± 1.2	0.064
HDL cholesterol, mmol/l	1.2 ± 0.3	1.3 ± 0.4†	1.2 ± 0.3‡	0.001
LDL cholesterol, mmol/l	2.8 ± 0.9	2.7 ± 0.9	2.6 ± 0.8	0.161
Triglycerides, mmol/l	1.7 ± 1.5	2.0 ± 1.7	1.7 ± 1.2	0.047
eGFR, ml/min/1.73 m ²	91.8 ± 22.5	83.4 ± 22.4†	91.9 ± 23.9‡	<0.0001
BNP, ng/ml	24.0 (9.0-25.0)	25.0 (19.0-25.0)	21.0 (10.0-34.0)	0.981
Medications				
Metformin	239 (74.9)	183 (68.8)	117 (73.1)	0.249
Insulin	86 (27.0)	76 (28.6)	53 (33.1)	0.370
ACE inhibitor or ARB	163 (51.1)	155 (58.3)	87 (54.4)	0.222

Values are mean ± SD, n (%), or median (interquartile range), unless otherwise indicated. *Bold results are statistically significant at the p < 0.05 level. Sidak correction: †p < 0.05 compared to cluster 1; ‡p < 0.05 compared to cluster 2. Abbreviations as in Table 1.



component analysis and biplot and survival analysis, respectively. Findings were remarkably close to those obtained from the main analysis, identifying 3 clusters with similar key characteristics. Kaplan-Meier survival curves revealed similar trends, although these did not reach statistical significance (log-rank $p = 0.14$; cluster 1 HR: 1.00 [reference]; cluster 2 HR: 2.25; 95% CI: 0.99 to 5.17; cluster 3 HR: 1.82; 95% CI: 0.72 to 4.56).

DISCUSSION

In a large prospectively enrolled group of asymptomatic T2DM patients free of overt heart disease, we applied an innovative approach using cluster analysis to identify clusters of patients with homogeneous cardiac phenotypes and sought to determine whether these clusters were associated with distinct clinical profiles and outcomes (Central Illustration). Whereas statistical analysis, based on a priori risk factor groups, resulted in a substantial overlap of the echocardiographic variables, cluster analysis was able to distinguish 3 groups on the basis of echocardiography-related cardiac phenotype. Clinical characteristics varied between these clusters, with phenotypes associated not only with obesity

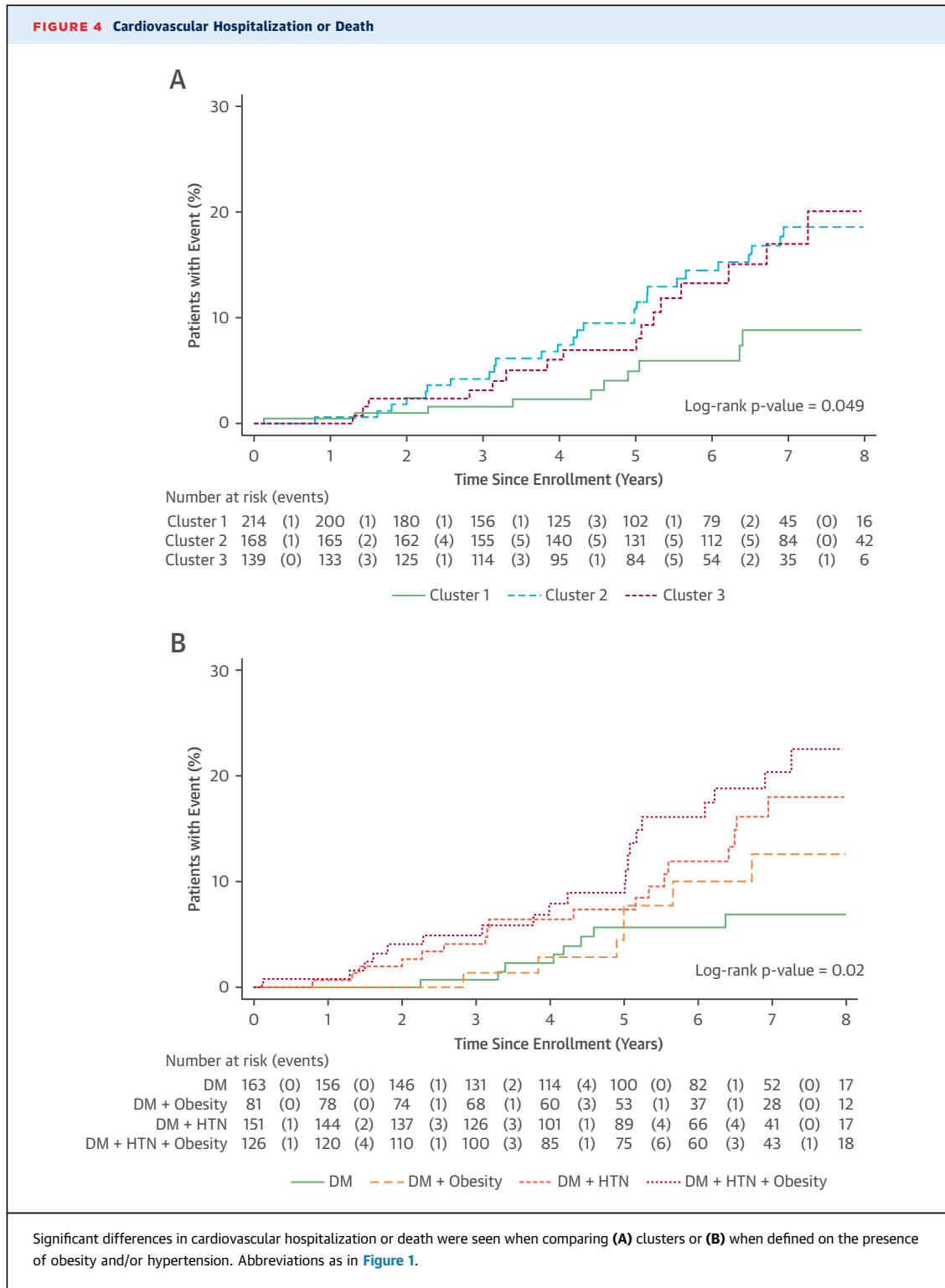
and HTN but also with age, sex, or microvascular complications.

T2DM is an independent risk factor for HF (7,8). In asymptomatic T2DM patients with normal LVEF, subclinical myocardial disease includes increased LV mass (10,35,36) and diastolic dysfunction (37-39), and decreased myocardial strain (12,13). However, T2DM patients are heterogeneous in terms of age, sex, diabetes duration, and associated cardiovascular risk factors, such as obesity or HTN. In this context, interpretation of echocardiographic data in everyday clinical practice in T2DM patients is challenging with regard to the respective impact of these confounders on cardiac abnormalities. Indeed, the coexistence of HTN, obesity, and T2DM has made it difficult to isolate the contribution of the glucometabolic state to myocardial dysfunction, and whether this myocardial dysfunction is triggered by T2DM rather than the synergistic action of these risk factors is debated. This is the first application of cluster analysis to identify distinct cardiac phenotypes in T2DM and to relate these to clinical features and outcomes. Our findings underscored the variety of cardiac profiles in T2DM and the need for improving the detection of subclinical LV dysfunction. Interestingly, using classic statistical analysis, based on a priori hypothesis, we were not able to discriminate patients with “isolated” T2DM (without obesity or HTN) and T2DM patients with obesity and HTN on LV systolic parameters, such as LVEF or longitudinal strain. Furthermore, the distribution of all echocardiographic parameters showed a major overlap between those predefined groups of T2DM patients.

As opposed to classic statistical analysis, cluster analysis is an exploratory technique that provides tools to identify unknown subgroups in order to classify individuals with similar characteristics in the same group (or cluster) and individuals with distinct characteristics into different clusters (25).

In our study, cluster 1 was mostly characterized by the lowest LVMI, the most favorable diastolic parameters with the lowest LA area and E/e' values, and the highest LVEF. Strain values were the second highest among clusters. This cluster represented the most favorable clinical profile, with the youngest patients and the lowest rate of obesity or HTN. This low comorbidity subset had the best prognosis compared to the 2 other clusters.

Cluster 2 cardiac phenotype was characterized by the highest strain values but the lowest e' velocities and the highest E/e' ratio. These patients were the oldest and were predominantly female with the highest prevalence of associated cardiovascular risk



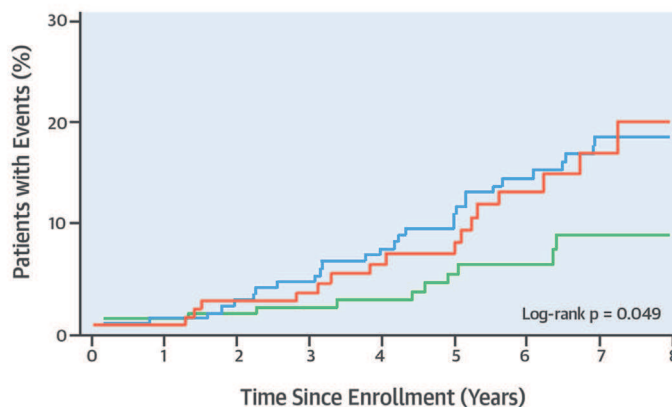
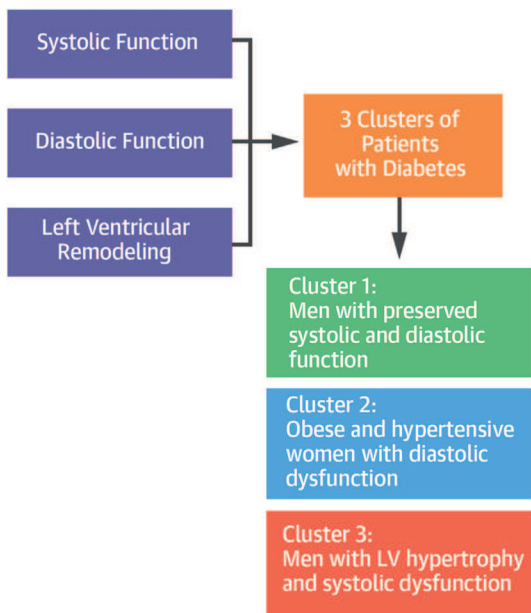
factors. This elderly diastolic dysfunction group had a worse prognosis than cluster 1.

Cluster 3 was an interesting group. Patients shared a similar clinical presentation of younger age

and prevalent associated cardiovascular risk factors to cluster 1 but had a similar prognosis to cluster 2.

Hypertrophy and systolic dysfunction was the unifying phenotype.

CENTRAL ILLUSTRATION Cardiac Phenotypes in Diabetes by Cluster Analysis



Ernande, L. et al. *J Am Coll Cardiol.* 2017;70(14):1704-16.

Cluster analysis was performed on echocardiographic values to assess whether an association existed between cardiac phenotypes in patients with type 2 diabetes with clinical profiles and subsequent outcomes. The analysis identified 3 clusters as described, including predominance of echocardiographic values in each. After median follow-up of 67 months, patients in cluster 1 had the lowest rates of the composite endpoint of cardiovascular mortality and hospitalization. e' lateral = early diastolic velocity at the lateral site of the mitral annulus; E/A = ratio between peak early and late diastolic velocities; E/e' = ratio between early mitral inflow velocity and mitral annular early diastolic velocity; LVEDVi = left ventricular end-diastolic volume indexed to body surface area; LVEF = left ventricular ejection fraction; LVESVi = left ventricular end-systolic volume indexed to body surface area.

Thus, our cluster analysis highlighted the prognostic value of LV remodeling and subclinical systolic dysfunction in T2DM, despite similar clinical profiles of obesity and HTN. This suggested that patients with low strain and/or increased LV mass might be suitable for targeted preventive strategies. These data were in line with previous reports of the association between decreased longitudinal strain and impaired exercise capacity (40), LV remodeling (15), and all-cause mortality (17) in T2DM patients.

Our cluster analysis also supported the finding that diastolic abnormalities commonly observed in T2DM are worsened when HTN and obesity coexist, as in cluster 2. Diastolic function impairment has previously been considered as the first marker of diabetic cardiomyopathy (11,16,37). However, diastolic dysfunction is also related to confounding factors, such as age, obesity, or HTN (38). The clinical profile of cluster 2 reinforced those data, showing the association of the lowest e' velocities

and the highest E/e' ratio with highest age, blood pressure levels, BMI, and heart rate compared with the 2 other clusters and confirmed the higher risk of HF and death in T2DM patients with diastolic dysfunction (16). It is also remarkable that cluster 2 (mainly women with predominant LV diastolic dysfunction) identified a greater susceptibility of women to cardiovascular impact of T2DM because this cluster presented a prognosis similar to cluster 3 (men with LV hypertrophy and systolic dysfunction) and worse than cluster 1 (men with preserved systolic and diastolic function). This was in line with previous data from the population of the Framingham Heart Study, which highlighted how the relative impact of diabetes on cardiac remodeling (41) and cardiovascular adverse events were greater for women than for men (42). Our data suggested, therefore, that clinicians should pay more attention to the follow-up of diabetic female patients, especially when LV remodeling or diastolic dysfunction is present.

STUDY LIMITATIONS. The study population comprised patients recruited into 2 different cohorts. However, those 2 cohorts were well-phenotyped, presented similar inclusion and exclusion criteria, and were prospectively collected in experienced centers. The heterogeneity of the respective study populations reinforced the relevance of our cluster analysis. However, echocardiographic parameters relating to LA size were associated with high missing rates, precluding their direct use for building the clusters. Nonetheless, a sensitivity analysis using those features in a subsample of 462 patients found very similar results for cardiac and clinical phenotypes, reinforcing the robustness of our findings. Finally, a low rate of major cardiac events occurred during follow-up, probably related to the inclusion of a very low-risk population by excluding overt cardiac diseases.

CONCLUSIONS

Cluster analysis of echocardiographic variables identified 3 phenotypes among patients with T2DM, underscoring that despite similar clinical profiles, patients with an echocardiographic phenotype characterized by the highest LV mass index and volumes and the lowest LVEF and strain are at higher cardiovascular risk. These findings confirmed the key role of echocardiography to early detect subtle systolic

myocardial abnormalities and to better identify echocardiographic phenotypes in T2DM.

ACKNOWLEDGMENTS The authors are grateful to the staff of the Centre d'Investigation Clinique 0201, Louis Pradel Hospital, who helped in recruiting the patients and collecting the data.

ADDRESS FOR CORRESPONDENCE: Dr. Geneviève Derumeaux, Institut Mondor de Recherche Biomedicale, Unité Inserm 955-équipe 8, Faculté de médecine de Créteil, 8, rue du Général Sarrail, 94000 Créteil, France. E-mail: gderumeaux@gmail.com.

PERSPECTIVES

COMPETENCY IN MEDICAL KNOWLEDGE: Compared to younger patients without obesity or HTN who have normal LV geometry and function, 2 clusters of patients with T2DM are at higher risk for cardiovascular hospitalization or death: 1) obese, elderly women with hypertension and diastolic dysfunction; and 2) men with LV hypertrophy and systolic dysfunction.

TRANSLATIONAL OUTLOOK: Future studies should evaluate the mechanisms of adverse events in patients with T2DM who have these high-risk characteristics and the impact of specific cardioprotective interventions on survival.

REFERENCES

- Cheng S, Xanthakis V, Sullivan LM, et al. Correlates of echocardiographic indices of cardiac remodeling over the adult life course: longitudinal observations from the Framingham Heart Study. *Circulation* 2010;122:570-8.
- Turkbey EB, McClelland RL, Kronmal RA, et al. The impact of obesity on the left ventricle. *J Am Coll Cardiol* 2010;3:266-74.
- Gidding SS, Liu K, Colangelo LA, et al. Longitudinal determinants of left ventricular mass and geometry the coronary artery risk development in young adults (CARDIA) Study. *Circ Cardiovasc Imaging* 2013;6:769-75.
- Heckbert SR, Post W, Pearson GDN, et al. Traditional cardiovascular risk factors in relation to left ventricular mass, volume, and systolic function by cardiac magnetic resonance imaging: the Multiethnic Study of Atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 2006;48:2285-92.
- Kishi S, Armstrong AC, Gidding SS, et al. Association of obesity in early adulthood and middle age with incipient left ventricular dysfunction and structural remodeling. *J Am Coll Cardiol HF* 2014;2:500-8.
- de Simone G, Devereux RB, Chinali M, et al. Diabetes and incident heart failure in hypertensive and normotensive participants of the Strong Heart Study. *J Hypertens* 2010;28:353-60.
- Rydén L, Grant PJ, Anker SD, et al. ESC Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD: the Task Force on Diabetes, Pre-diabetes, and Cardiovascular Diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and developed in collaboration with the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Eur Heart J* 2013;34:3035-87.
- Yancy C, Jessup M, Bozkurt B, et al. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on practice guidelines. *J Am Coll Cardiol* 2013;62:e147-239.
- Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, et al. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J* 2016;37:2129-200.
- Devereux RB, Roman MJ, Paranicas M, et al. Impact of diabetes on cardiac structure and function: the strong heart study. *Circulation* 2000;101:2271-6.
- Galderisi M. Diastolic dysfunction and diabetic cardiomyopathy: evaluation by Doppler echocardiography. *J Am Coll Cardiol* 2006;48:1548-51.
- Ernande L, Rietzschel ER, Bergerot C, et al. Impaired myocardial radial function in asymptomatic patients with type 2 diabetes mellitus: a speckle-tracking imaging study. *J Am Soc Echocardiogr* 2010;23:1266-72.
- Fang ZY, Yuda S, Anderson V, Short L, Case C, Marwick TH. Echocardiographic detection of early diabetic myocardial disease. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:611-7.
- Ng ACT, Delgado V, Bertini M, et al. Findings from left ventricular strain and strain rate imaging in asymptomatic patients with type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 2009;104:1398-401.
- Ernande L, Bergerot C, Girerd N, et al. Longitudinal myocardial strain alteration is associated with left ventricular remodeling in asymptomatic patients with type 2 diabetes mellitus. *J Am Soc Echocardiogr* 2014;27:479-88.
- From AM, Scott CG, Chen HH. The development of heart failure in patients with diabetes

- mellitus and pre-clinical diastolic dysfunction: a population-based study. *J Am Coll Cardiol* 2010; 55:300-5.
17. Holland DJ, Marwick TH, Haluska BA, et al. Subclinical LV dysfunction and 10-year outcomes in type 2 diabetes mellitus. *Heart* 2015;101:1061-6.
 18. Colosia A, Khan S, Palencia R. Prevalence of hypertension and obesity in patients with type 2 diabetes mellitus in observational studies: a systematic literature review. *Diabetes Metab Syndr Obes* 2013;6:327-38.
 19. Ng M, Fleming T, Robinson M, Thomson B, Graetz N, Margono C. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* 2014;384:766-81.
 20. Marwick TH, Gillebert TC, Aurigemma G, et al. Recommendations on the use of echocardiography in adult hypertension: a report from the European Association of Cardiovascular Imaging (EACVI) and the American Society of Echocardiography (ASE). *Eur Heart J Cardiovasc Imaging* 2015;16:577-605.
 21. Wong CY, O'Moore-Sullivan T, Leano R, Byrne N, Beller E, Marwick TH. Alterations of left ventricular myocardial characteristics associated with obesity. *Circulation* 2004;110:3081-7.
 22. Narayanan A, Aurigemma GP, Chinali M, Hill JC, Meyer TE, Tighe DA. Cardiac mechanics in mild hypertensive heart disease: a speckle-strain imaging study. *Circ Cardiovasc Imaging* 2009;2:382-90.
 23. Sera F, Jin Z, Russo C, et al. Ambulatory blood pressure control and subclinical left ventricular dysfunction in treated hypertensive subjects. *J Am Coll Cardiol* 2015;66:1408-9.
 24. Derumeaux G, Ichinose F, Raheer MJ, et al. Myocardial alterations in senescent mice and effect of exercise training: a strain rate imaging study. *Circ Cardiovasc Imaging* 2008;1:227-34.
 25. Völzke H, Schmidt CO, Baumeister SE, et al. Personalized cardiovascular medicine: concepts and methodological considerations. *Nat Rev Cardiol* 2013;10:308-16.
 26. Jellis CL, Stanton T, Leano R, Martin J, Marwick TH. Usefulness of at rest and exercise hemodynamics to detect subclinical myocardial disease in type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 2011;107:615-21.
 27. European Society of Hypertension-European Society of Cardiology Guidelines Committee. 2003 European Society of Hypertension-European Society of Cardiology guidelines for the management of arterial hypertension. *J Hypertens* 2003;21:1011-53.
 28. Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, Greene T, Rogers N, Roth D. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. *Ann Intern Med* 1999;130:461-70.
 29. Lang RM, Badano LP, Mor-Avi V, et al. Recommendations for cardiac chamber quantification by echocardiography in adults: an update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *J Am Soc Echocardiogr* 2015;28:1-39.
 30. Nagueh S, Appleton C, Gillebert T, et al. Recommendations for the evaluation of left ventricular diastolic function by echocardiography. *Eur J Echocardiogr* 2009;10:165-93.
 31. Nagueh S, Smiseth O, Appleton A, Byrd B, Dokainish H, Edvardsen T. Recommendations for the evaluation of left ventricular diastolic function by echocardiography: an update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *J Am Soc Echocardiogr* 2016;29:277-314.
 32. Gabriel KR. The biplot graphic display of matrices with application to principal component analysis. *Biometrika* 1971;58:453-67.
 33. Ward JJ. Hierarchical grouping to optimize an objective function. *J Am Stat Assoc* 1963;58:236-44.
 34. Charrad M, Ghazzali N, Boiteau V, Niknafs A. NbClust: an R package for determining the relevant number of clusters in a data set. *J Stat Softw* 2014;61:1-36.
 35. Chirinos JA, Segers P, De Buyzere ML, et al. Left ventricular mass: allometric scaling, normative values, effect of obesity, and prognostic performance. *Hypertension* 2010;56:91-8.
 36. Devereux RB, Pickering TG, Harshfield GA, et al. Left ventricular hypertrophy in patients with hypertension: importance of blood pressure response to regularly recurring stress. *Circulation* 1983;68:470-6.
 37. Poirier P, Bogaty P, Garneau C, Marois L, Dumesnil JG. Diastolic dysfunction in normotensive men with well-controlled type 2 diabetes: importance of maneuvers in echocardiographic screening for preclinical diabetic cardiomyopathy. *Diabetes Care* 2001;24:5-10.
 38. Ernande L, Bergerot C, Rietzschel ER, et al. Diastolic dysfunction in patients with type 2 diabetes mellitus: is it really the first marker of diabetic cardiomyopathy? *J Am Soc Echocardiogr* 2011;24:1268-75.
 39. Sharp ASP, Tapp RJ, Thom SAM, et al. Tissue Doppler E/E' ratio is a powerful predictor of primary cardiac events in a hypertensive population: an ASCOT substudy. *Eur Heart J* 2010;31:747-52.
 40. Kosmala W, Jellis C, Marwick T. Exercise limitation associated with asymptomatic left ventricular impairment: analogy with stage B heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2015;27:257-66.
 41. Galderisi M, Anderson KM, Wilson PW, Levy D. Echocardiographic evidence for the existence of a distinct diabetic cardiomyopathy (the Framingham Heart Study). *Am J Cardiol* 1991;68:85-9.
 42. Kannel WB, McGee DL. Diabetes and cardiovascular disease. The Framingham study. *JAMA* 1979;241:2035-8.
-
- KEY WORDS** diabetic cardiomyopathy, diabetic heart disease, myocardial strain, prognosis, subclinical myocardial disease
-
- APPENDIX** For supplemental tables and figures as well as a video, please see the online version of this article.

III. De l'obésité à l'adiposité : rôle du tissu adipeux ectopique

1) Rôle du tissu adipeux et conséquences de l'obésité

Depuis la fin des années 1940, le tissu adipeux est considéré comme étant le principal responsable du développement des pathologies cardiovasculaires chez le sujet obèse. Dans un premier temps il était considéré comme un acteur passif, puis au cours du temps, la communauté scientifique a découvert que le tissu adipeux avait des propriétés intrinsèques et extrinsèques, lui conférant le statut d'organe endocrine à part entière. Nous allons donc détailler dans ce chapitre les différentes hypothèses physiopathologiques entre obésité (excès de tissu adipeux) et dysfonction cardiaque.

a) Altérations hémodynamiques liées à l'excès de tissu adipeux

L'excès de tissu adipeux est associé à des modifications hémodynamiques décrites précédemment(11) et respiratoires (figure 14)(10). La résultante d'une augmentation de l'adiposité est la majoration du volume de distribution sanguin et donc du volume d'éjection VG, et en parallèle d'une augmentation des résistances vasculaires. La résultante de ces 2 phénomènes est une augmentation du débit cardiaque responsable lui-même d'une dilatation des cavités cardiaques gauches et droites avec hypertrophie VG excentrique et hypertrophie ventriculaire droite (VD). Ce remodelage VG est responsable d'une dysfonction diastolique constante et d'une dysfonction systolique inconstante, mais dont la conséquence est le développement d'une insuffisance cardiaque, dysfonction VG entraînant à son tour une hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) retentissant sur le VD. De façon parallèle à ce cercle vicieux cardiovasculaire, l'excès de tissu adipeux est également impliqué dans des désordres respiratoires comme les apnées du sommeil et le syndrome obésité-hypoventilation, troubles ventilatoires responsables d'une hypoxémie chronique majorant l'HTAP et donc la souffrance cardiaque.

Si les conséquences d'une élévation de l'adiposité sur le système cardiovasculaire sont bien décrites en pathologie humaine, le mécanisme précis permettant le développement progressif d'une cardiomyopathie métabolique est moins connu, de même que le rôle détaillé du tissu adipeux.

b) Le tissu adipeux : un organe endocrine actif

L'étude du tissu adipeux a permis de mettre en avant son rôle fondamental aussi bien dans le maintien de l'homéostasie du corps humain que dans l'initiation et la promotion de pathologies systémiques dans certaines conditions.

Le rôle principal du tissu adipeux est énergétique : Il est chargé de stocker l'énergie absorbée par le corps humain sous forme de triglycérides dans des cellules hautement spécialisées que sont les adipocytes et de libérer cette source d'énergie en cas de carence d'apport. Les substrats précurseurs sont le glucose pour la voie de la lipogenèse *de novo* et les lipides circulants qui subissent une hydrolyse et une ré-estérification dans les adipocytes. Ces cellules possèdent également l'équipement enzymatique nécessaire pour permettre en cas de déficit énergétique, la libération d'acides gras *via* le processus de lipolyse. Le stockage des lipides dans les adipocytes et leur mobilisation sont deux voies métaboliques finement régulées par l'état nutritionnel, avec un rôle primordial de l'insuline, qui stimule le stockage et inhibe la lipolyse. Si la capacité de stockage des adipocytes est dépassée, soit à cause d'un excès de substrats lipoformateurs (obésité), soit à cause d'une réduction des capacités d'expansion des cellules (lipoatrophie), les acides gras peuvent s'accumuler dans les organes périphériques (foie, muscle squelettique) et constituer des dépôts de graisse ectopique (Figure 14). Les cellules de ces organes ne sont pas capables de stocker de grande quantité de lipides et cette surcharge lipidique

entraîne une toxicité cellulaire ou « lipotoxicité » avec à terme une altération des fonctions biologiques de ces organes.

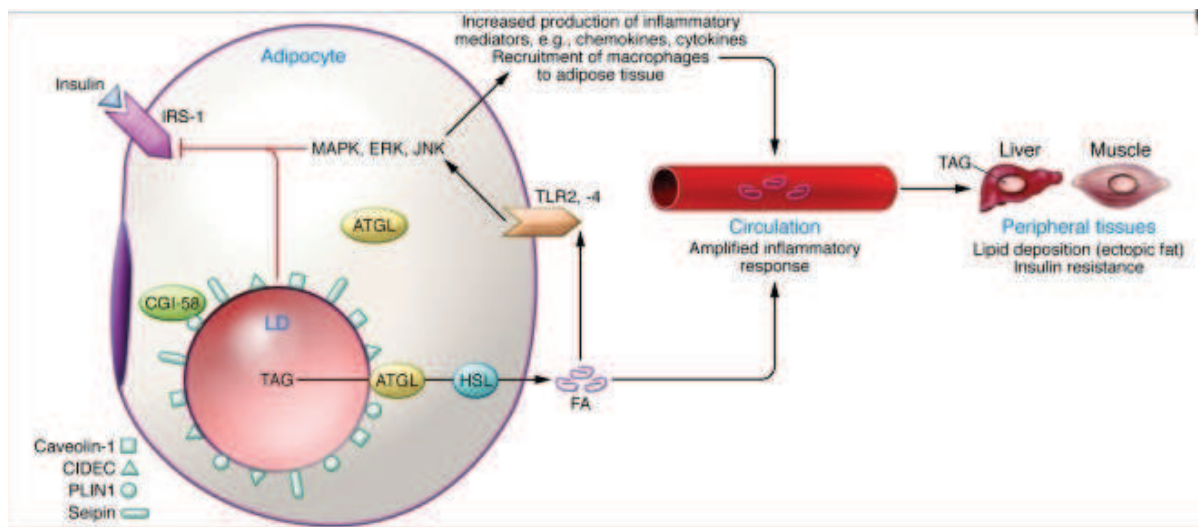


Figure 14. Altération du stockage lipidique au sein des adipocytes responsable d'une lipolyse augmentée et d'un stockage ectopique des graisses d'après Greenberg et Coleman, JCI 2011

L'une des conséquences majeures est la diminution de l'efficacité de l'insuline, qui conduit à un état d'insulino-résistance précurseur du diabète de type 2.

Par ailleurs le tissu adipeux est capable de produire et libérer dans la circulation systémique un grand nombre de molécules (> 600 molécules) dont des adipokines, constituant un véritable « sécrétome », lui permettant d'interagir à distance avec l'ensemble des organes et ainsi de participer à la régulation du métabolisme glucidique et lipidique, du système immunitaire et de la réaction inflammatoire, du processus de fibrose et du système cardiovasculaire (Figure 15). Toute anomalie structurelle et/ou fonctionnelle du tissu adipeux peut donc modifier ce sécrétome et ainsi entraîner des dysfonctionnements des différents organes avec lesquels il interagit.

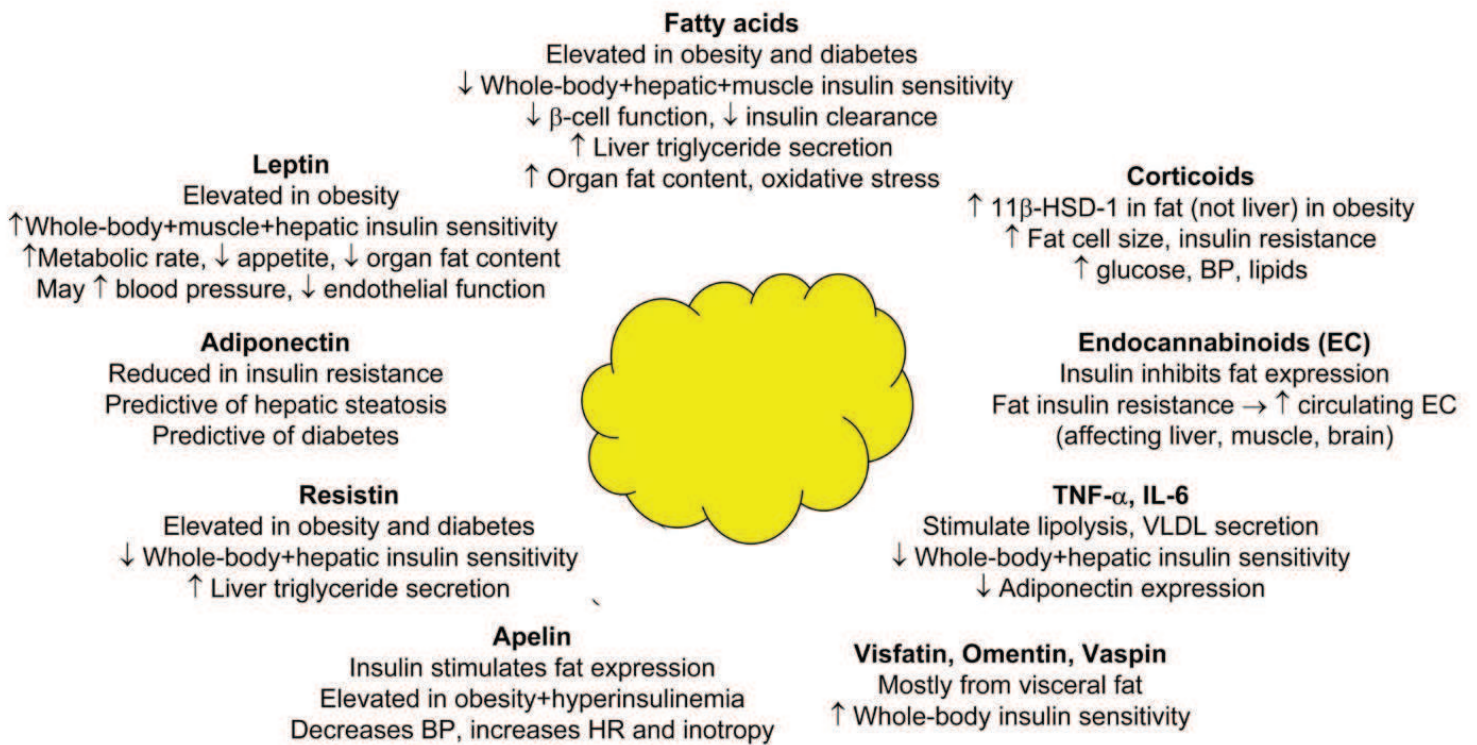


Figure 15. Principaux effets des molécules sécrétées par le tissu adipeux selon Iozzo et al. *Diabetes care*, 2009.

c) Remodelage et dysfonction du tissu adipeux

L'excès de poids qui caractérise la surcharge pondérale ou l'obésité correspond à un développement excessif du tissu adipeux au niveau sous-cutané et/ou viscéral. Cette accumulation de tissu adipeux s'appelle « adiposité » et les anomalies structurelles et fonctionnelles au sein du tissu adipeux s'appelle « adiposopathie ». Ce stockage d'excès de graisse se fait par hypertrophie adipocytaire puis par recrutement adipocytaire, essentiellement au niveau du tissu adipeux sous-cutané en raison de son importante capacité d'expansion et de néoangiogénèse et dans un moindre degré au niveau viscéral (au sein des organes et autour d'eux). En cas d'accumulation excessive de graisse comme dans l'obésité, la capacité de stockage et d'expansion au niveau sous-cutané arrive à saturation, et c'est à ce moment que débutent les conséquences du remodelage et du dysfonctionnement du tissu adipeux. La graisse en excès est alors redistribuée au niveau viscéral dans le foie, le pancréas, les muscles, le cœur et autour des différents organes intra-abdominaux et intra-thoraciques.

A cette accumulation de graisse dite ectopique, s'associe un remodelage et un dysfonctionnement du tissu adipeux ainsi que le développement d'une inflammation de bas grade. Il est reconnu que l'inflammation contribue à la pathologie du tissu adipeux et favorise la résistance à l'insuline. L'inflammation est aggravée et entretenue notamment par les macrophages pro-inflammatoires qui s'accumulent dans le tissu adipeux. Les interactions entre adipocytes et cellules immunitaires conduisent à des changements dans la libération des adipokines, des cytokines et d'acides gras non estérifiés contribuant à la mise en place d'un environnement inflammatoire.

Ainsi on observe les modifications suivantes du tissu adipeux dans le contexte d'obésité :

- Une hypertrophie et un stress adipocytaire associés à une modification du sécrétome vers des molécules pro-inflammatoire et à une activation macrophagique.
- Une dysrégulation du stockage des lipides avec augmentation des acides gras libres.

- Une hypoxie du tissu adipeux par déséquilibre entre l'expansion et la néoangiogénèse, responsable d'un stress du réticulum endoplasmique et d'une libération de substances pro-inflammatoires (IL6, Angiopoietine 4) et pro-fibrotiques (leptine).
- Une activation de l'autophagie qui peut être interprétée soit comme un mécanisme de protection de l'adipocyte avant le stade de l'apoptose, soit comme une conséquence de la dysfonction adipocytaire.
- Une infiltration de cellules immunitaires proinflammatoires de type lymphocytes B et T puis de macrophages (venant de la moelle osseuse), responsable d'une inflammation systémique chronique (augmentation du TNFalpha, IL6 et résistine). Les macrophages s'accumulent autour des adipocytes hypertrophiés pour former des « crown-like structures ».
- Une fibrose autour des adipocytes hypertrophiés.

La principale conséquence de cette adiposopathie est donc une modification du sécrétome qui devient pro-inflammatoire et pro-fibrotique, phénomène exacerbé en cas de diabète de type 2(25). Ainsi, avec l'accumulation des cellules immunitaires, le remodelage de la matrice extra cellulaire et l'accumulation de fibrose sont considérées comme la signature de la pathologie du tissu adipeux associée à l'obésité. L'importance physiopathologique de ces remaniements matriciels, plus spécifiquement en lien avec le statut glycémique et la résistance à l'insuline mais également en lien avec le développement d'une cardiomyopathie, n'est pas totalement élucidée.

L'ensemble de ces anomalies et leurs conséquences sont détaillés dans les figures 16 et 17. Les principales complications sont d'ordre métabolique, cardiovasculaire et néoplasique avec le développement d'une insulino-résistance puis d'un diabète de type 2, d'une dyslipidémie, d'une stéatose hépatique pouvant aboutir à une cirrhose métabolique, de l'athérosclérose, de cancers et de troubles androgéniques.

Si la dysfonction cardiaque dans le cadre de l'adiposité excessive a été rapportée, les mécanismes impliqués demandent encore des études notamment en ce qui concerne le rôle du tissu adipeux viscéral non épicardique.

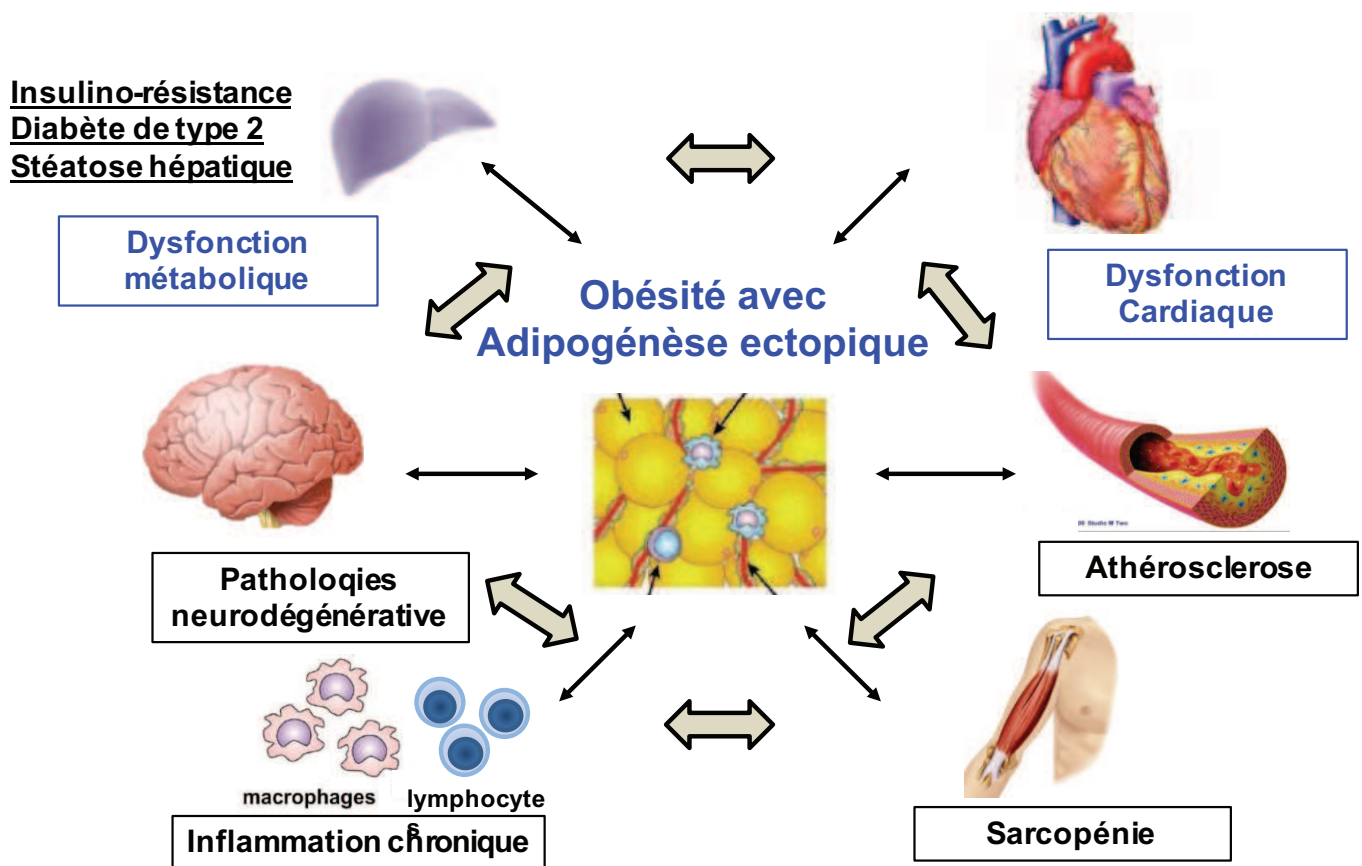


Figure 16. Conséquences de l'accumulation de graisse viscérale ectopique sur le système cardiovasculaire, métabolique, neuromusculaire et sur le système immunitaire.

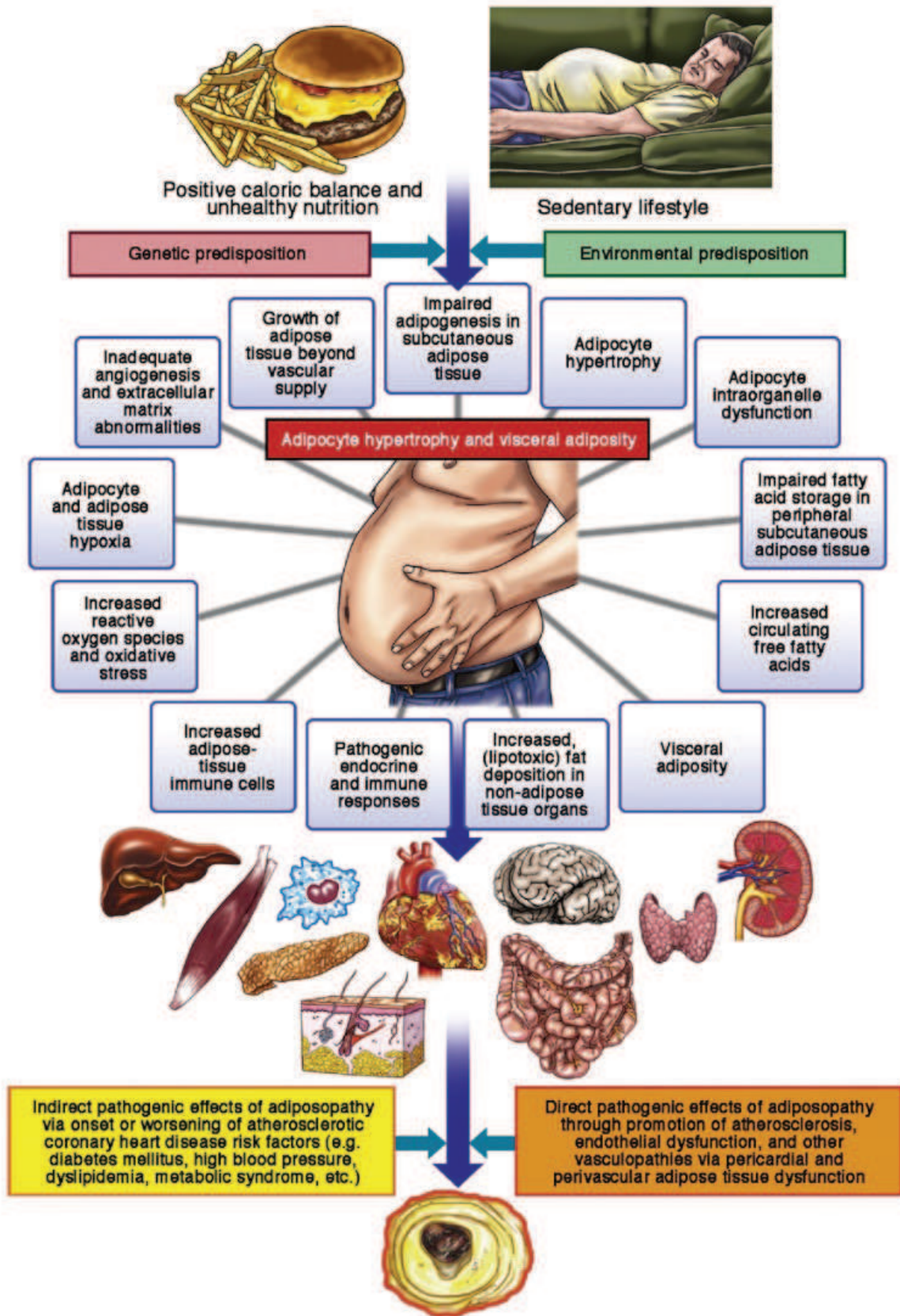


Figure 17. Ensemble des modifications du tissu adipeux et de ses conséquences chez l'homme secondaires à l'excès d'accumulation de graisse.

2) Graisse viscérale ectopique : implication dans les troubles cardiométaboliques

La répartition anatomique de l'excès de graisse plus que l'indice de masse corporelle (IMC), joue donc un rôle déterminant dans la survenue de complications de l'obésité. Alors que les travaux de Jean Vague au XX^{ème} siècle ont mis en lumière l'importance de la distribution régionale de la graisse, les travaux de Jean Pierre Després, au siècle suivant, ont introduit le concept plus général de l'ectopie. La graisse ectopique correspond à l'accumulation de graisse dans des sites anatomiques non classiquement associés au stockage de lipides(26). On distingue deux types de dépôts ectopiques : les tissus adipeux (TA) ectopiques comme le tissu adipeux épigénétique (TAE), le tissu adipeux péri-rénal, le tissu adipeux périvasculaire et l'accumulation de triglycérides dans des cellules non adipeuses ou stéatose.

Des travaux récents ont montré que le développement de la graisse dans des sites ectopiques pourrait participer aux complications de l'obésité et à la dysfonction d'organe, via des phénomènes lipotoxiques. Les mécanismes de développement de l'ectopie sont complexes et encore non complètement élucidés ; ils associent des facteurs environnementaux, génétiques et épigénétiques. Il a été montré que l'hypertrophie des adipocytes, l'inflammation du tissu adipeux, la fibrose, et l'incapacité du tissu adipeux sous-cutané à stocker le surplus d'acides gras apportés en excès (théorie de l'extensibilité) sont probablement impliqués dans l'accumulation de cette graisse(27).

a) Graisse viscérale ectopique épigénétique

Les données récentes de la littérature confirment que le tissu adipeux ectopique épigénétique présente un sécrétome pathologique pro-fibrotique et pro-inflammatoire(28-30). Les conséquences cardiaques, autre que le développement de l'athérome, de cette accumulation de

graisse ectopique et de la modification de son sécrétome sont peu connues à l'heure actuelle, notamment au niveau systémique.

Les conséquences locorégionales de ce dépôt de graisse ectopique épicaudique ont été récemment explorées notamment par les travaux de l'équipe de Stéphane Hatem qui a rapporté en 2015 les liens entre fibrose myocaudique et graisse épicaudique. Les auteurs ont décrit une fibrose myocaudique atriale 2 fois plus importante après incubation avec un milieu provenant de la graisse épicaudique, alors qu'aucune fibrose n'était retrouvée dans le milieu issu de la graisse sous-cutanée (Figure 18)(31).

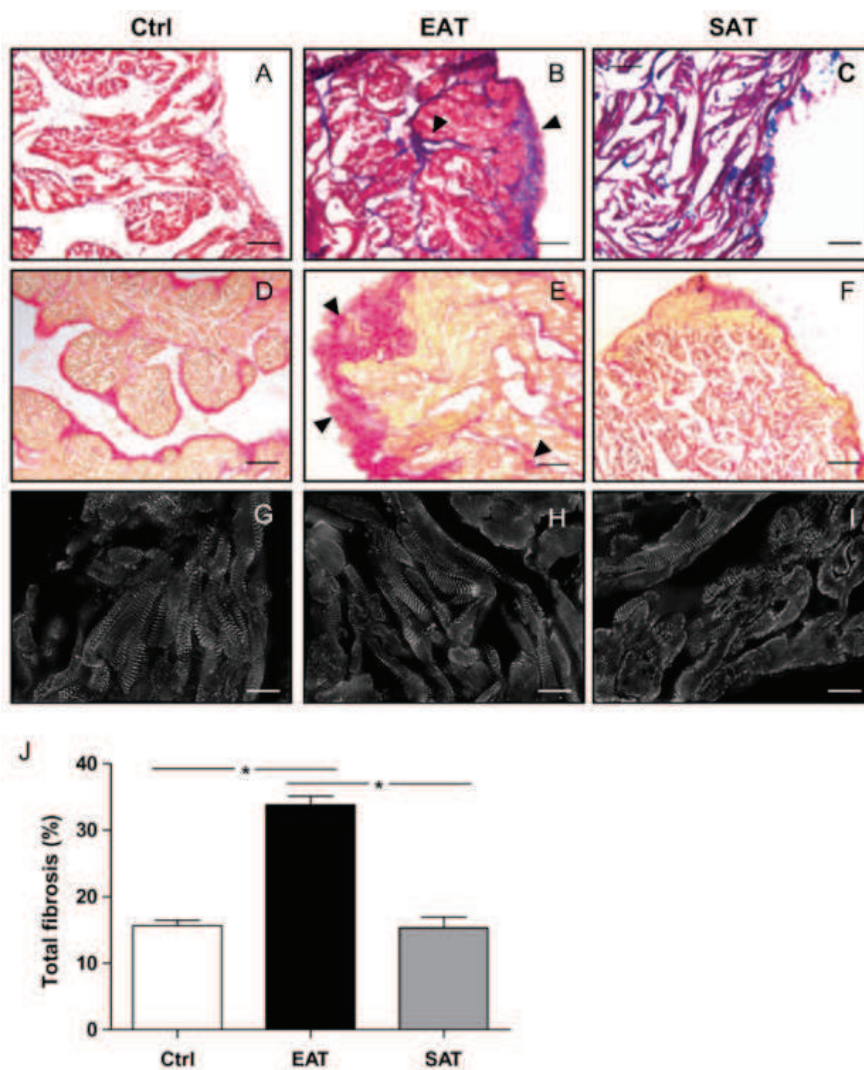


Figure 18. Analyse histologique par coloration trichrome (A-C), rouge sirius (D-F) et par immunomarquage (alpha-actine, G-I) d'oreillette de rat incubée avec un milieu neutre (Ctrl), issu de graisse épicaudique (EAT) et de graisse sous-cutanée (SAT). Venteclef N, EHJ 2015.

Cette fibrose myocardique était retrouvée au niveau endocardique, épicardique et au niveau interstitiel dans l'oreillette, et provenait d'une activation des fibroblastes probablement secondaire à la sécrétion par la graisse épicardique d'adipokines pro-fibrotiques comme l'Activine A. Cette étude met donc clairement en évidence l'action paracrine pro-fibrotique du tissu adipeux ectopique épicardique sur le myocarde. Cette interaction entre tissu adipeux épicardique et myocarde atrial semble être impliquée dans certaines pathologies cliniques comme la fibrillation atriale puisque ce même groupe a retrouvé un lien entre infiltration fibro-adipeuse épicardique et caractère chronique de la fibrillation atriale(32). L'autre observation importante de cette équipe est de souligner que le remodelage pathologique du tissu adipeux épicardique est lui-même déterminant dans ses conséquences pro-fibrosantes sur le myocarde atrial adjacent (Figure 19)

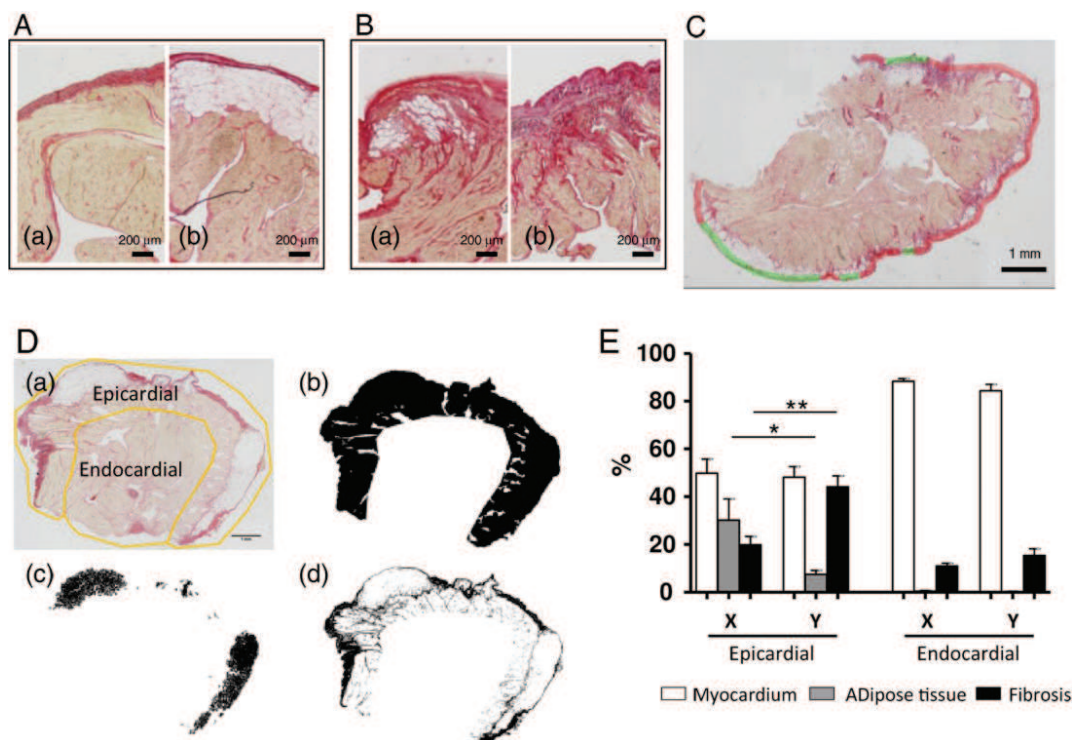


Figure 19. Liens entre remodelage fibreux de l'épicarde atrial humain et présence de tissu graisseux épicardique ainsi que remodelage du tissu adipeux épicardique d'après Haemers P, EHJ 2017.

Une autre étude s'intéressant à la graisse épigardique en imagerie a retrouvé des résultats comparables. Ainsi, Shah et al. ont quantifié le volume de graisse épigardique en scanner(33) et l'ont corrélié aux évènements cardiovasculaires à partir de la cohorte MESA. Il en résultait que pour chaque augmentation d'une déviation standard du volume de graisse épigardique, le risque d'évènement cardiovasculaire grave augmentait de 22% (Figure 20), et ce sans influence de l'âge, du sexe, de l'ethnie ou de la présence d'un diabète ou non. Par ailleurs, le volume de graisse épigardique était également corrélié à l'importance du remodelage ventriculaire gauche.

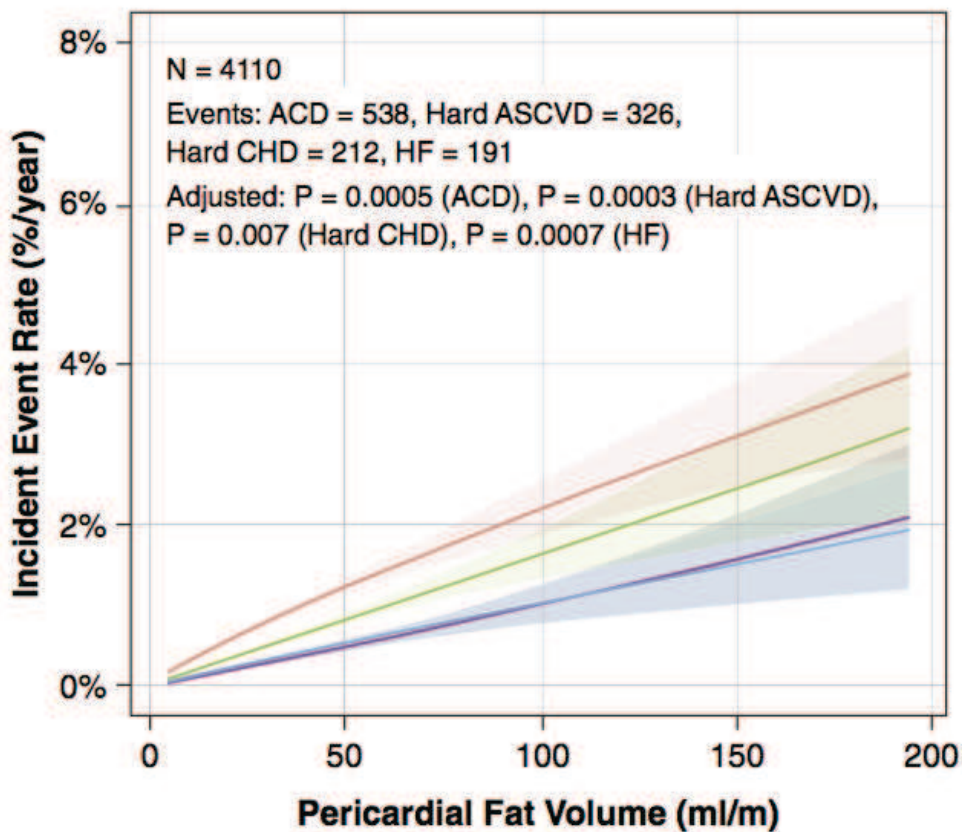


Figure 20. Pourcentage d'évènements cardiovasculaires graves incluant le décès (ACD, rouge), les évènements athérosclérotiques (Hard ASCVD, vert), la coronaropathie (Hard CHD, bleu) et l'insuffisance cardiaque (HF, violet).

La prise de poids progressive aboutissant à l'obésité a donc des conséquences importantes dans la genèse de la fibrillation auriculaire d'une part par l'induction d'un étirement des fibres myocardiques de l'oreillette associées à la dilatation progressive de l'oreillette gauche et d'autre part, par l'accumulation de graisse épicaudique induisant la sécrétion de cytokines profibrosantes (TGF = transforming growth factor et Activine A) responsables de l'infiltration du myocarde auriculaire gauche contigu par des adipocytes et du développement d'une fibrose myocardique interstitielle. La résultante de ce remodelage myocardique et du tissu adipeux est la survenue de zones de conduction lentes et inhomogènes qui sont le substrat de la fibrillation auriculaire(34) (Figure 21).

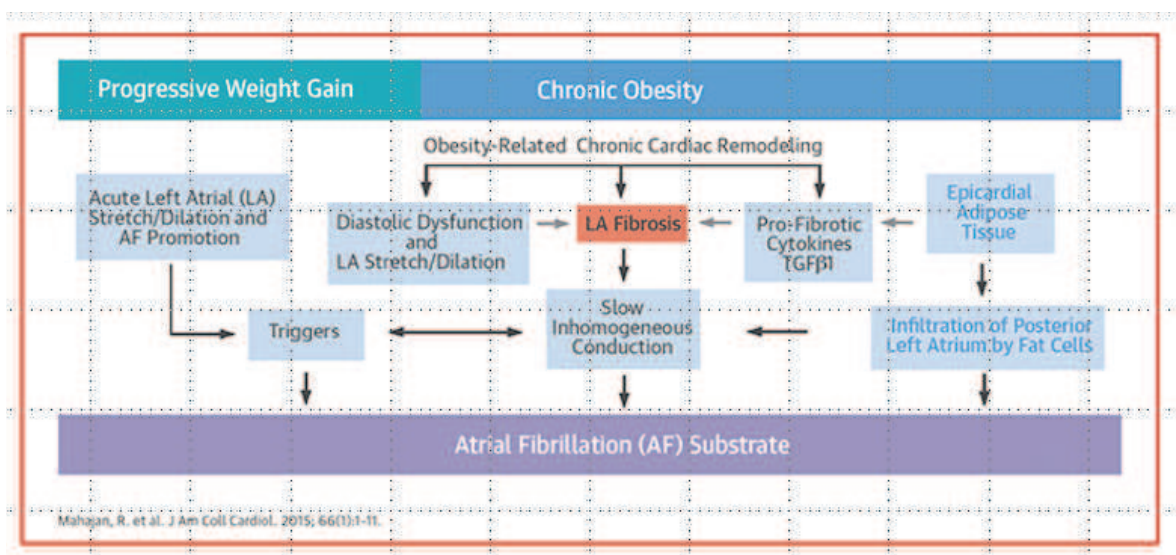


Figure 21. Schéma montrant le mécanisme physiopathologique de la survenue de fibrillation auriculaire dans le contexte d'obésité d'après Mahajan, JACC 2015.

Ces études récentes établissent donc clairement le rôle profibrosant de la graisse épicaudique (viscérale) sur le myocarde avoisinant, cependant les conséquences cardiovasculaires du tissu adipeux viscéral à distance du cœur ne sont pas bien connues.

b) Graisse viscérale ectopique intra-abdominale : l'omentum

La graisse épigastrique n'est pas l'unique zone de stockage ectopique en cas d'obésité : le foie, les muscles et surtout la graisse intra-abdominale sont également impliqués.

Comme vu précédemment, l'accumulation de graisse viscérale est responsable d'un dysfonctionnement des adipocytes qui sécrètent des cytokines pro-inflammatoires, des substances pro-fibrotiques et favorise la libération d'acides gras. Les conséquences locales et systémiques de ce dysfonctionnement sont le développement d'une insulino-résistance puis du diabète de type 2, de l'athérosclérose et potentiellement d'une dysfonction cardiaque. Dans une étude incluant des rats âgés et des rats mutés pour le récepteur tissulaire de la leptine(35), les auteurs ont confirmé que l'ablation chirurgicale de la graisse viscérale permettait de restaurer un métabolisme glucidique correct, et qu'elle était associée à une nette diminution de la transcription et du taux plasmatique de leptine. Cependant, cette amélioration n'était observée que dans le groupe où la graisse viscérale était retirée, pas dans le groupe avec ablation de la graisse sous-cutanée. Les études chez l'homme vont dans le même sens. Ainsi, Klein et al. ont démontré en 2004 que chez des patients obèses, la liposuction seule ne permettait pas d'améliorer le métabolisme glucidique, les concentrations plasmatiques en cytokines pro-inflammatoires ou en adiponectine, ni les facteurs de risque de la maladie athéromateuse(36). Au contraire, Thörne et al. a démontré en 2002 que l'adjonction d'une omentectomie à la mise en place d'un anneau gastrique chez des patients sévèrement obèses permettait d'améliorer significativement le métabolisme glucidique par rapport à l'anneau gastrique seul(37). Ces études semblent donc confirmer qu'une thérapeutique ciblée sur la graisse viscérale ectopique pourrait corriger des désordres systémiques métaboliques, alors que son action sur le système cardiovasculaire est incertaine et n'a pas été spécifiquement investiguée.

IV. Etudes précliniques sur le lien entre obésité et dysfonction cardiaque : nécessité d'un modèle animal

Devant le nombre de modèles expérimentaux reproduisant l'obésité et leurs contradictions sur le retentissement cardiovasculaire de cette obésité, il nous est apparu important au vu de la littérature de travailler dans un premier temps à l'établissement d'un modèle murin d'obésité mimant au mieux la pathologie observée chez l'homme.

En effet, le modèle expérimental de souris obèse repose principalement sur 2 méthodes :

- Soit on utilise des souris génétiquement mutées sur le gène de la Leptine, hormone de la satiété :
 - Souris ob/ob porteuses d'une mutation récessive du gène de la leptine développant une obésité sévère puis un diabète de type 2 à la 15^{ème} semaine de vie(38).
 - Souris db/db présentant une mutation du gène du récepteur de la leptine et développement d'un diabète de type 2 en 8 semaines(39).
- Soit on administre à des souris « sauvages » (ou « wild-type, WT), non modifiées génétiquement, une alimentation riche en graisse et en sucre (régime « High-Fat Diet », HFD). Les conséquences métaboliques et cardiovasculaires diffèrent en fonction du taux de l'apport calorique en lipides et de l'adjonction ou non de sucrose. En 2013, sont publiés 2 articles contradictoires dans la même revue (PLoS ONE) sur les conséquences cardiovasculaires de ce régime riche en graisse.

Dans le premier datant de mars 2013, Calligaris et al. montraient que les souris mises sous régime riche en graisse développaient un tableau d'obésité avec des troubles métaboliques à type de syndrome métabolique, et plus tardivement (vers 16 mois) des modifications cardiaques semblables à celle des patients diabétiques(40). Les principales

anomalies constatées étaient le remodelage concentrique du VG avec hypertrophie, le développement de fibrose cardiaque et la diminution de la réserve contractile myocardique lors du test à la dobutamine (Figure 22). Il est important de noter que la fonction cardiaque évaluée au repos par la fraction de raccourcissement en échocardiographie ne montrait pas de différence entre les groupes de souris obèses et non obèses.

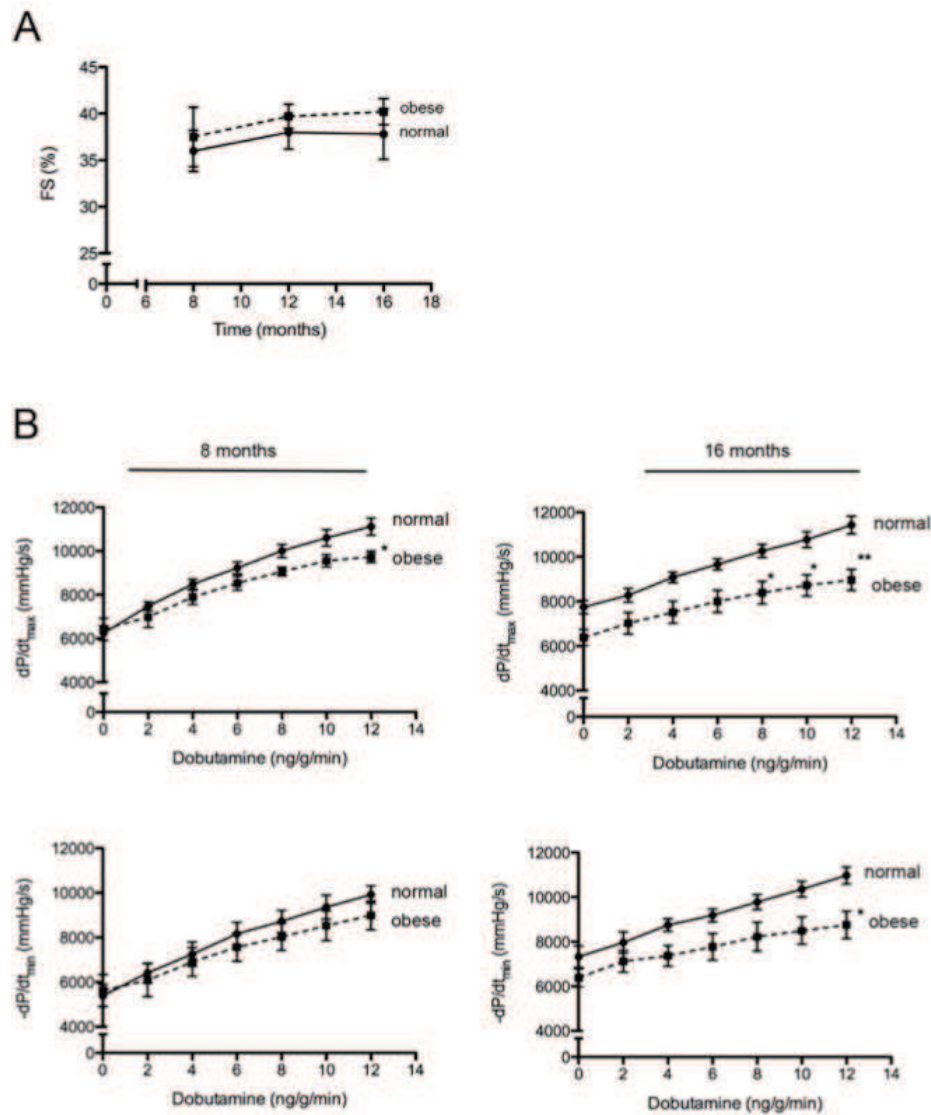


Figure 22. Fonction cardiaque évaluée chez les souris obèses et non-obèses par la fraction de raccourcissement en échocardiographie (A) et par mesure invasive sous stress à la dobutamine (B).

Le deuxième article retrouvait que le régime HFD seul n'était pas suffisant pour induire une dysfonction cardiaque, également évaluée par la fraction de raccourcissement en échocardiographie, ni pour aggraver une IC secondaire à un infarctus thérapeutique. Il faut noter que ces études ont évalué l'effet du régime riche en graisse sur le long terme (> 6 mois). Plus récemment, une étude parue dans l'*International Journal of Cardiology* retrouvait qu'un régime riche en sucre et en graisse induisait une dysfonction VG systolique (évaluée par la FEVG en échocardiographie) et diastolique (évaluée par mesure invasive de la pression télédiastolique du VG). En parallèle de cette dysfonction cardiaque, les auteurs ont retrouvé un niveau de fibrose interstitielle cardiaque plus important dans le groupe HFD (Figure 23)(41). Cette étude est intéressante car il s'agit de la première étude à évaluer les effets du régime riche en graisse à court terme (2 mois).

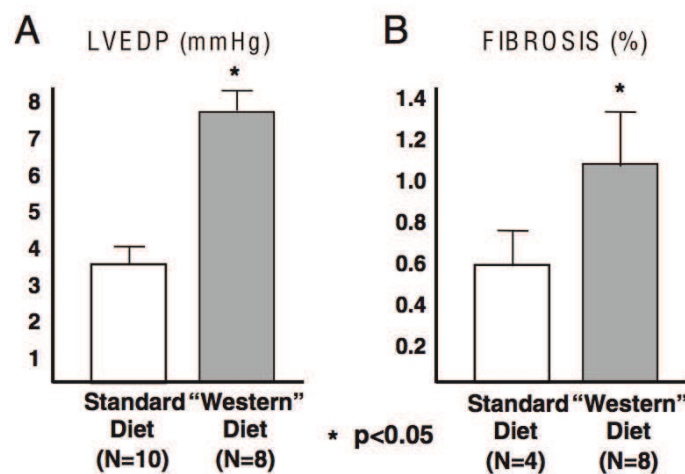


Figure 23. Différences entre les souris sous régime « normal » (standard diet) et les souris sous régime riche en sucre et en graisse (« western » diet) concernant la fonction diastolique mesurée de façon invasive (A) et concernant le pourcentage de fibrose myocardique (B).

Une autre étude de 2015 s'est intéressée à la même problématique mais en introduisant la notion de délai d'apparition des anomalies cardiaques en effectuant un suivi régulier, et a étudié la fonction cardiaque en utilisant un outil plus sensible qu'est la déformation myocardique (appelé également strain) en imagerie de résonance magnétique (IRM) (42). Afin de sensibiliser la détection d'anomalie en IRM, l'auteur avait également réalisé une épreuve de stress à la dobutamine. De façon intéressante, les souris HFD avaient une FEVG qui restait inchangée tout au long du suivi alors que la contraction VG évaluée par strain diminuait vers la 42^{ème} semaine de régime. En utilisant la dobutamine, l'auteur a démasqué cette dysfonction de façon beaucoup plus précoce.

Cette revue de la littérature met bien en exergue les résultats contradictoires des études animales portant sur le lien entre obésité et dysfonction cardiaque, certaines études réfutant même l'existence d'une cardiomyopathie associée à une obésité chronique.

Les explications à ces divergences de résultat sont multiples :

- Le modèle de la diète enrichie en graisse est important et peut ne pas avoir de conséquences cardiovasculaires en fonction de sa durée et de sa composition
- Les modalités d'exploration de la fonction cardiaque sont également très importantes. La seule évaluation de paramètres de fonction systolique globale (fraction d'éjection et pourcentage de raccourcissement VG) n'est pas suffisante pour démasquer précocement des altérations de fonction contractile. Il est donc préférable de recourir à des méthodes plus précises telles que l'imagerie de déformation myocardique. Enfin l'anesthésie est un facteur déprimant la fonction contractile du myocarde et doit être prise en compte dans l'interprétation des résultats surtout quand la fréquence cardiaque est diminuée.
- Enfin l'âge des animaux peut impacter le résultat d'un régime riche en graisse.

C'est donc en connaissance de ces données de la littérature que nous avons décidé de développer un modèle murin d'obésité afin de travailler sur le retentissement cardiovasculaire du remodelage du tissu adipeux et du développement d'un tissu adipeux ectopique viscéral.

V. Problématique et Objectif du travail de cette thèse

Comme vu précédemment, il existe un lien entre obésité et dysfonction cardiaque mais dont le délai d'apparition et les mécanismes ne sont pas bien connus, ni chez l'homme ni chez l'animal. En raison de la forte augmentation de la prévalence de l'obésité et du pronostic péjoratif des anomalies cardiaques observées, il apparaît essentiel d'identifier précocement cette cardiomyopathie métabolique et d'en comprendre les mécanismes afin d'identifier des potentielles cibles thérapeutiques.

Mon travail de recherche s'est donc porté en particulier sur les conséquences de la graisse viscérale (tissu adipeux épидидymal chez la souris) et s'est focalisé sur la cardiopathie métabolique secondaire à l'obésité selon plusieurs étapes successives.

- 1- Etablir un modèle de souris obèse afin de confirmer l'existence d'une cardiopathie métabolique, évaluer son délai d'apparition et essayer d'en dégager des mécanismes. Ma contribution a été le phénotypage cardiaque de ce modèle avec le suivi échocardiographique de ces souris et l'évaluation hémodynamique et histologique des conséquences cardiaques du régime HFD. Ce travail a donné lieu à une publication dont je suis le premier auteur dans *European Heart Journal Cardiovascular Imaging* en 2017(43).
- 2- Evaluer les anomalies induites par le régime riche en graisses au sein du tissu adipeux et de son sécrétome en utilisant le même modèle de souris,
- 3- Etudier l'effet d'interventions telles que l'exercice physique visant à corriger les conséquences délétères du régime HFD. J'ai contribué à ce travail en réalisant le phénotypage cardiaque de ces souris. L'article est en cours de finalisation pour une soumission prochaine au *Journal of American College of Cardiology*.

4- Etudier le dialogue entre tissu adipeux viscéral et cœur en caractérisant le rôle de l'ostéopontine sécrétée par le tissu adipeux dans le développement de la dysfonction cardiaque au cours du vieillissement physiologique. J'ai contribué à ce travail en réalisant le phénotypage cardiaque de ces souris. Ce travail a donné lieu à un article dont je suis deuxième auteur et qui est en révision favorable dans *Circulation*.

5- Enfin, démontrer que le régime HFD est responsable d'une sénescence cardiaque prématurée via le remodelage et la sénescence du tissu adipeux viscéral.

Ce travail est cours de finalisation et les résultats sont en cours d'analyse.

VI. Etablir un modèle murin de cardiopathie métabolique

1) Problématique

Comme détaillé précédemment, les résultats des différentes études animales sur le lien entre obésité et dysfonction cardiaque sont discordants. En lien avec la prise de poids des souris, certaines études retrouvaient un remodelage voire une dysfonction contractile du VG à court et/ou long terme alors que d'autres ne retrouvaient aucune modification cardiaque à moins d'associer une augmentation de la post charge VG (par constriction aortique) à l'obésité.

Les études établissant un lien entre surcharge pondérale et altération cardiaque utilisaient des techniques plus fines et plus sensibles d'analyse de la contractilité cardiaque comme la déformation du myocarde (strain) en IRM ou encore des épreuves de stress pharmacologiques à la dobutamine.

Nous avons donc voulu établir un modèle murin d'obésité afin d'explorer la survenue de modifications cardiaques à très court et court terme, et essayer d'identifier les mécanismes en jeu.

2) Matériel et méthode

Ce paragraphe décrit comment le modèle murin que nous avons utilisé a été établi et les différentes méthodes de recueil et d'analyse des paramètres cardiaques et métaboliques.

Pour les études ultérieures nous avons utilisé systématiquement le même modèle murin, cette partie est donc commune à nos différentes études.

a) Le modèle animal

Nous avons utilisé des souris C57/BL6J mâles (n=18) âgées de 5 mois (Laboratoire Janvier, France) qui étaient nourries durant 20 semaines soit par un régime normal (appelé chow-diet, CD, ref A0310, laboratoire Safe Diets, France), soit par un régime riche en graisse (HFD, ref D12492i, laboratoire Research Diets).

Pour avoir une analyse à très court terme des conséquences du régime HFD sur le myocarde, nous avons utilisé un groupe supplémentaire de 15 souris avec le même protocole mais exposées durant seulement 5 semaines au régime HFD avant sacrifice.

La nourriture dans le groupe CD était composée de 13.5% de lipides, 61.3% de glucides and 25.2% of protéines (2830 kcal/kg), alors que celle du groupe HFD était composée de 60% de lipides, 20% de glucose and 20% of protéines (5243 kcal/kg).

Toutes les souris étaient placées dans des cages ventilées dans une animalerie dédiée, à température (22°C) et humidité (50%) constantes avec un cycle de lumière-obscurité de 12 heures. Les souris avaient accès à l'eau et à la nourriture de façon illimitée. Durant le suivi, les souris avaient une évaluation métabolique et échocardiographique mensuelle, associée à une mesure hémodynamique in-vivo au moment du sacrifice.

Toutes nos expérimentations étaient validées par le comité d'éthique animal de l'institut français de santé et de recherche médicale (INSERM)-Unit 955, Créteil, France (ComEth 15-001).

b) Echocardiographie

Les souris ont été habituées à être manipulées régulièrement pour éviter tout stress car les échocardiographies étaient réalisées sans sédation pour éviter toute altération des paramètres cardiovasculaires secondaires aux agents anesthésiques (bradycardie, changement des conditions de charge). La fréquence cardiaque était donc proche de 600 battements par minute (BPM). Les acquisitions mensuelles ont toutes été réalisées sur un échographe Vivid 7 (GE Medical System, Horton, Norway) en utilisant une sonde linéaire dédiée de 13-MHz, et l'analyse en aveugle du régime reçu était faite sur une station de travail dédiée (EchoPac, GE Medical Systems). Les souris étaient attrapées avec précaution de la main gauche pour être mises en position décubitus dorsal afin de réaliser les acquisitions selon une coupe parasternale

petit axe sur le VG en regard des piliers musculaire de la valve mitrale. Les diamètres et les épaisseurs antérieure et postérieure du VG étaient enregistrés en mode TM (temps mouvement). En raison d'une fonction contractile VG homogène, nous avons utilisé ces données TM pour évaluer les volumes, la masse et la FE du VG. Le remodelage VG était évalué par le calcul de l'épaisseur relative et de la masse VG selon les formules suivantes :

- Epaisseur relative = épaisseur antérieure + postérieure / diamètre télé-diastolique VG (DTDVG)
- Masse VG = (épaisseur antérieure + DTDVG + épaisseur postérieure)³ - (DTDVG)³

La fonction diastolique n'a pas été évaluée en raison de sa faible fiabilité, surtout à des fréquences cardiaques aussi élevées. Nous avons évalué la relaxation VG par le dp/dt_{min} par mesure hémodynamique in-vivo.

Les valeurs de pic systolique de strain rate radial (SR) antérieur et postérieur en Doppler Tissulaire (TDI) étaient recueillis. Les boucles TDI étaient acquises selon la même vue parasternale avec un alignement optimal et à une résolution temporelle moyenne de 514 images par seconde à 1cm de profondeur. La limite de Nyquist était réglée à 12cm/s. Le pic systolique de SR radial était mesuré dans une région d'intérêt se situant à la partie moyenne de la paroi antérieure à une distance axiale de 0,6mm. En raison des faibles variations respiratoires existantes, la valeur du pic de SR radial était moyennée sur 8 cycles consécutifs. La variabilité intra-observateur évaluée sur les mêmes acquisitions à 24h d'intervalle était de $3,5\% \pm 3,4\%$.

c) Evaluation hémodynamique

Les mesures hémodynamiques in-vivo étaient réalisées juste avant le sacrifice (à 5 et 20 semaines) selon le protocole habituel. La souris était placée sur une table chirurgicale permettant l'homéothermie sous anesthésie générale par isoflurane 1,5% permettant un maintien de la ventilation spontanée. Un micro-cathéter de 1,4Fr (Millar Instruments, Houston,

USA) était introduit dans l'aorte thoracique puis dans le VG par voie carotidienne droite après un calibrage manuel. La pression artérielle systolique et diastolique, ainsi que les pressions VG en télé-systole et télé-diastole étaient mesurées. Les vitesses d'augmentation (dp/dt_{max}) et de diminution (dp/dt_{min}) des pressions VG étaient également mesurées. Les mesures étaient faites après au moins 10 min de stabilité en utilisant la concentration d'isoflurane la plus basse tolérée. Les données étaient analysées sur le logiciel IOX (EMKA, France).

d) Les tests métaboliques

Ils étaient réalisés tous les mois chez chaque souris pendant la période des 20 semaines, toujours un jour avant l'échocardiographie.

Le test de tolérance au glucose (GTT) : les souris étaient mises à jeun 7h avant le test puis elles recevaient une injection intrapéritonéale de sérum glucosé (1,5mg/g de poids corporel). Les prélèvements sanguins veineux étaient faits au niveau de la queue avant injection glucosée puis 15, 30, 60, 90 et 120 minutes après. La glycémie était mesurée à l'aide d'un glucomètre automatique (Accu-Check Performa, Roche, Allemagne).

Le test de tolérance à l'insuline (ITT) : les souris étaient mises à jeun 7h avant le test puis elles recevaient une injection intrapéritonéale d'insuline (0,5mU/g de poids corporel, Humulin R, Lilly, France). Les prélèvements sanguins veineux étaient prélevés au niveau de la queue avant injection puis 30, 60, 90 et 120 minutes après. La glycémie était mesurée à l'aide d'un glucomètre automatique (Accu-Check Performa, Roche, Allemagne).

e) Analyse histologique

La paraffine était extraite des coupes histologiques par utilisation de xylène et de dilution progressive d'éthanol. Les coupes de cœur étaient colorées par WGA (coloration de la membrane) pour évaluer la taille des cardiomyocytes ou par rouge sirius pour évaluer la fibrose

interstitielle. Les coupes de tissu adipeux étaient colorées par hématoxyline & éosine (Sigma, France) pour évaluer la taille des adipocytes. Les images de la coloration H&E et rouge sirius étaient faites sur un microscope Zeiss Axioplan 2. L'immunofluorescence était faite à l'aide d'un microscope à fluorescence Zeiss Imager M2. La taille des cardiomyocytes et des adipocytes était calculée sur une moyenne de 200 à 300 cellules. Pour la fibrose interstitielle, 3 à 6 images représentatives par animal étaient analysées. Toutes les valeurs étaient mesurées via le logiciel ImageJ (NIH).

f) Evaluation de l'apoptose

L'apoptose était détectée par la méthode TUNEL sur des coupes de cœur incluse en paraffine. Les épitopes étaient retirés par un bain à 90°C pendant 10 minutes. Après un blocage de la peroxydation de 15 minutes à l'H₂O₂, les tissus étaient plongés dans une solution tampon et traités avec de la terminal deoxynucleotidyl transferase pour détecter les noyaux TUNEL-positif (Alexa Fluor 488 conjugated), comme suggéré par le fabricant (Roche, Meylan, France). Les cardiomyocytes et les cellules interstitielles étaient colorées avec un anticorps primaire anti-Troponine I (Abcam, UK) suivi d'une incubation pendant 1h à température ambiante avec un anticorps secondaire anti-lapin couplé à du fluor (Alexa Fluor 555, Invitrogen, France). La fluorescence était mesurée avec le microscope à fluorescence Zeiss Imager M2 et quantifiée à partir d'images numériques via le logiciel ImageJ (NIH).

g) Analyse du stress oxydatif

La peroxydation des lipides myocardiques était évaluée par mesure du taux de malondialdéhyde (MDA) au travers de la mesure de la quantité de substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique (TBARS). En résumé, Les cœurs étaient pulvérisés avec un mortier et un pilon en utilisant de l'azote liquide et 25-30 mg de cette poudre ont été mélangés avec 2 volumes de

trichloroacétate glacé à 10%. Les prélèvements étaient ensuite soniqués deux fois pendant 30 secondes suivi d'une filtration à travers une aiguille de 21 G (au moins 6 fois) avant centrifugation à 13000 t/min à +4°C pendant 5 minutes. Une portion du surnageant était mis en réaction avec un volume équivalent de 0.67% d'acide thiobarbiturique à 100°C pendant 10 minutes. La concentration en TBARS, correspondant au MDA, était alors calculée.

h) Analyse Luminex

Elle permet l'analyse simultanée d'un grand nombre de biomarqueurs plasmatiques en utilisant une base multiplexe avec un outil Bio-Plex 200 (Bio-Rad), selon les recommandations du fabricant. Nous avons mesuré le TGFβ1 et 2, la C Réactive Protéine (CRP), la leptine et l'adiponectine.

3) Résultats

Les principaux résultats de cette étude sont que le régime riche en graisse induit :

- 1) des troubles métaboliques associés à un remodelage du tissu adipeux,
- 2) une dysfonction myocardique précoce et un remodelage progressif, et
- 3) des modifications systémiques responsables d'une fibrose interstitielle myocardique, d'une inflammation, d'un stress oxydatif et d'une majoration de l'apoptose.

Sur le plan métabolique, les souris du groupe HFD grossissaient plus et avaient dès 5 semaines une intolérance au glucose en comparaison avec les souris du groupe CD. Ces anomalies métaboliques étaient associées à un remodelage du tissu adipeux associant hypertrophie adipocytaire et recrutement de macrophages péri-adipocytaires formant des « crown-like structures » dès 5 semaines. Il est intéressant de noter que dans le groupe CD, il existait également un remodelage, moins marqué, du tissu adipeux qui était uniquement lié à l'âge (Figure 24).

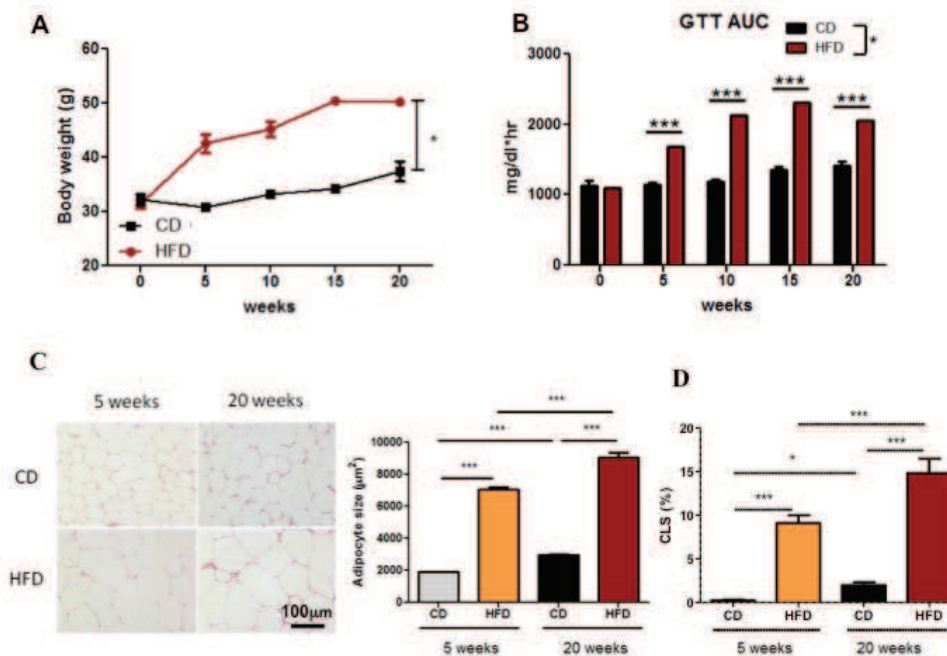


Figure 24. Anomalies métaboliques observées au cours du régime HFD et CD. Evolution du poids des souris (A), du test de tolérance au glucose (B), du remodelage des adipocytes (C) et de l'infiltration des macrophages en crown-like structures (D).

Sur le plan cardiaque, les souris du groupe HFD développaient de façon précoce à 5 semaines une dysfonction systolique et diastolique en SR radial et en mesure in-vivo (dP/dt_{max} et dP/dt_{min}), alors qu'aucune modification précoce n'était retrouvée par la mesure de la FEVG. Cette dysfonction était encore plus marquée à 20 semaines. A noter qu'aucune variation de la pression aortique pouvant expliquer ce résultat n'était retrouvée. Là encore, on retrouvait également une altération de la fonction myocardique liée à l'âge dans le groupe CD mais plus tardive et moins marquée que dans le groupe HFD (Figure 25). A cette dysfonction s'associait un remodelage VG progressif avec une hypertrophie myocardique associée à une hypertrophie des cardiomyocytes précoce, et une dilatation VG tardive.

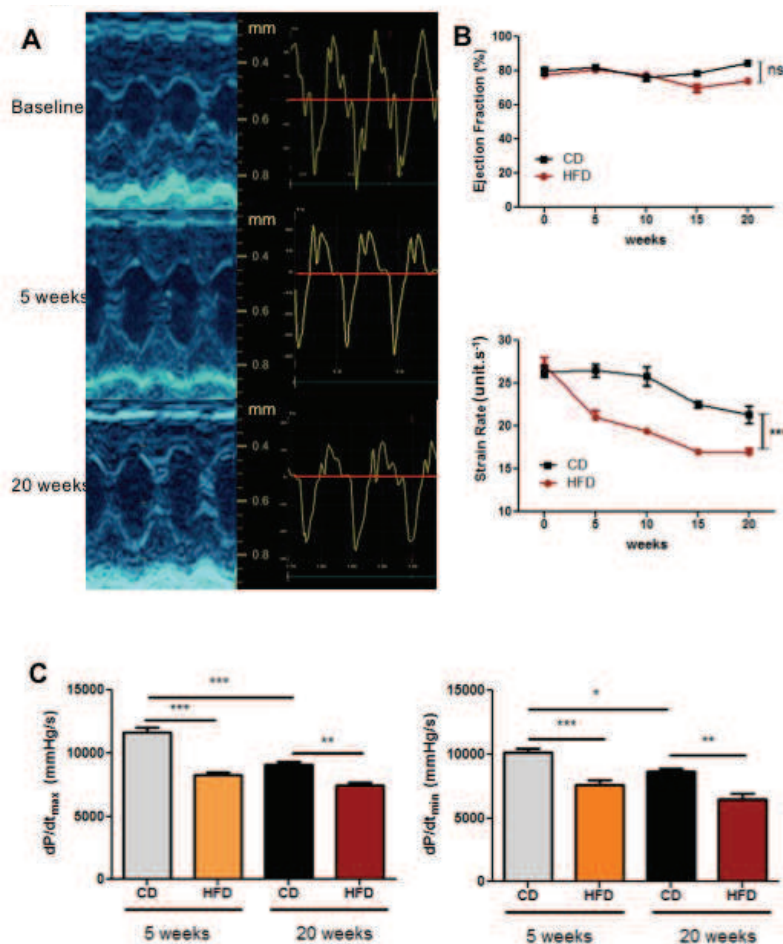


Figure 25. Evaluation de la fonction cardiaque par FEVG et SR radial en échocardiographie (A) et par dP/dt_{max} et dP/dt_{min} en mesure invasive in-vivo (B).

Il est important de noter que la dysfonction systolique VG était indépendante du remodelage comme en témoignent les rapports entre SR radial et masse, RWT ou diamètres VG (Figure 26).

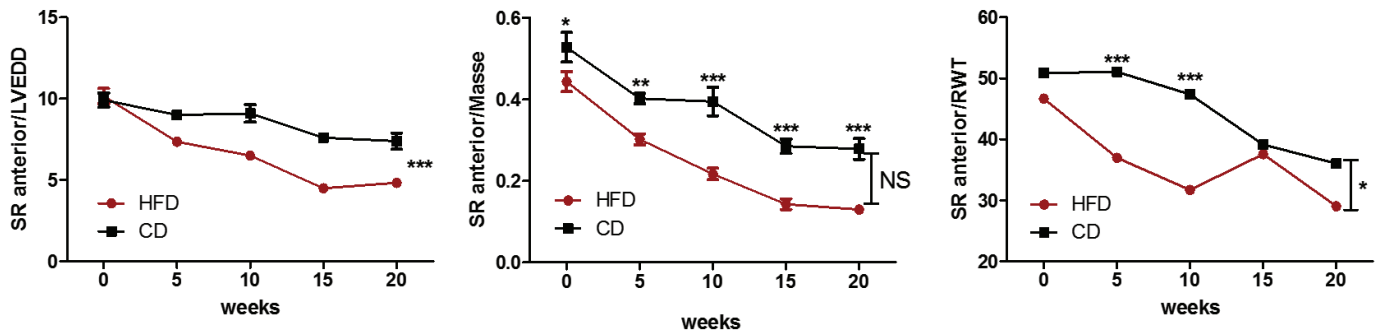


Figure 26. Evaluation de la fonction systolique VG par strain rate selon le remodelage VG.

De façon intéressante, la fibrose myocardique interstitielle retrouvée dans les deux groupes était plus importante à 20 qu'à 5 semaines et plus importante dans le groupe HFD que CD. De plus, elle était corrélée à la fonction myocardique évaluée en SR radial (Figure 27).

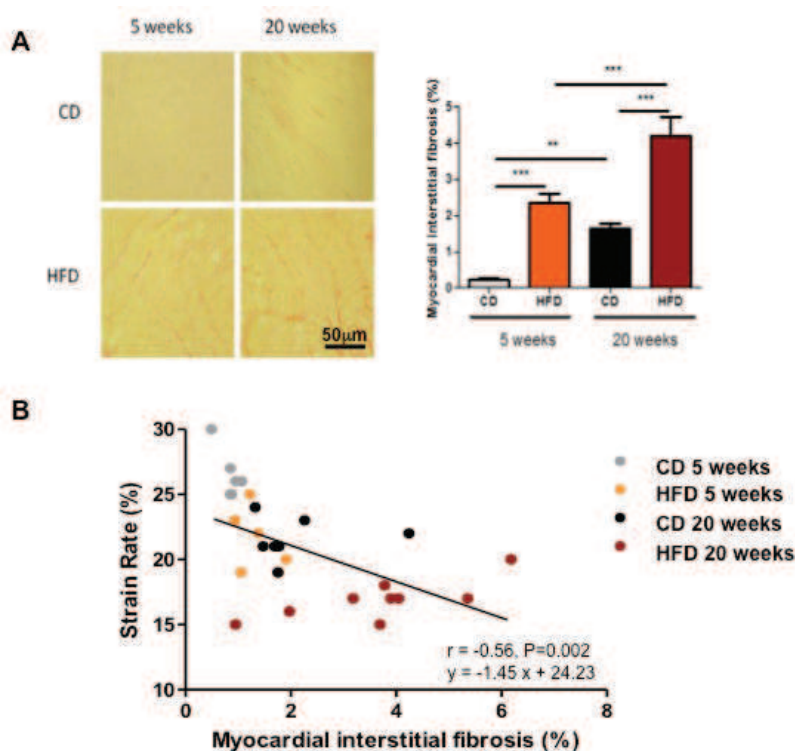


Figure 27. Quantification de la fibrose myocardique interstitielle (A) et corrélation entre le pourcentage de fibrose et la valeur de SR radial (B).

Enfin, la dysfonction et la fibrose myocardique retrouvée dans le groupe HFD étaient concomitantes d'une augmentation de la leptine et du TGF β 1, sans augmentation de l'adiponectine (Figure 28).

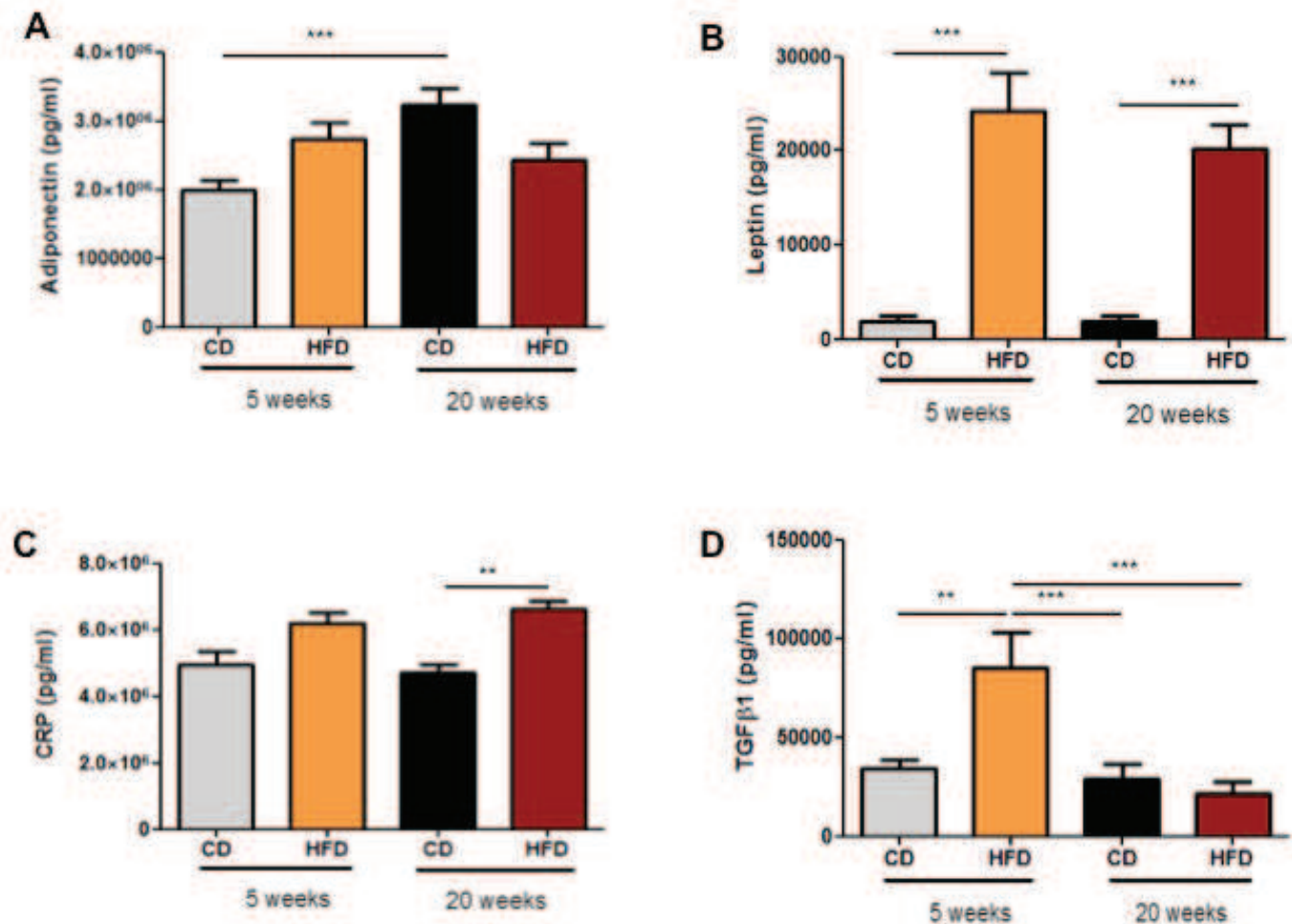


Figure 28. Dosage plasmatique des biomarqueurs profibrotiques (leptine et TGF β 1), antifibrotique (adiponectine), et inflammatoire (CRP).

On observait également une infiltration macrophagique myocardique croissante avec l'âge mais plus importante dans le groupe HFD, une apoptose et un stress oxydatif précoce également plus marqués dans le groupe HFD (Figure 29). Enfin, le niveau de CRP était plus élevé dans le groupe HFD que CD à 20 semaines.

En analyse multivariée, la masse VG, la leptine et l'infiltration macrophagique du myocarde étaient indépendamment associés à l'altération du SR radial.

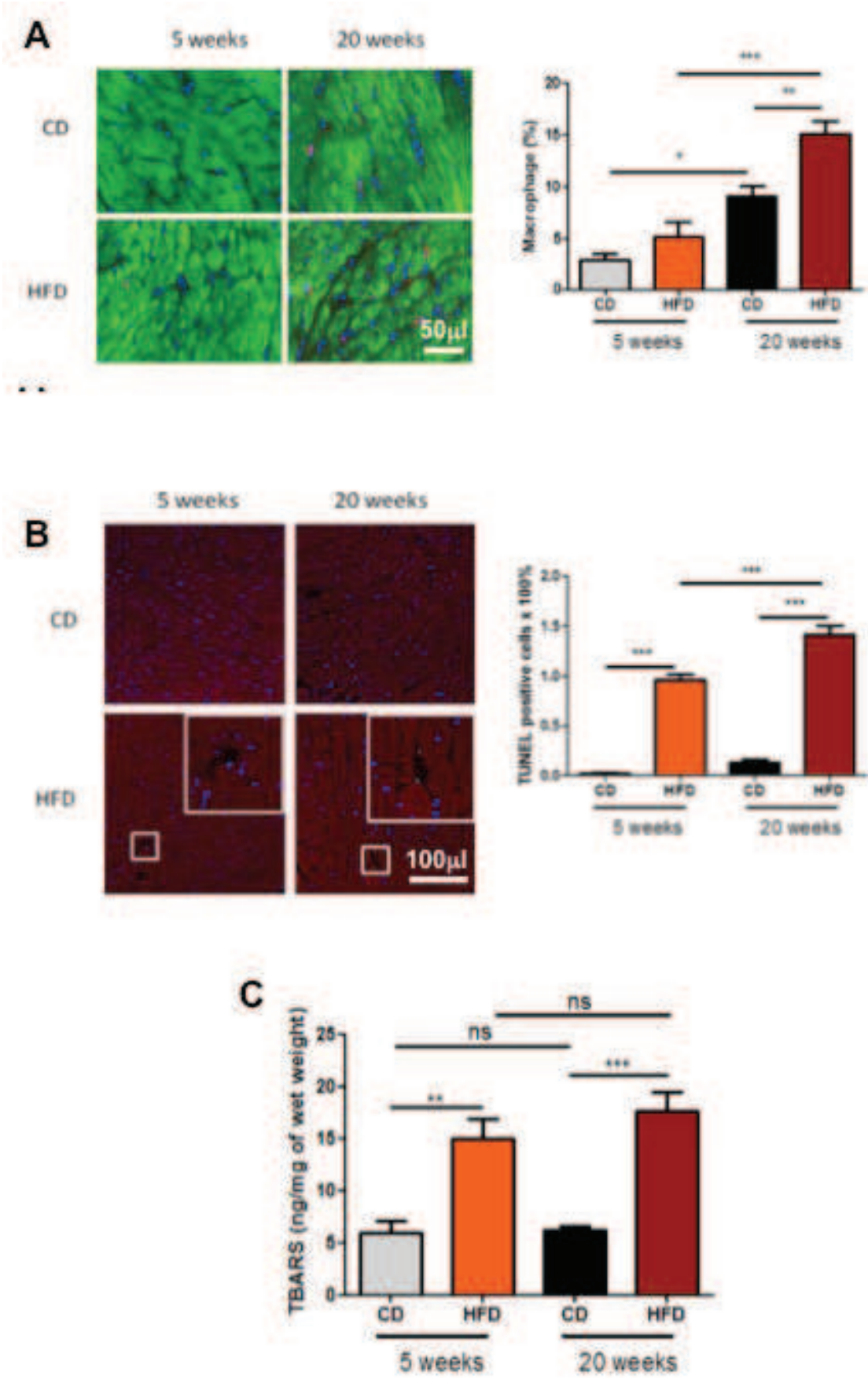


Figure 29. Evaluation de l'infiltration myocardique en macrophage (A), et du niveau d'apoptose (B) et de stress oxydatif (C) myocardique.

4) Discussion

Les principaux résultats sont donc l'apparition dans le groupe des souris obèses d'une dysfonction cardiaque précoce potentiellement en rapport avec un processus pro-fibrotique, associée à des troubles métaboliques et à un remodelage précoce du tissu adipeux.

Tout d'abord, nous avons confirmé que l'obésité induisait une dysfonction myocardique précoce qui se majore avec le temps. Le fait d'avoir à la fois une dysfonction cardiaque précoce qui s'aggravait avec le temps dans le groupe HFD et une dysfonction cardiaque plus tardive et moins marquée dans le groupe CD permettait de mettre en évidence l'effet délétère additionnel du régime HFD sur le processus de vieillissement physiologique. C'était d'ailleurs un des buts de notre étude que d'évaluer l'effet respectif du vieillissement et du régime HFD sur le cœur et c'est afin de répondre à cette question que nous avons sélectionné des souris d'âge intermédiaire (5 mois) et non pas des souris jeunes (2 mois).

En ce qui concerne les outils d'évaluation de la fonction cardiaque, seuls le SR radial et les mesures invasives permettaient de mettre en évidence cette dysfonction myocardique précoce alors que la FEVG était normale, d'où l'importance de choisir des techniques sensibles comme le strain. Notre équipe a été pionnière dans le développement de l'imagerie de déformation en échocardiographie dans les modèles murins et avait validé l'apport du SR dans d'autres modèles murins explorant les conséquences du vieillissement physiologique ou les effets délétères sur le myocarde de la surcharge en pression ou de l'ischémie/reperfusion(44-47).

Cette étude permet de confirmer son utilité pour détecter des anomalies précoces dans un modèle d'obésité. De plus, les échocardiographies étaient réalisées sur des souris non séditées en raison du risque de dépression hémodynamique et/ou myocardique, et donc du risque de masquer des différences de fonction myocardique entre les deux groupes.

Ensuite, nous avons essayé d'identifier le rôle du tissu adipeux viscéral parmi les mécanismes impliqués dans cette dysfonction cardiaque. L'étude du tissu adipeux a permis d'identifier un

remodelage précoce associant hypertrophie des adipocytes et infiltrat de cellules inflammatoires (macrophages) avec en parallèle le développement d'une intolérance au glucose et d'un profil plasmatique profibrotique avec augmentation de la leptine et du TGF β 1 sans modification significative de l'adiponectine. En effet, le niveau de leptine est associé à l'hypertrophie VG, la fibrose myocardique et l'apoptose, alors que l'adiponectine protège de l'inflammation et du stress oxydatif (7).

L'analyse dès 5 semaines de régime HFD a permis ainsi de montrer une augmentation précoce de substances profibrotiques qui s'accompagnait d'un remodelage et d'une fibrose myocardique précoce, elle-même corrélée au niveau de fonction systolique évaluée par SR radial. De façon intéressante l'augmentation des taux plasmatiques de TGF β était retrouvée à 5 semaines et semble donc indiquer une sécrétion très précoce de cytokines profibrosantes par le tissu adipeux viscéral. Cette observation donne lieu actuellement à une analyse spécifique du sécrétome du tissu adipeux au cours du régime HFD afin d'étudier la dynamique de la sécrétion des adipokines et cytokines profibrosantes et proinflammatoires.

Il existe donc un parallèle entre remodelage du tissu adipeux, perturbation métaboliques et dysfonction myocardique au cours de l'obésité, qui se surajoute au processus de vieillissement physiologique.

Cependant il s'agit d'un modèle murin et il n'est pas possible de transposer directement ces résultats chez l'humain (HFD = 60% de graisse). Cette étude souligne donc la nécessité d'identifier de façon précoce ces anomalies cardio-métaboliques chez le patient obèse ainsi que d'en disséquer les mécanismes impliqués pour éventuellement identifier des cibles thérapeutiques qui seront préalablement testées chez l'animal.

Short-term high-fat diet compromises myocardial function: a radial strain rate imaging study

Julien Ternacle^{1,2†}, Feng Wan^{1†}, Daigo Sawaki¹, Mathieu Surenaud^{1,3}, Maria Pini¹, Raquel Mercedes¹, Laura Ernande^{1,4}, Etienne Audureau⁵, Jean-Luc Dubois-Rande^{1,2}, Serge Adnot^{1,4}, Sophie Hue^{1,3}, Gabor Czibik¹, and Genevieve Derumeaux^{1,2*}

¹INSERM U955, Université Paris-Est Créteil (UPEC), 51 Av de Lattre de Tassigny, 94100 Créteil, France; ²AP-HP, Department of Cardiology, Henri Mondor Hospital, DHU-ATVB, Créteil, France; ³AP-HP Vaccine Research Institute (VRI), Créteil F-94010, France; ⁴AP-HP, Department of Physiology, Henri Mondor Hospital, DHU-ATVB, Créteil, France; and ⁵AP-HP, Public Health Department, Henri Mondor Hospital, DHU-ATVB, Créteil, France

Received 13 October 2016; editorial decision 30 November 2016; accepted 1 December 2016; online publish-ahead-of-print 6 January 2017

Aim

Long-term high-fat diet (HFD) induces both cardiac remodelling and myocardial dysfunction in murine models. The aim was to assess the time course and mechanisms of metabolic and cardiac modifications induced by short-term HFD in wild-type (WT) mice.

Methods and results

Thirty-three WT mice were subjected to HFD (60% fat, $n = 16$) and chow diet (CD, 13% fat, $n = 17$). Metabolic and echocardiographic data were collected at baseline and every 5 weeks for 20 weeks. Invasive haemodynamic data and myocardial samples were collected at 5 and 20 weeks. Echocardiographic data included left ventricular (LV) diameters and thickness, and systolic function using radial strain rate (SR). Histological assessment of cardiomyocyte and adipocyte sizes, interstitial fibrosis, and apoptosis index were performed. During follow-up, body weight, and glycaemia levels were higher in HFD than in CD mice, in association with an early adipose tissue remodelling. Despite no difference between both groups in blood pressure and LV mass at 5 weeks, an early LV dysfunction was observed in HFD mice as assessed by radial SR (21 ± 0.8 vs. 27 ± 0.8 unit/s, $P < 0.001$) and haemodynamic assessment. During follow-up, both groups demonstrated a progressive systolic and diastolic LV dysfunction and remodelling including dilatation and hypertrophy, which were more severe in HFD mice. Compared with CD mice, the early LV impairment in HFD mice was coupled with a higher cardiomyocyte apoptosis level (0.95 vs. 0.02%, $P < 0.05$) associated with an interstitial fibrosis process (2.3 vs. 0.2%, $P < 0.05$), which worsen during follow-up.

Conclusion

The HFD promoted early metabolic and cardiac dysfunctions, and adipose and myocardial tissues remodelling.

Keywords

cardiomyopathy • strain rate imaging • high-fat diet • obesity

Introduction

Obesity epidemic related to sedentary life and hypercaloric diet, affects all ages, genders, and socioeconomic classes. Obesity is associated with numerous pathologies including diabetes and cardiovascular diseases^{1,2} and will be a major contributor to cardiovascular mortality and morbidity in the 21st century.^{3,4}

Obesity produces a variety of cardiac structural changes and haemodynamic alterations leading to a clinical syndrome known as obesity

cardiomyopathy.⁵ Early recognition of obesity cardiomyopathy is crucial in order to prevent patients from subsequent pathological consequences such as adverse cardiac remodelling, heart failure, arrhythmias, or death.⁶ For a better understanding of obesity cardiomyopathy, several animal models have been studied, including wild type (WT) and genetically modified mice on high-fat (HFD) and/or high-sucrose diet feeding.

However, it is still unclear whether an HFD is sufficient to induce myocardial dysfunction in obesity murine models with conflicting data existing in the literature.

* Corresponding author. Tel: +33 1 49 81 28 10; Fax: +33 1 49 81 26 67. E-mail: genevieve.derumeaux@inserm.fr

† These authors contributed equally to the study.

Published on behalf of the European Society of Cardiology. All rights reserved. © The Author 2017. For permissions, please email: journals.permissions@oup.com.

Indeed, some studies report no adverse effect of HFD on LV structure or function by echocardiography or haemodynamic measurements after 6 weeks of HFD⁷ and even longer duration^{8,9} but only a reduction of contractile reserve under a dobutamine challenge⁸ while others have demonstrated a significant impairment in LVEF in the absence of changes in systemic blood pressure and fasting glucose levels within 4 weeks of the initiation of HFD.¹⁰

Growing evidence demonstrates that deformation imaging can identify LV dysfunction earlier than conventional methods in the clinical setting of metabolic disorders.^{11,12} In murine models, our group has demonstrated that strain rate (SR) has the ability to detect subtle abnormalities despite normal LVEF and is well correlated with haemodynamic parameters of contractility such as elastance and dP/dt_{\max} .¹³

We aimed (i) to study the short-term effects of HFD-induced obesity in C57/BL6 adult mice on cardiac function as assessed by systolic radial SR and *in vivo* haemodynamic measurements; (ii) to understand the pathological alterations that may underlie myocardial dysfunction.

Methods

Animal models

Five-month old male C57/BL6J mice ($n = 18$, Janvier Labs, France) were fed with chow diet (CD) ($n = 10$, CD, A0310, Safe Diets, France) or high-fat diet (HFD) ($n = 8$, HFD, D12492i, Research Diets, Inc) for 20 weeks. In addition, in order to assess the short-term effects of HFD on myocardial function, 15 additional mice were sacrificed after 5 weeks of CD ($n = 7$) or HFD ($n = 8$).

The control diet, CD was composed of 13.5% of fat, 61.3% of carbohydrate, and 25.2% of protein (total energy content: 2830 kcal/kg), whilst HFD consisted of 60% of fat, 20% of carbohydrate, and 20% of protein (total energy content: 5243 kcal/kg). All mice were housed in individually ventilated cages in a dedicated animal facility at a constant temperature (22°C) and humidity (50%), with a 12-h light–dark cycle and unrestricted access to food and water. During follow-up, animals underwent a monthly metabolic and echocardiographic evaluation. Before sacrifice, all animals underwent *in vivo* haemodynamic measurements. All animal experiments were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the French National Institute of Health and Medical Research (INSERM)-Unit 955, Créteil, France (ComEth 15-001).

Echocardiography

Mice were trained to be grasped because transthoracic echocardiography (TTE) was performed in non-sedated mice in order to avoid any cardiac depressor effect of anaesthetic agents. Typical heart rates at recording were above 600 bpm. Mice were carefully caught by the left hand and placed in supine position. Data acquisition was performed every month by a single operator (J.T.). Images were acquired from a parasternal position at the level of the papillary muscles using a 13-MHz linear-array transducer with a digital ultrasound system (Vivid 7, GE Medical System, Horton, Norway). Left ventricular (LV) diameters, anterior and posterior wall thicknesses were serially obtained from M-mode acquisition. As we expected a homogenous function and planned to compare sequential echocardiography, we used M-mode technic to assess both LV volumes, mass, and ejection fraction. Relative LV wall thickness (RWT) was defined as the sum of septal and posterior wall thickness over LV end-diastolic diameter, and LV mass was determined using the uncorrected cube assumption formula

[LV mass = (AWTd + LVEDD + PWTd)³ - (LVEDD)³]. Diastolic function was not assessed by echocardiography because of the heart rate above 600 bpm precluding the analysis of transmitral flow. Therefore, we assessed relaxation by dP/dt_{\min} during *in vivo* haemodynamic analysis. Peak systolic values of radial SR in the anterior and posterior wall were obtained using Tissue Doppler Imaging (TDI) as previously described.¹³ TDI loops were acquired from the same parasternal view with a careful alignment with the radial component of the deformation¹⁴ at a mean frame rate of 514 fps and a depth of 1 cm. The Nyquist velocity limit was set at 12 cm/s. Radial SR analysis was performed offline using the EchoPac Software (GE Medical Systems) by a single observer (G.D.) blinded to the diet of the animals. Peak systolic of radial SR was computed from a region of interest positioned in the mid-anterior wall and was measured over an axial distance of 0.6 mm. The temporal smoothing filters were turned off for all measurements. Because slight respiratory variations exist, we averaged peak systolic of radial SR on eight consecutive cardiac cycles. The intra-observer variability of radial SR was assessed (GD) using the same acquisition and same method at 24-h intervals ($3.5 \pm 3.4\%$ [3.3–3.7]).

Haemodynamic analysis

In vivo haemodynamic measurements were performed just before sacrifice (5 and 20 weeks) as previously described.¹⁵ Haemodynamic evaluation was performed in mice placed on a homeothermic operating table under 1.5% isoflurane anaesthesia in spontaneous breathing. A 1.4-Fr microcatheter (Millar Instruments, Houston, TX, USA) calibrated manually before each experiment, was inserted via the right carotid artery into the aorta for the measurement of systolic and diastolic pressure, and then advance into the LV for measurement of end-diastolic and end-systolic pressures, peak rates of isovolumic pressure development (dP/dt_{\max}) and pressure decay (dP/dt_{\min}). Data were collected after at least 10 min of steady state, using the lowest isoflurane concentration tolerated. Data were analysed using the IOX software (EMKA, France).

Metabolic tolerance tests

Metabolic tests were performed in all mice every month over a period of 20 weeks 1 day before echocardiography.

Glucose tolerance test (GTT): mice were fasted for 7 h before the study, and then given glucose solution intraperitoneally (1.5 mg/g body weight). Blood samples were collected from the tail vein at baseline, 15, 30, 60, 90, 120 min after injection, and glucose concentration was measured with an automatic glucometer (Accu-Chek Performa, Roche, Germany).

Insulin tolerance test (ITT): mice were fasted for 7 h before study, and then given insulin solution intraperitoneally (0.5 mU/g of body weight, Humulin R, Lilly, France). Blood samples were collected from the tail vein at baseline, 30, 60, 90, 120 min after injection, and glucose concentration was measured.

Histology

Paraffin-embedded sections were deparaffinized using xylene and a graded series of ethanol dilutions. Heart sections were stained either with wheat germ agglutinin (plasma membrane staining, Alexa Fluor 488 conjugated) for cardiomyocyte size (cross-sectional area) or Sirius Red for interstitial fibrosis measurement, respectively. Adipose tissue sections were stained with haematoxylin & eosin (Sigma, France) for adipocyte size measurement. The pictures with haematoxylin & eosin and Sirius Red staining were captured using a Zeiss Axioplan 2 Imaging microscope. Immunofluorescence was performed with a Zeiss Imager, M2 fluorescent microscope. Cardiomyocyte and adipocyte size was calculated from an average of 200 to 300 cells. For interstitial fibrosis, typically 3–6,

representative images per individual animal were analysed. All data were measured with the ImageJ software (NIH).

Apoptosis

Apoptosis was detected with terminal deoxynucleotidyl transferase UTP nick-end labelling (TUNEL) on paraffin-embedded heart sections, epitopes were retrieved by 90 °C bath for 10 min. After endogenous peroxidase blockage with H₂O₂ for 15 min, tissues were incubated in equilibration buffer and treated with terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) to detect TUNEL-positive (Alexa Fluor 488 conjugated) nuclei as suggested by the manufacturer (Roche, Meylan, France). Cardiomyocytes and interstitial cells were stained with a primary antibody anti-Troponin I (Abcam, UK) followed by incubation with an anti-rabbit secondary antibody conjugated with Alexa Fluor 555 (Invitrogen, France) for 1 h at room temperature. Fluorescence was measured using a Zeiss Imager. M2 fluorescent microscope, and quantified on digital photographs using the ImageJ software (NIH).

Malondialdehyde measurements

Myocardial lipid peroxidation was assessed by measuring malondialdehyde (MDA) levels as thiobarbituric acid reactive species (TBARS). Briefly, hearts were pulverized with mortar and pestle using liquid nitrogen and 25–30 mg of the powder was mixed with two volumes of ice cold 10% (w/v) trichloroacetate. Samples were then sonicated two times for 30 s followed by passing them through 21 G needle at least six times before centrifugation at 13 000 rpm for 5 min at +4 °C. An aliquot of the supernatant was reacted with an equal volume of 0.67% (w/v) TBA (thiobarbituric acid) at 100 °C for 10 min. The samples were allowed to cool down before absorbance was read at 532 nm. The concentration of TBARS corresponding to MDA was calculated based on the extinction coefficient value of 153 000 and normalized to wet weight of the sample.

Luminex analysis

Four biomarkers were quantified in plasma samples using Luminex bead-based multiplex assay with a Bio-Plex 200 instrument (Bio-Rad) according to the manufacturer's instructions: TGFβ1 using Magnetic Milliplex Map Kit (cat.# TGFMAP-64K-03, Millipore, Billerica, USA); Adiponectin and C-Reactive Protein using Magnetic Luminex screening assay kit (Cat.# LXSAMSM-1, Bio-Techne, Abingdon, UK); Leptin using Magnetic Luminex screening assay kit (Cat.# LXSAMSM-19, Bio-Techne, Abingdon, UK).

Statistical analysis

Comparison between the two groups of mice (CD and HFD) on echocardiographic, haemodynamic, metabolic, and histologic parameters of was performed using Two-way ANOVA. To assess the effect of time, comparison between echocardiographic and metabolic parameters at baseline and every month was performed using ANOVA for repeated measurements. A multivariate analysis including parameters correlated with radial SR was performed in order to identify independent factors associated with radial SR alteration. All data are reported as mean ± SEM. A probability value of <0.05 was considered statistically significant.

Results

Short-term HFD induces metabolic abnormalities and adipose tissue remodelling

HFD mice displayed an increased body weight after 5 weeks and furthermore after 20 weeks of diet compared with CD mice (Figure 1A).

In line with the weight gain, glucose tolerance was altered as shown by the elevated area under of the curve of glucose level during intra-peritoneal GTT as soon as after 5 weeks and becoming even greater after 20 weeks of HFD (Figure 1B).

These metabolic abnormalities were associated with substantial changes in adipose tissue structure. As shown in Figure 1C, adipocyte size was significantly larger in the HFD group when compared with CD group both after 5 and 20 weeks of HFD. Of particular note adipocyte size significantly increased in CD group with age. In parallel a significant increase in prevalence of macrophages surrounding dead adipocytes and forming crown-like structures (CLS) was observed in the HFD group both after 5 and 20 weeks (Figure 1D).

HFD induces an early myocardial dysfunction and a progressive LV remodelling

In HFD mice both echocardiography and *in vivo* haemodynamics demonstrated an early impairment of myocardial function as compared with CD mice (Table 1 and Figure 2). Indeed, after 5 weeks, systolic radial SR, dP/dt_{max} , and dP/dt_{min} were significantly lower in HFD compared with CD mice despite no significant decrease in LV ejection fraction (LVEF). At 20 weeks' follow-up a further reduction in systolic radial SR and dP/dt_{max} and dP/dt_{min} was observed in both groups with HFD mice displaying lower values than CD mice. Of note no significant increase in aortic blood pressure was observed with HFD (Table 1).

This early myocardial dysfunction was associated with a progressive LV remodelling as shown by a higher heart weight/tibia length ratio and a slight but significant increase in cardiac myocyte size in HFD mice compared with CD mice after 5 weeks of diet (Figure 3A and B). Furthermore, HFD mice exhibited a higher LV mass starting at 10 weeks post-HFD compared with CD (Figure 3C) but no significant change in RWT (Table 1).

HFD induces myocardial fibrosis, inflammation, oxidative stress, and apoptosis

Myocardial interstitial fibrosis increased in both groups during follow-up but was more pronounced in the HFD group than in the CD group after both 5 and 20 weeks of HFD (Figure 4A). Interestingly systolic radial SR was significantly correlated with the extent of myocardial fibrosis ($r = -0.56$, $P = 0.002$, Figure 4B). Myocardial interstitial fibrosis increase and alteration in systolic radial SR was concomitant with an important increase in leptin and TGFβ1 levels with a trend to reduced adiponectin levels in the HFD group (Figure 5). Macrophage number in the myocardium was similar in both groups at the early stage, but was higher in the HFD than in the CD group at 20 weeks (Figure 6A). HFD group also displayed an increase in TUNEL positive cells compared with CD group that was progressively more pronounced after 20 weeks of diet (Figure 6B). Myocardial oxidative stress, as represented by increased levels of TBARS, was evident after both 5 and 20 weeks of HFD compared with the corresponding CD groups (Figure 6C). CRP level progressively increased in the HFD group and was significantly higher than in CD group at 20 weeks (Figure 5C).

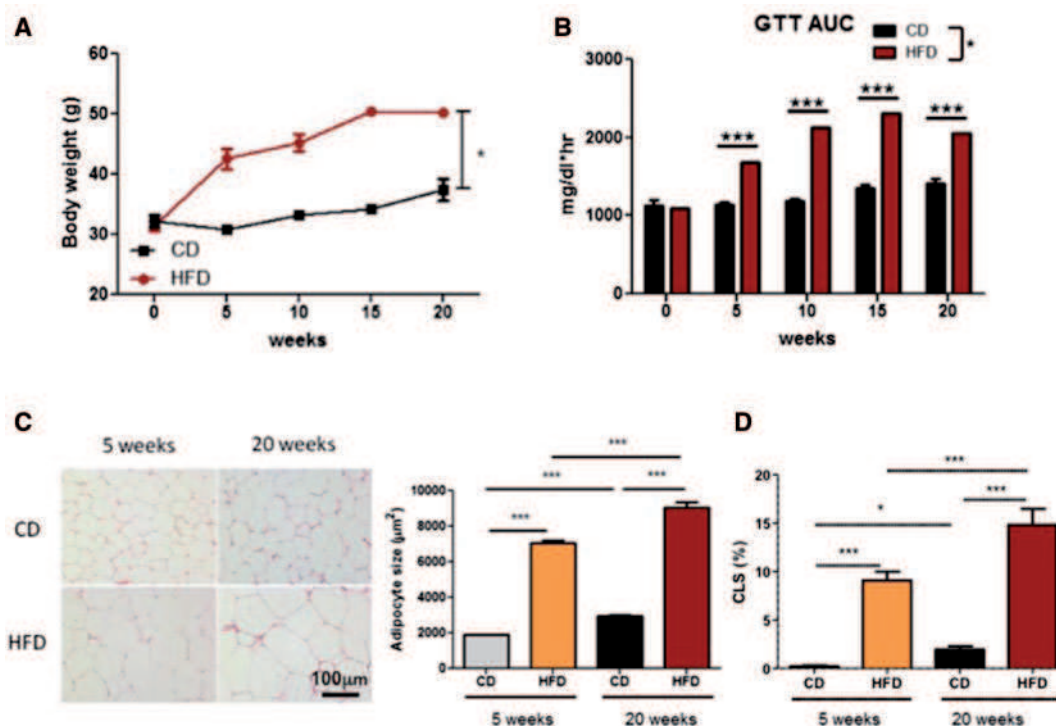


Figure 1 Time course of body weight (A), area under the curve of glycaemia (B), adipocyte size (C) and crown-like structure (CLS) formation (D) according to dietary regimen (CD vs. HFD).

Table 1 Echocardiographic and *in vivo* haemodynamic parameters

	5 weeks		20 weeks	
	CD	HFD	CD	HFD
Echocardiography				
Heart rate, bpm	643 ± 6	642 ± 9	649 ± 8	687 ± 5§
AWT, mm	0.75 ± 0.01	0.81 ± 0.01*	0.86 ± 0.01*	0.98 ± 0.03§
LVEDD, mm	2.94 ± 0.03	2.86 ± 0.05	2.90 ± 0.06	3.53 ± 0.1§
LVESD, mm	1.56 ± 0.04	1.72 ± 0.09	1.47 ± 0.08	2.19 ± 0.06§
PWT, mm	0.76 ± 0.01	0.81 ± 0.02*	0.86 ± 0.02*	1.0 ± 0.02§
LVM, mg	66 ± 1	70 ± 3	78 ± 4*	131 ± 6§
RWT	0.52 ± 0.01	0.57 ± 0.01	0.59 ± 0.01	0.58 ± 0.02
LVEF, %	82 ± 1	81 ± 2	85 ± 2	74 ± 1§
FS, %	45 ± 1	44 ± 2	48 ± 2	36 ± 1§
Radial SR anterior, unit/s	27 ± 0.8	21 ± 0.8*	22 ± 0.9*	17 ± 0.6§
<i>In vivo</i> haemodynamic				
Heart rate, bpm	544 ± 10	558 ± 10	542 ± 47	534 ± 14
Aortic systolic pressure, mmHg	101 ± 3	97 ± 3	96 ± 9	108 ± 6
Aortic diastolic pressure, mmHg	74 ± 3	66 ± 4	65 ± 6	74 ± 5
LV systolic pressure, mmHg	106 ± 3	99 ± 5	99 ± 9	112 ± 5
LV diastolic pressure, mmHg	1 ± 1	3 ± 1	4 ± 1	6 ± 1
dP/dt _{max} , mmHg/s	11637 ± 353	8202 ± 230*	9050 ± 286*	7466 ± 192§
dP/dt _{min} , mmHg/s	10138 ± 329	7493 ± 341*	8900 ± 279*	6467 ± 383§

AWT, anterior wall thickness; LVEDD, left ventricular end-diastolic diameter; LVESD, left ventricular end-systolic diameter; PWT, posterior wall thickness; LVM, left ventricular mass; RWT, relative wall thickness; LVEF, left ventricular ejection fraction; FS, fractional shortening; SR, strain rate.

*P < 0.05 vs. CD 5 weeks

§P < 0.05 vs. CD 20 weeks.

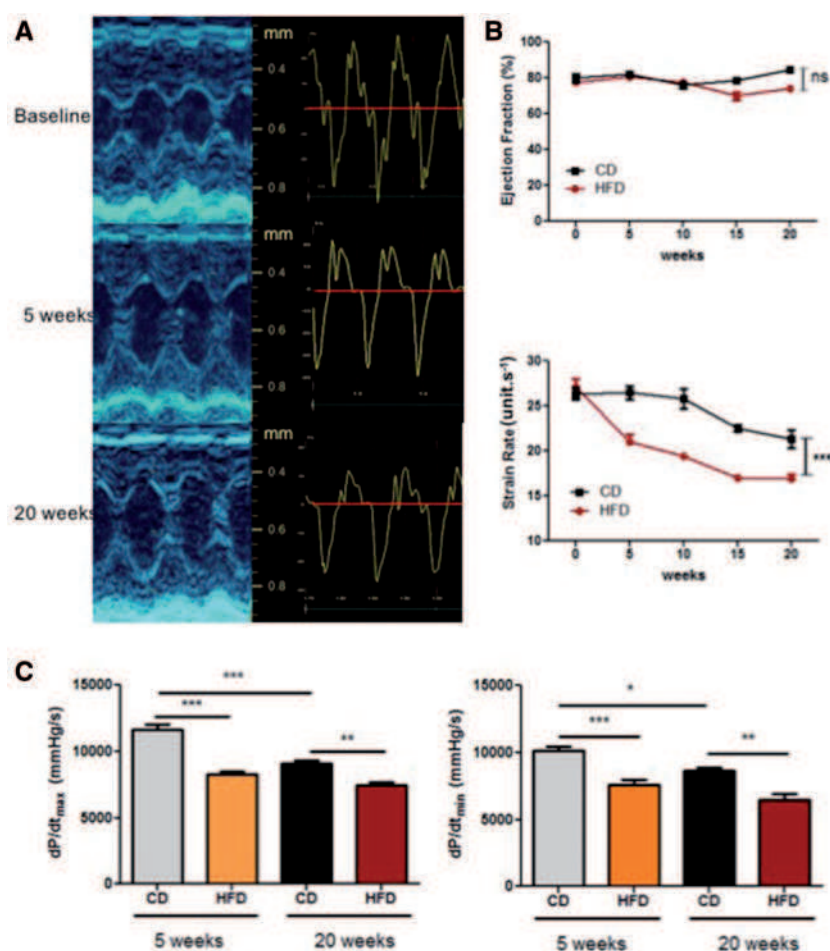


Figure 2 Time course of cardiac and haemodynamic alterations in HFD mice: LV dimensions from short-axis view (M-mode) and radial SR curves (A), LV ejection fraction (B), and radial SR values in the anterior wall (C). Time course of invasive haemodynamic parameters according to dietary regimen (dP/dt_{max} and dP/dt_{min} , D).

Radial SR alteration was significantly associated with these anatomic, metabolic, and inflammatory parameters, but multivariate analysis identified only LV mass, leptin and myocardial macrophage infiltration as independent variables (Table 2).

Discussion

The present study evaluated the metabolic and cardiovascular effects of HFD in WT mice during a follow-up of 20 weeks. The main findings are the early onset of cardiac dysfunction in association with the metabolic disorders and the early adipose tissue remodelling in the HFD group.

HFD murine model is a recognized model of obesity and insulin resistance.⁷ As previously described, we observed an increase in glucose levels together with an impaired glucose and insulin tolerance after only 5 weeks of HFD. We did not find any effect of HFD on LV function as determined by LVEF performed serially up to 20 weeks. However, regional myocardial function assessed by systolic SR

was altered early on in HFD-fed mice (5 weeks) and became further impaired after 20 weeks. In CD-fed mice, we also observed a slight decrease in systolic radial SR over time without any decrease in LVEF, thus confirming our previous observations of the impact of aging on myocardial function.¹³ Therefore, our study clearly demonstrates the additive effect of HFD-induced metabolic disorders and physiological ageing process on myocardial function and structure. This early alteration of myocardial function in the context of HFD was confirmed by *in vivo* haemodynamics, which was performed at both 5 and 20 weeks of HFD. These findings demonstrate that short duration of HFD does affect myocardial function.

Conflicting results exist in the literature regarding early cardiac dysfunction in metabolic alterations.^{7–10} Differences in experimental conditions such as the animal model, the duration of experiments, or the diet composition may explain these discrepancies. In addition, the way the myocardial function is assessed is also important. First, novel techniques exploring regional myocardial deformation such as SR imaging may display reduced contractility, before impairment of global cardiac parameters.¹⁶ Strain rate using TDI has been indeed

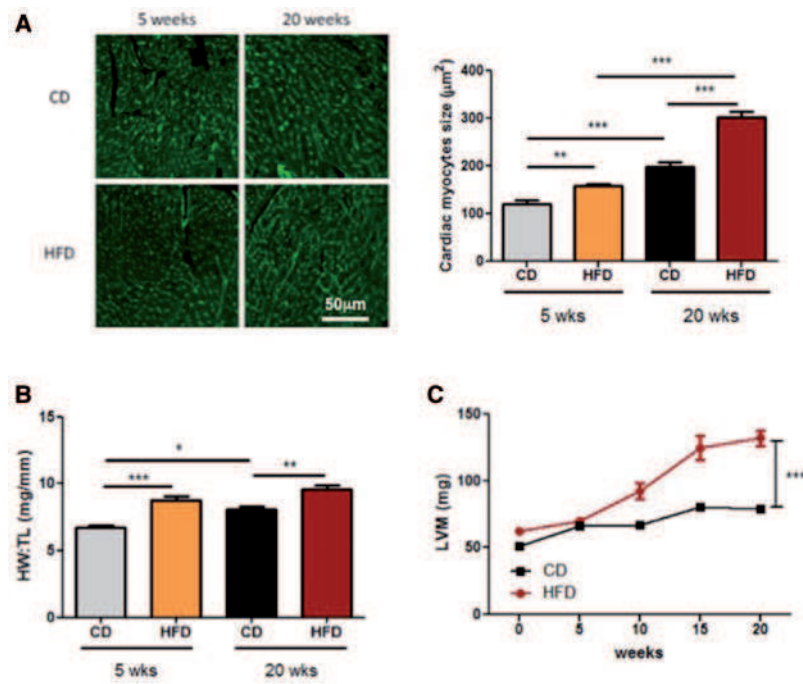


Figure 3 Time course of cardiomyocyte size (A), heart weight over tibial length (B) and LV mass by echocardiography (C) in CD and HFD-fed WT mice.

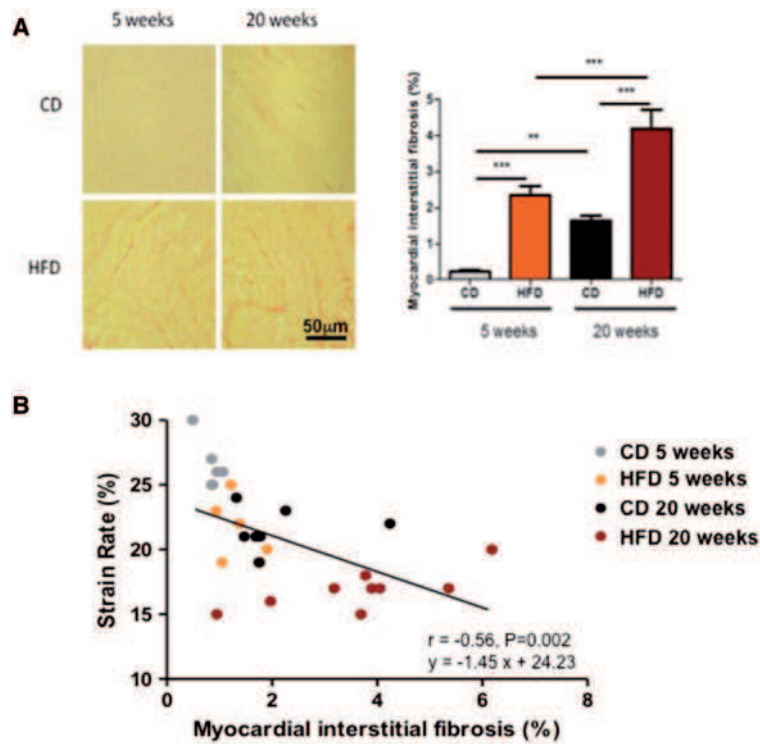


Figure 4 Time-course of myocardial interstitial fibrosis in CD and HFD-fed WT mice (A). Correlation between systolic radial SR and myocardial interstitial fibrosis (B).

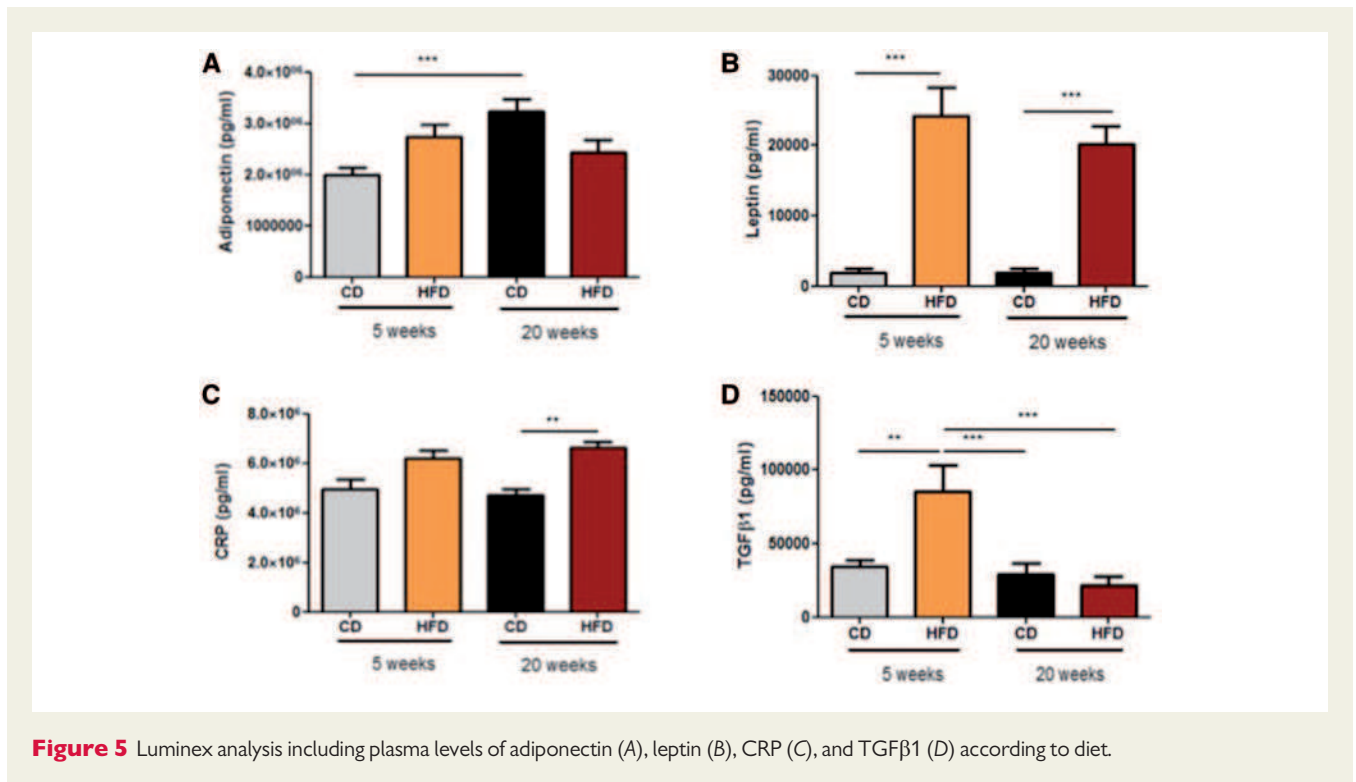


Figure 5 Luminex analysis including plasma levels of adiponectin (A), leptin (B), CRP (C), and TGFβ1 (D) according to diet.

validated as a robust method for quantifying LV regional systolic function in small animals under different pathologic conditions, confirming its superiority over Speckle Tracking Imaging.^{14,17,18} Our data demonstrate early alterations of cardiac function by both radial SR and haemodynamic parameters (dP/dt_{max}). Such abnormalities were reported by using a cardiac magnetic resonance protocol called Displacement Encoding with Stimulated Echoes (DENSE).¹⁶ However, reductions in strain were limited in the subepicardium but preserved in the subendocardium with no change observed in radial deformation, the major component of myocardial function in mice.¹⁹ Secondly, anaesthesia may have a non-trivial cardiodepressive effect on both heart rate and myocardial functional indices.¹⁹ To overcome this caveat, in the present study we performed a comprehensive echocardiographic follow-up cardiac function by both global and regional deformation indices in conscious mice, unstressed because trained to be manipulated, without the risk that anaesthesia may induce severe alteration in ejection fraction¹⁰ and/or mask subtle differences between chow and HFD-fed groups. Thirdly, we were able to evaluate both the aging and metabolic impact on myocardial function and structure because we performed this study in 5-month-old mice. Indeed, the absence of difference in LV function between HFD and CD groups in previous studies may also be explained by aging which induces *per se* a progressive LV dysfunction converging the dietary effects to a single dysfunction.

Furthermore, we explored the potential mechanisms that might contribute to the early alteration of myocardial function in HFD mice. Indeed identifying a precise and single mechanism underlying the effect of obesity on the heart is challenging.

First, we explored the role of adipose tissue, which is an endocrine organ that plays a major role in the pathogenesis and complications

of obesity. Body weight follow-up, GTT and ITT confirmed that the HFD mice developed impairment of glucose homeostasis compared with CD mice.⁷ After 5 weeks of HFD, we showed an important remodelling of visceral adipose tissue with large adipocytes surrounded by inflammatory cells emerging as CLS. At the end of the follow-up, adipose tissue remodelling also occurred in the CD group induced by aging but was less pronounced in magnitude than in the HFD group. These histological modifications were associated with an increase in plasma leptin levels which detrimental effects on the cardiovascular system have been reported in the context of obesity and include LV hypertrophy, myocardial fibrosis, and apoptosis.²⁰ Adiponectin on the other hand is a cardioprotective hormone that is known to limit LV hypertrophy, oxidative stress, and inflammation.

Decrease in myocardial contractility was concomitant with a slight but significant increase in cardiomyocyte size, LV mass, interstitial myocardial fibrosis, and apoptosis. In parallel with the time spent on HFD, interstitial myocardial fibrosis further increased and was accompanied by systolic and diastolic dysfunction with a decrease of both dP/dt_{max} and dP/dt_{min} . This is consistent with previous preclinical studies reporting the effect of HFD on myocardial hypertrophy and fibrosis and the role of GSK-3 inhibition to mediate these effects.²¹ Despite the absence of independent association between SR and myocardial fibrosis on multivariate analysis, our observation highlights the early and subtle contribution of hypertrophy and fibrosis to myocardial dysfunction in metabolic disorders. Our data show that the profibrotic effect is associated with an early increase in TGF-β1 which induces the extracellular matrix remodelling by angiotensin II and aldosterone stimulation.²² These observations provide the rationale for aldosterone antagonism to reduce myocardial fibrosis in the context of metabolic disorders.¹²

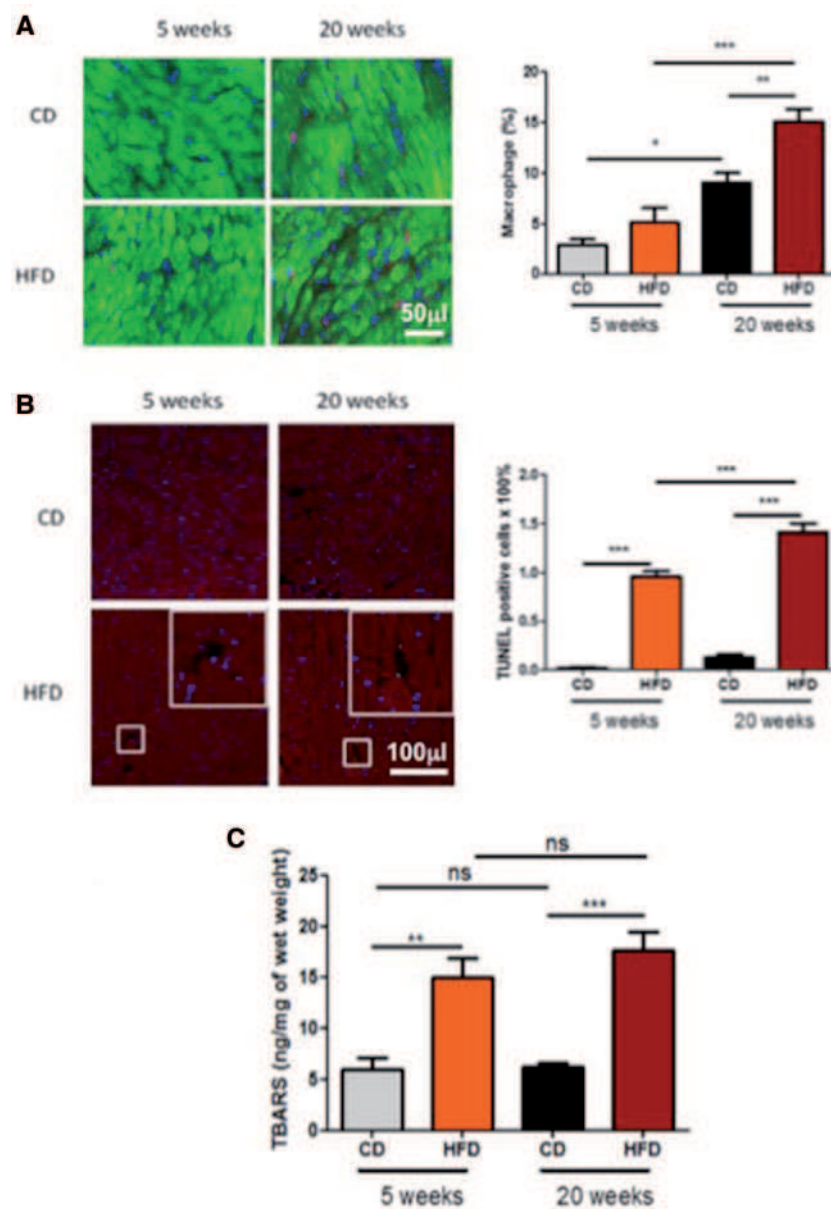


Figure 6 Time-course of myocardial macrophage infiltration (A), apoptosis in the myocardium by TUNEL (B), and oxidative stress (C) according to diet.

Table 2 Multivariate analysis to identify independent parameters related to radial SR alteration

Parameters	Adjusted regression coefficient (β)	[95% CI]	P-value
Myocardial interstitial fibrosis	-0.04	[-0.78 to 0.70]	0.9
Heart rate	0.02	[-0.03 to 0.07]	0.5
Mass	-0.06	[-0.10 to -0.01]	0.01
Glycemia	-0.01	[-0.03 to 0.01]	0.2
Leptin	0.00	[0.00 to 0.00]	0.002
CRP	0.00	[0.00 to 0.00]	0.08
Macrophage infiltration	-0.17	[-0.26 to -0.08]	0.001
Oxidative stress	0.07	[-0.14 to 0.28]	0.5

However, after 20 weeks of HFD, radial SR in HFD mice remained consistently below that of CD mice, which was most remarkable when the reduction in radial SR occurred at equivalent interstitial myocardial fibrosis. This raises the possibility that fibrosis was only one explanation for reduced systolic SR, where further, unaccounted contributors may also take their share. Indeed, multivariate analysis identified that LV mass, leptin, and macrophages infiltration were independently associated with radial SR hinting at further components to HFD's 'toxicity' on myocardial function. The fact that fibrosis was not independently associated with SR is probably related to a degree of co-linearity between the two variables.

Clinical implications

Cardiovascular diseases are the main cause of morbidity and mortality in obese patients. Cardiac alterations related to obesity include progressive LV remodelling with hypertrophy and late dilatation, and systolic dysfunction that may lead to heart failure. In human studies it is possible to assess these parameters at one time point and to follow changes in time, but it is difficult to evaluate the impact of obesity on myocardial function from early to late stage. Animal models offer the ability to do such follow-up in a well-monitored evolution of the disease. Translating the findings in HFD murine models to humans affected by obesity should lead to a careful monitoring of both myocardial function and structure to assess the impact of chronic metabolic disorders on the heart. Indeed recent clinical studies demonstrate that strain is able to unmask subtle systolic abnormalities in patients with metabolic disorders speculating that such an abnormality could be considered an early marker of metabolic cardiomyopathy.^{23,24} Our experimental data support such a statement and also demonstrate the progressive deterioration of systolic function in a time-dependent fashion together with poor glucose control. Furthermore, our findings highlight the importance of such abnormalities with impact on LV remodelling as recently suggested in a clinical study reporting after 2-year follow-up, a progression of subclinical dysfunction together with an increase in LV mass but no change in LVEF.²⁵ However, we acknowledge that we need to be cautious in translating these findings to humans because 60% fat in daily diet exceeds even the fat content of the classical Western diet.

Conclusion

To our knowledge, this is the first longitudinal study involving SR imaging in diet-induced obese mice demonstrating unequivocal early alteration of cardiac function. The sequence of events elicited in the development of the cardiometabolic disease in mice is of potential interest to build diagnostic and therapeutic strategies in humans.

Conflict of interest: None declared.

Funding

This work was supported by RHU CARMMA: ANR-15-RHUS-0003.

References

- Barabasi AL. Network medicine—from obesity to the “diseaseome”. *N Engl J Med* 2007;**357**:404–7.
- Perrone-Filardi P, Paolillo S, Costanzo P, Savarese G, Trimarco B, Bonow RO. The role of metabolic syndrome in heart failure. *Eur Heart J* 2015;**36**:2630–4.
- Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Bautista L, Franzosi MG, Commerford P et al. Obesity and the risk of myocardial infarction in 27,000 participants from 52 countries: a case-control study. *Lancet* 2005;**366**:1640–9.
- Berrington de Gonzalez A, Hartge P, Cerhan JR, Flint AJ, Hannan L, MacInnis RJ et al. Body-mass index and mortality among 1.46 million white adults. *N Engl J Med* 2010;**363**:2211–9.
- Alpert MA. Obesity cardiomyopathy: pathophysiology and evolution of the clinical syndrome. *Am J Med Sci* 2001;**321**:225–36.
- Kenchaiah S, Evans JC, Levy D, Wilson PW, Benjamin EJ, Larson MG et al. Obesity and the risk of heart failure. *N Engl J Med* 2002;**347**:305–13.
- Raher MJ, Thibault HB, Buys ES, Kuruppu D, Shimizu N, Brownell AL, et al. A short duration of high-fat diet induces insulin resistance and predisposes to adverse left ventricular remodeling after pressure overload. *Am J Phys Heart Circ Physiol* 2008;**295**:H2495–502.
- Calligaris SD, Lecanda M, Solis F, Ezquer M, Gutierrez J, Brandan E et al. Mice long-term high-fat diet feeding recapitulates human cardiovascular alterations: an animal model to study the early phases of diabetic cardiomyopathy. *PLoS One* 2013;**8**:e60931.
- Brainard RE, Watson LJ, Demartino AM, Brittan KR, Readnower RD, Boakye AA et al. High fat feeding in mice is insufficient to induce cardiac dysfunction and does not exacerbate heart failure. *PLoS One* 2013;**8**:e83174.
- Carbone S, Mauro AG, Mezzaroma E, Kraskauskas D, Marchetti C, Buzzetti R et al. A high-sugar and high-fat diet impairs cardiac systolic and diastolic function in mice. *Int J Cardiol* 2015;**198**:66–9.
- Ernande L, Bergerot C, Girerd N, Thibault H, Davidsen ES, Gautier Pignon-Blanc P et al. Longitudinal myocardial strain alteration is associated with left ventricular remodeling in asymptomatic patients with type 2 diabetes mellitus. *J Am Soc Echocardiogr* 2014;**27**:479–88.
- Kosmala W, Przewlocka-Kosmala M, Szczepanik-Osadnik H, Mysiak A, O'Moore-Sullivan T, Marwick TH. A randomized study of the beneficial effects of aldosterone antagonism on LV function, structure, and fibrosis markers in metabolic syndrome. *JACC Cardiovasc Imaging* 2011;**4**:1239–49.
- Derumeaux G, Ichinose F, Raher MJ, Morgan JG, Coman T, Lee C et al. Myocardial alterations in senescent mice and effect of exercise training: a strain rate imaging study. *Circ Cardiovasc Imaging* 2008;**1**:227–34.
- Ferferieva V, Van den Bergh A, Claus P, Jasaityte R, La Gerche A, Rademakers F et al. Assessment of strain and strain rate by two-dimensional speckle tracking in mice: comparison with tissue Doppler echocardiography and conductance catheter measurements. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging* 2013;**14**:765–73.
- Wan F, Letavernier E, Le Saux CJ, Houssaini A, Abid S, Czibik G et al. Calpastatin overexpression impairs postinfarct scar healing in mice by compromising reparative immune cell recruitment and activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2015;**309**:H1883–93.
- Kramer SP, Powell DK, Haggerty CM, Binkley CM, Mattingly AC, Cassis LA et al. Obesity reduces left ventricular strains, torsion, and synchrony in mouse models: a cine displacement encoding with stimulated echoes (DENSE) cardiovascular magnetic resonance study. *J Cardiovasc Magn Reson* 2013;**15**:109.
- Sebag IA, Handschumacher MD, Ichinose F, Morgan JG, Hataishi R, Rodrigues AC et al. Quantitative assessment of regional myocardial function in mice by tissue Doppler imaging: comparison with hemodynamics and sonomicrometry. *Circulation* 2005;**111**:2611–6.
- Neilan TG, Jassal DS, Perez-Sanz TM, Raher MJ, Pradhan AD, Buys ES et al. Tissue Doppler imaging predicts left ventricular dysfunction and mortality in a murine model of cardiac injury. *Eur Heart J* 2006;**27**:1868–75.
- Peng Y, Popovic ZB, Sopko N, Drinko J, Zhang Z, Thomas JD, et al. Speckle tracking echocardiography in the assessment of mouse models of cardiac dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009;**297**:H811–20.
- Yang R, Barouch LA. Leptin signaling and obesity: cardiovascular consequences. *Circ Res* 2007;**101**:545–59.
- Wang Z, Li L, Zhao H, Peng S, Zuo Z. Chronic high fat diet induces cardiac hypertrophy and fibrosis in mice. *Metabolism* 2015;**64**:917–25.
- Laviades C, Varo N, Diez J. Transforming growth factor beta in hypertensives with cardiorenal damage. *Hypertension* 2000;**36**:517–22.
- Ernande L, Thibault H, Bergerot C, Moulin P, Wen H, Derumeaux G et al. Systolic myocardial dysfunction in patients with type 2 diabetes mellitus: identification at MR imaging with cine displacement encoding with stimulated echoes. *Radiology* 2012;**265**:402–9.
- Nakai H, Takeuchi M, Nishikage T, Lang RM, Otsuji Y. Subclinical left ventricular dysfunction in asymptomatic diabetic patients assessed by two-dimensional speckle tracking echocardiography: correlation with diabetic duration. *Eur J Echocardiogr* 2009;**10**:926–32.
- Roos CJ, Scholte AJ, Kharagitsingh AV, Bax JJ, Delgado V. Changes in multidirectional LV strain in asymptomatic patients with type 2 diabetes mellitus: a 2-year follow-up study. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging* 2014;**15**:41–7.

VII. Rôle protecteur de l'exercice physique dans l'obésité induite par un régime riche en graisse : Impact sur la sénescence du tissu adipeux et de son sécrétome

1) Problématique

Dans l'étude précédente, nous avons mis en évidence au sein du groupe de souris HFD une dysfonction cardiaque précoce avec une fibrose myocardique interstitielle, une augmentation des biomarqueurs profibrotiques, et un remodelage du tissu adipeux. Nous n'avons cependant pas exploré les paramètres de sénescence du tissu adipeux qui ont été récemment suggérés comme des éléments physiopathologiques importants liés au régime HFD(48).

Nous avons donc voulu dans un deuxième temps identifier le rôle protecteur à la fois sur le plan cardiaque et métabolique d'un exercice physique associé au régime HFD et d'en apprécier les modifications sur d'une part la sénescence et d'autre part le sécrétome du tissu adipeux et en déduire les conséquences cardiaques.

2) Matériel et méthode

a) Le modèle animal

Nous avons repris le modèle de souris de 5 mois exposées soit au régime HFD, soit au régime CD. La composition de l'alimentation ainsi que l'hébergement des souris étaient identiques à l'étude précédente.

b) Le protocole d'activité physique forcée

Les souris étaient initialement réparties dans 2 groupes de 30 souris selon le régime HFD ou CD. Après 5 semaines de régime seul, sans activité physique, chacun des deux groupes était subdivisé en deux selon la réalisation ou non d'un exercice physique forcé pendant une période

de 4 semaines. On obtenait ainsi 4 groupes de 15 souris : CD sédentaire, CD exercice, HFD sédentaire et HFD exercice. L'exercice physique forcé consistait en des séances biquotidiennes (5 jours/7, 6 heures de repos entre deux séances) de natation de durée progressivement croissante jusqu'à un plateau de 90 minutes / jour selon un protocole déjà exploré et validé par notre groupe dans un modèle de souris âgées(46). La natation se déroulait dans un récipient en plexiglass transparent rempli d'eau chaude (31°C) maintenue à température optimale. Une précaution particulière était prise pour que les souris nagent en permanence et ne se reposent pas en s'agrippant les unes aux autres ou au rebord du récipient. Après chaque séance de natation, les souris étaient séchées à l'aide de papier absorbant puis replacées dans leur cage sous lampe chauffante jusqu'à séchage complet.

c) Les tests métaboliques et échocardiographies

Les analyses métaboliques (poids, GTT et ITT) ainsi que les échocardiographies étaient réalisées selon le même protocole que l'étude précédente selon la séquence temporelle indiquée en figure 31. Le poids des souris était évalué toute les semaines, alors que les tests métaboliques et l'échocardiographie ont été réalisés au début de l'étude, après les 5 semaines de régime seul (donc avant le début de l'exercice), et enfin à la fin des 4 semaines d'exercice (Figure 30).

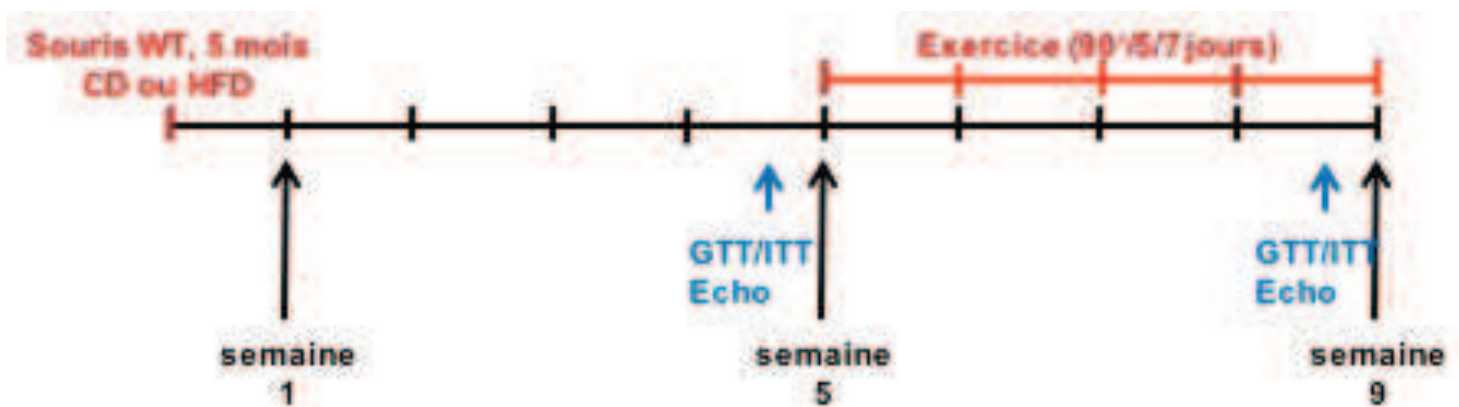


Figure 30. Déroulement du protocole HFD + Exercice

d) Prélèvements et analyses du tissu adipeux et des biomarqueurs plasmatiques

Les souris étaient donc sacrifiées à environ 7 mois de vie, sans jeûne préalable. La dernière séance de natation du groupe exercice était 24h avant le sacrifice. Le sang des souris était collecté dans un tube EDTA par ponction de l'aorte abdominale après sédation par isoflurane, puis les prélèvements étaient conservés à -80°C jusqu'à analyse. La concentration en insuline était déterminée par kit ultrasensible (Alpco, Salem, NH, USA). Le dosage plasmatique de leptine et d'adiponectine, de fibroblast growth factor 21 (FGF21), du Tumor Necrosis Factor (TNF) et des interleukines 6 et 10 (IL-6, IL-10) était réalisé par ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

Après sacrifice, la graisse blanche inguinale sous-cutanée (sWAT), et viscérale épidydimale (eWAT) et péri-rénale (prWAT) était collectée, pesée puis conservée pour analyse. L'index d'adiposité correspondait à la masse totale de graisse (sWAT + eWAT + prWAT) divisé par le poids de la souris, le tout multiplié par 100. L'étude de la sénescence sur le tissu adipeux sous-cutané (sWAT) et épidydimal (eWAT) nécessitait une fixation au PBS à 0,5% de glutaraldéhyde (pH à 5,5) puis une détection de l'activité de la SA-β-galactosidase par Ultrapure X-gal (Invitrogen). Le pourcentage de cellules SA-β-gal positives était quantifié via le logiciel ImageJ (NIH).

e) Immunohistochimie

Après dissection, le sWAT et eWAT étaient fixés par du formaldéhyde à 4% (Sigma-Aldrich) puis inclus en paraffine après au moins 1 semaine de fixation. Pour la détection des protéines p16 et p21, les coupes de tissu adipeux déparaffinées et hydratées étaient ensuite soumises à une récupération thermique d'antigène (tampon citraté pH 6,0, Dako) et à un blocage des liaisons non spécifiques par sérum de chèvre (à 30%). Des anticorps anti-p16/p21 (R&D Systems) étaient appliqués avec un diluant (Dako) durant une nuit à 4°C en chambre humide. Les

anticorps secondaires fluorescents (Rabbit Alexa488) étaient ensuite appliqués. La fluorescence était mesurée avec le microscope à fluorescence Zeiss Imager M2 et quantifiée à partir d'images numériques via le logiciel ImageJ (NIH).

f) Evaluation de la fibrose

L'évaluation de la fibrose utilisait deux procédés : la coloration au rouge sirius et la mesure de l'hydroxyproline. Le rouge sirius permet de mettre en évidence les fibres de collagène. Les dépôts de collagène étaient quantifiés via le logiciel ImageJ (NIH), et le pourcentage de fibrose correspondait au ratio entre la surface de dépôt de collagène sur la surface totale de l'image. La quantification était faite à grossissement x10 et sur 5 images tirées au sort. L'hydroxyproline est un composant du collagène. La mesure de l'hydroxyproline (Khan et al, 2009) a été effectuée en utilisant un kit de dosage colorimétrique (BioVision, Inc, Milpitas, CA, USA). Les échantillons congelés de sWAT et eWAT étaient homogénéisés dans du HCl à 37°C à une concentration de 0,1 mg/μl et chauffés à 110°C pendant une nuit. Une fois à température ambiante, 10μl étaient évaporés avant addition de chloramine T. Un volume égal de DMAB était ajouté suivi d'une incubation à 60°C pendant 90 minutes. L'absorption était lue à 560nm.

g) Quantification par PCR

L'ARN total était extrait d'échantillons d'organes réduit en poudre à l'aide d'un kit dédié (Qiagen, France). L'ARN issu des fibroblastes cardiaques en culture était également extrait à l'aide d'un kit Qiagen, selon les instructions du fabricant. Le premier brin d'ADN était amplifié à partir de 0,5-1,0 μg d'ARN total à l'aide du kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit et d'un thermo cycler SimpliAmp (Applied Biosystems, CA, USA), selon les instructions du fabricant. La PCR quantitative était réalisée et analysée avec une amorce TaqMan® et le

système StepOne™ Real-Time PCR (Applied Biosystems). Le gène de β -actin était utilisé comme contrôle.

3) Résultats

a) Modifications morphologiques et métaboliques dans le groupe HFD, et évolution selon la pratique d'une activité physique ou non

Comme dans notre première étude, nous avons retrouvé une augmentation du poids corporel ainsi que de la masse totale du tissu adipeux associée à une altération précoce (dès 5 semaines) du métabolisme glucidique chez les souris HFD.

Les anomalies glucidiques (hyperglycémie et hyperinsulinémie et tests de tolérance) étaient améliorées voire normalisées par l'exercice physique (Figure 31).

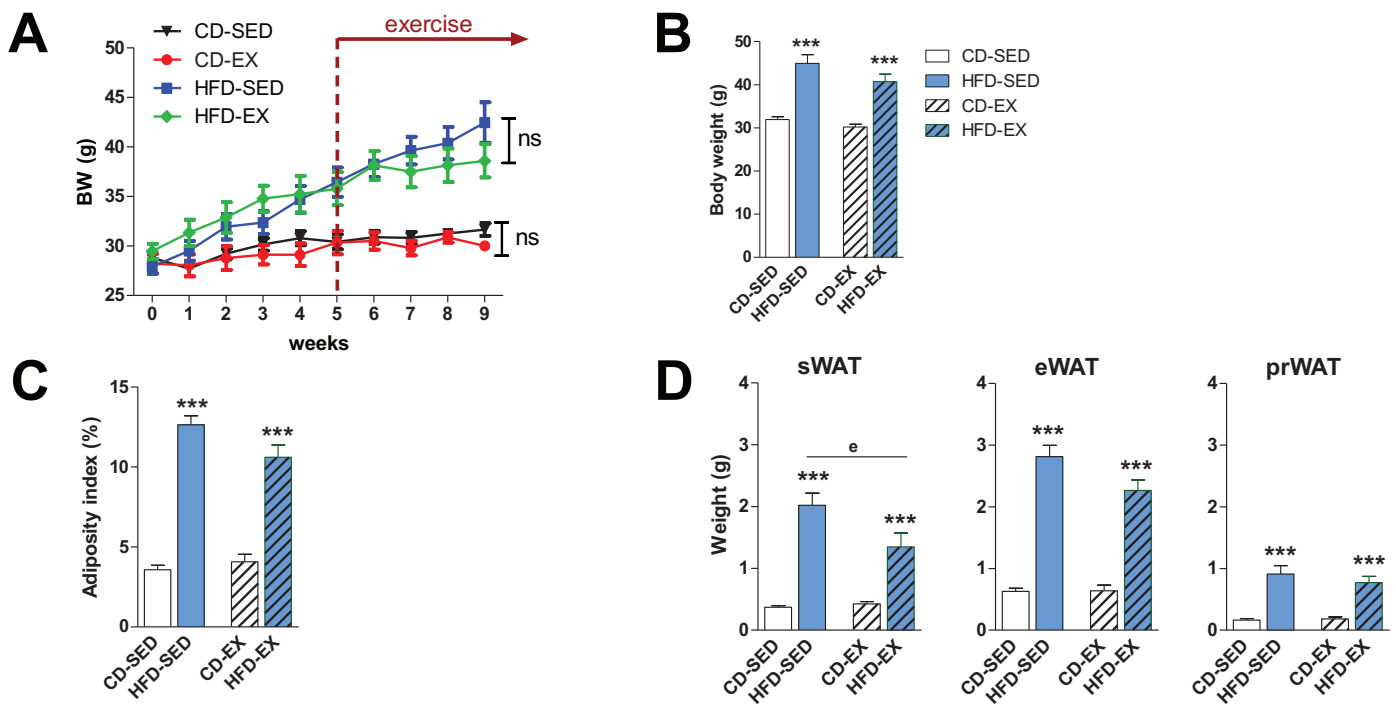


Figure 31. Evolution du poids corporel (A et B), de l'index d'adiposité (C) et des différents tissus adipeux (D) selon le type de régime (HFD - CD) et de l'exercice physique ou non (SED - EX).

Le régime HFD était responsable d'une multiplication par 3 de l'adiposité, y compris dans le groupe exercice. Cependant, nous avons observé que l'exercice avait une action différente sur les différents tissus adipeux. Ainsi, seule la masse du tissu adipeux sous cutané diminuait (de 33%) avec l'exercice alors que la masse du tissu adipeux viscéral (eWAT et prWAT) ne changeait pas. De même, l'exercice avait tendance à limiter la prise de poids sans atteindre le seuil de significativité (Figure 32). Les troubles métaboliques induits par le régime HFD sont donc nettement améliorés par l'exercice physique et ce de façon indépendante de l'évolution du poids ou de l'adiposité.

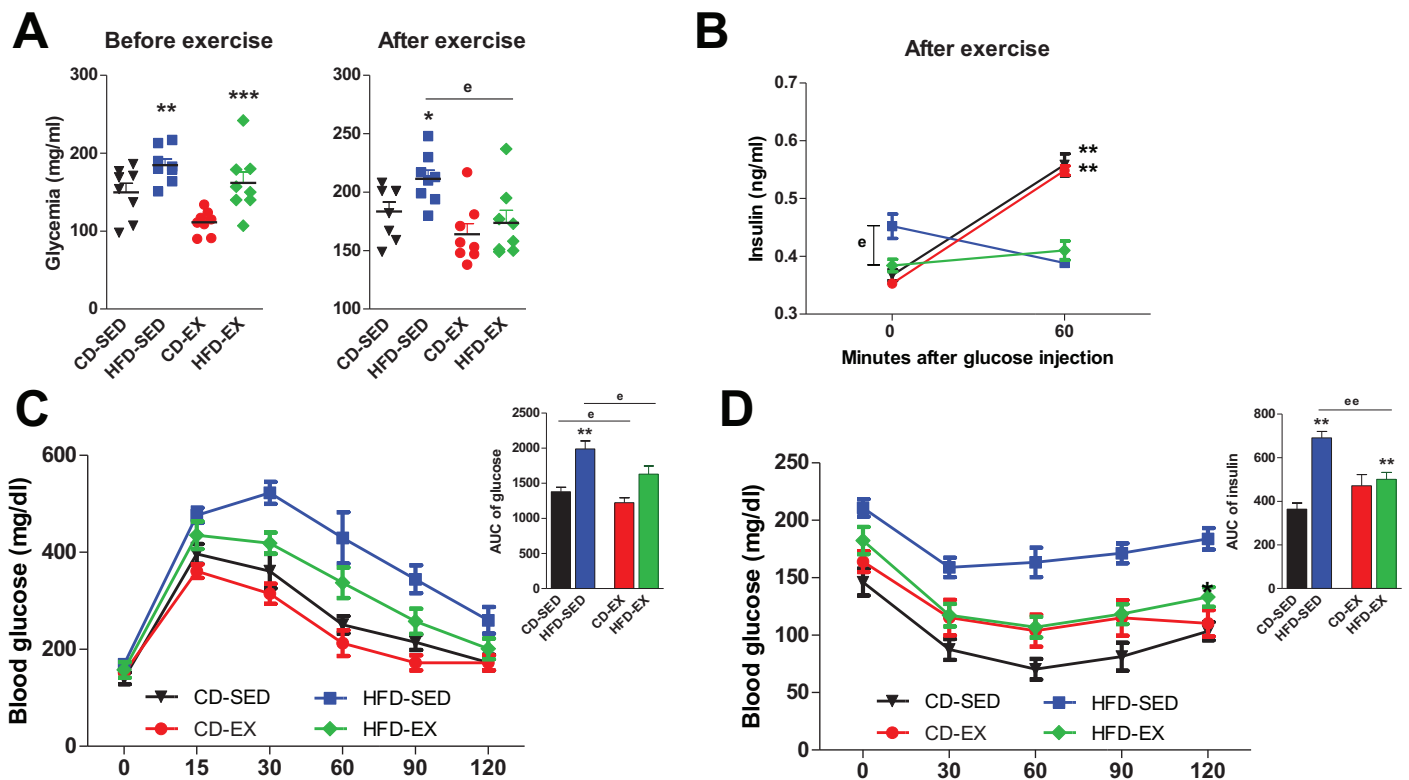


Figure 32. Evolution de la glycémie (A), de l'insulinémie (B) et des tests de tolérance (C et D) selon le type de régime (HFD - CD) et l'exposition à l'exercice physique ou non (SED - EX).

b) Remodelage et dysfonction du tissu adipeux soumis à un régime HFD et influence de l'exercice physique

Afin de déterminer si l'exercice améliorerait les troubles métaboliques induits par le régime HFD via une action sur le tissu adipeux, nous avons dosé les différentes adipokines habituellement impliquées dans le métabolisme, notamment glucidique.

Tout d'abord, nous avons étudié l'adiponectine, adipokine connue pour son rôle dans l'oxydation des acides gras et l'utilisation du glucose. Son taux plasmatique était augmenté dans le groupe HFD (exercice et sédentaire) et dans le groupe CD exercice. Cependant, si on indexait cette valeur à la masse du tissu adipeux, le groupe HFD (exercice et sédentaire) avait un niveau d'adiponectine plus bas (Figure 33A). Dans le groupe CD, l'exercice permettait d'augmenter le niveau d'adiponectine. Nous avons ensuite voulu vérifier que ce taux plasmatique était en rapport avec le niveau de production du tissu adipeux, par réalisation d'une PCR sur le tissu adipeux sous-cutané et viscéral (épididymal). Il n'y avait aucune modification du niveau de transcription d'adiponectine dans le tissu adipeux sous-cutané, alors qu'au niveau viscéral la transcription diminuait dans le groupe HFD (exercice ou non) et augmentait dans le groupe CD avec exercice (Figure 33B). L'exposition à un régime HFD entraînait donc une diminution du taux plasmatique d'adiponectine via une diminution de sa transcription au niveau du tissu adipeux viscéral.

Nous avons ensuite étudié la leptine, adipokine impliquée dans l'utilisation des réserves de graisse (augmentation de la lipolyse et diminution de la lipogenèse) et sur le métabolisme glucidique (diminution de la sécrétion d'insuline et baisse de la néoglucogenèse). Elle est également impliquée dans le développement de la fibrose, notamment hépatocytaire au cours de la stéatose hépatique. En comparaison avec le groupe CD (exercice ou sédentaire), le taux de leptine plasmatique était nettement augmenté ($\times 7,5$) dans le groupe HFD sédentaire et de façon moindre dans le groupe HFD exercice. Après indexation à la masse de tissu adipeux, le

taux de leptine plasmatique du groupe HFD sédentaire restait nettement plus élevé que dans le groupe CD (exercice ou sédentaire), alors qu'il se normalisait après exercice (Figure 33C). Par analyse PCR au niveau du tissu adipeux, le niveau de transcription de la leptine ne variait pas dans les groupes CD, aussi bien dans la graisse sous-cutanée que viscérale. A contrario, le régime HFD augmentait nettement le niveau de transcription de la leptine dans les 2 types de graisse, et l'exercice induisait une diminution de sa transcription uniquement au niveau du tissu sous-cutané (Figure 33D). L'exposition à un régime HFD entraîne donc une augmentation du taux plasmatique de leptine via une augmentation de sa transcription au niveau du tissu adipeux sous-cutané et viscéral. La diminution du taux plasmatique de leptine dans le groupe CD exercice s'explique par une diminution de sa transcription par le tissu sous-cutané. Le régime HFD induit donc une dysfonction du tissu adipeux qui prédomine au niveau viscéral. Enfin, nous avons voulu corréler cette dysfonction « endocrine » au remodelage du tissu adipeux.

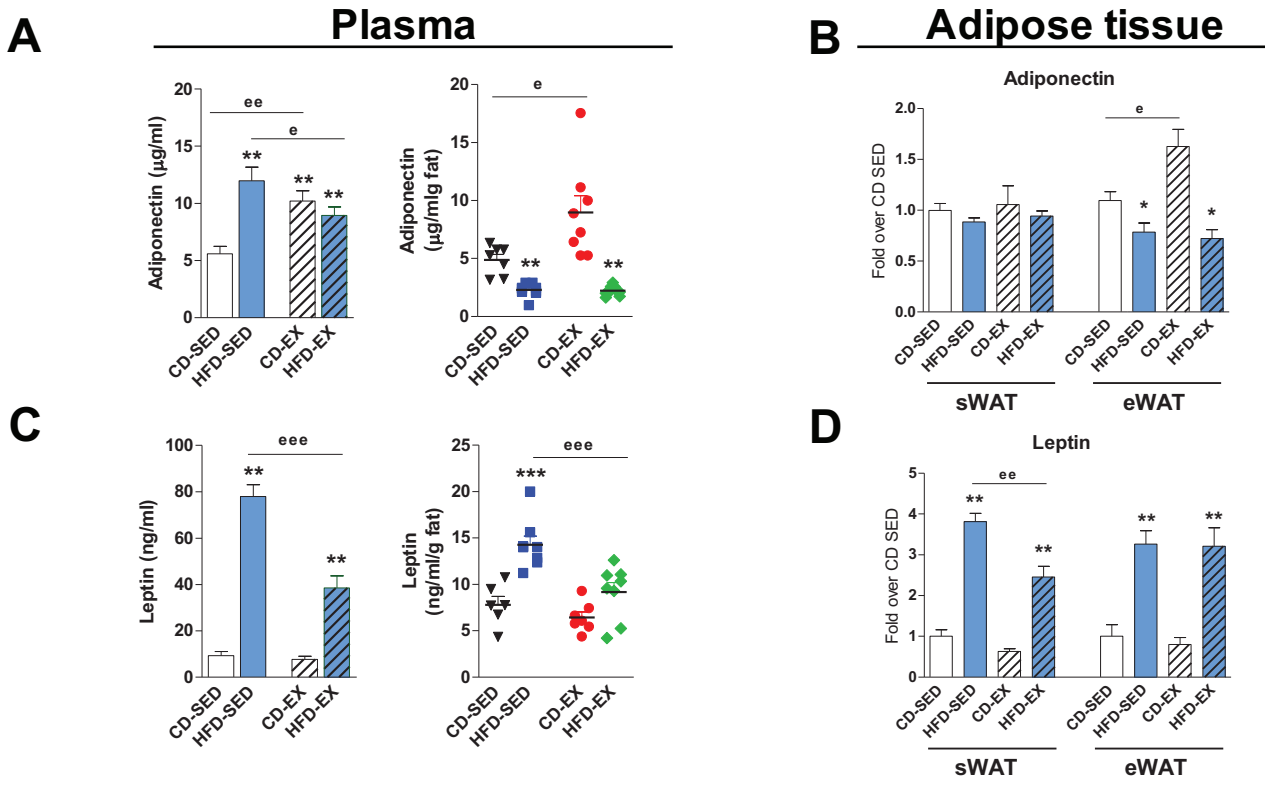


Figure 33. Taux plasmatique d'adiponectine (A) et de leptine (C) brut et indexé à la masse du tissu adipeux. Evaluation par PCR du niveau de transcription de l'adiponectine (B) et de la leptine (D) dans le tissu adipeux sous-cutané (sWAT) et viscéral (eWAT).

Les souris du groupe HFD présentaient une hypertrophie adipocytaire aussi bien en sous-cutané qu'en viscéral, alors que la taille des adipocytes variait peu dans le groupe CD. L'hypertrophie adipocytaire du groupe HFD était limitée par l'exercice dans les deux types de tissu adipeux. Par contre, le degré de fibrose du tissu adipeux, évalué par coloration au rouge sirius ou par mesure de l'hydroxyproline, était similaire entre les groupes HFD et CD (exercice ou non, Figure 34).

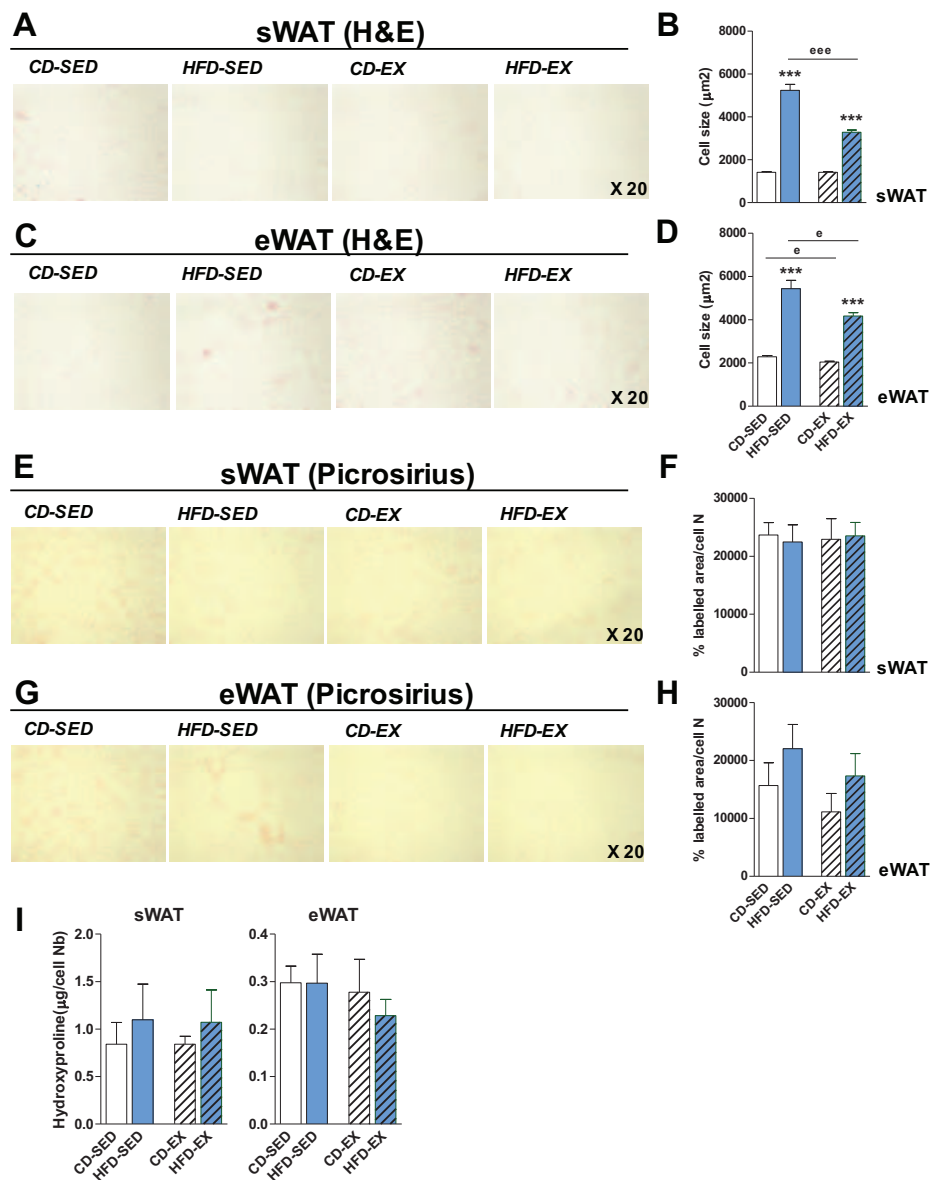


Figure 34. Analyse du remodelage du tissu adipeux après coloration H&E (graisse sous-cutanée, A ; graisse viscérale, C) par mesure de la taille des adipocytes (graisse sous-cutanée, B ; graisse viscérale, D). Quantification de la fibrose adipocytaire après coloration au rouge sirius de la graisse sous-cutanée (E et F) et viscérale (G et H), et par dosage de l'hydroxyproline (I).

L'exposition à un régime HFD entraîne donc une dysfonction du tissu adipeux prédominante au niveau viscéral avec modification de son sécrétome, associée à un remodelage sans fibrose touchant de façon similaire la graisse viscérale et sous-cutanée.

c) Le régime HFD, un modèle de sénescence précoce du tissu adipeux ?

Au cours de l'obésité, la sénescence des adipocytes est un déterminant essentiel de la dysfonction du tissu adipeux et de l'altération métabolique. Pour explorer les effets du régime alimentaire et de l'exercice physique sur la sénescence du tissu adipeux, nous avons tout d'abord mesuré l'activité de la β -galactosidase, biomarqueur classiquement utilisé pour évaluer la sénescence des tissus, puis nous avons quantifié le pourcentage de cellules exprimant les protéines p16 et p21, deux biomarqueurs du processus de vieillissement. Dans le groupe HFD sédentaire, la coloration de la β -galactosidase dans les deux types de tissu adipeux était plus intense que dans les groupes CD, alors que l'exercice normalisait cette différence (Figure 35). Concernant la détection de p16 et p21, les résultats variaient selon le groupe de souris et selon le type de tissu adipeux. Concernant p16, peu de différence était observée entre les groupes au niveau du tissu adipeux sous-cutané, alors que le nombre de cellules exprimant p16 au niveau du tissu adipeux viscéral était significativement plus important dans le groupe HFD sédentaire que dans les autres, avec normalisation à l'exercice. Concernant p21, son expression cellulaire était plus importante dans les tissus adipeux viscéral et sous-cutané du groupe HFD sédentaire par rapport aux groupes CD. Par contre, l'exercice ne permettait une normalisation de l'expression de p21 que dans le tissu adipeux sous-cutané (Figure 35).

Le régime HFD induit donc une sénescence accélérée du tissu adipeux sous-cutané et surtout viscéral, partiellement corrigé par l'exercice.

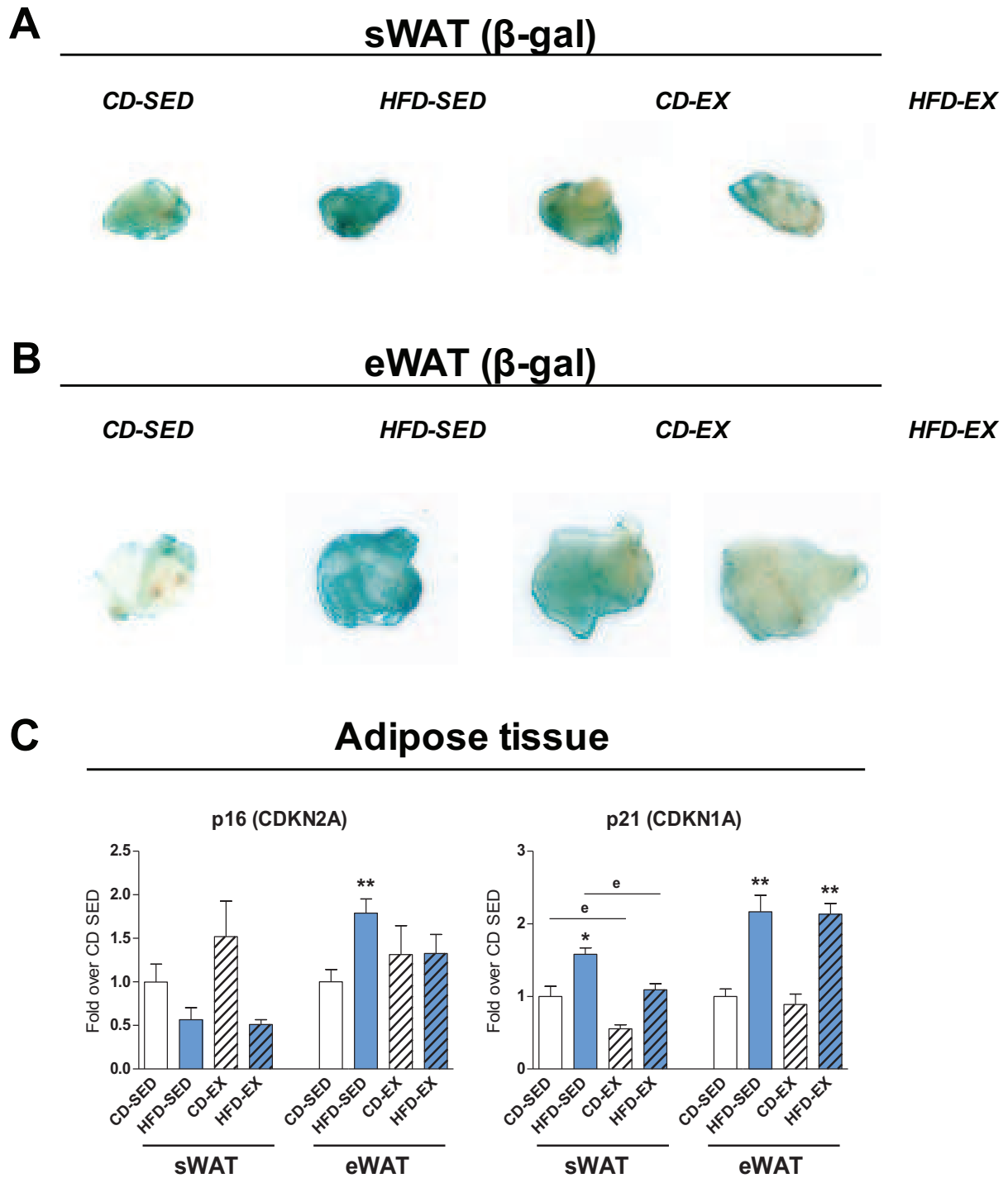


Figure 35. Evaluation de la sénescence du tissu adipeux dans les groupes HFD et CD par coloration de la β -galactosidase dans le tissu adipeux sous-cutané (A) et viscéral (B), et par quantification du nombre de cellules exprimant p16 et p21 (C).

Nous avons voulu explorer si ce processus de sénescence était en lien avec un état pro-inflammatoire. De façon intéressante, l'expression (évaluée par PCR) des marqueurs pro-inflammatoires (IL-6 et le TNF α), et anti-inflammatoire (IL-10), était similaire entre les groupes HFD et CD. Leur expression était même plus basse dans le groupe HFD, notamment pour l'IL-6 et l'IL10 (Figure 36). L'inflammation ne semble donc pas être le principal déterminant de cette sénescence accélérée ; on peut même considérer que la sénescence du tissu adipeux lors du régime HFD précède le classique état d'inflammation de bas grade décrit dans la littérature chez les patients obèses.

RT-PCR of inflammatory markers

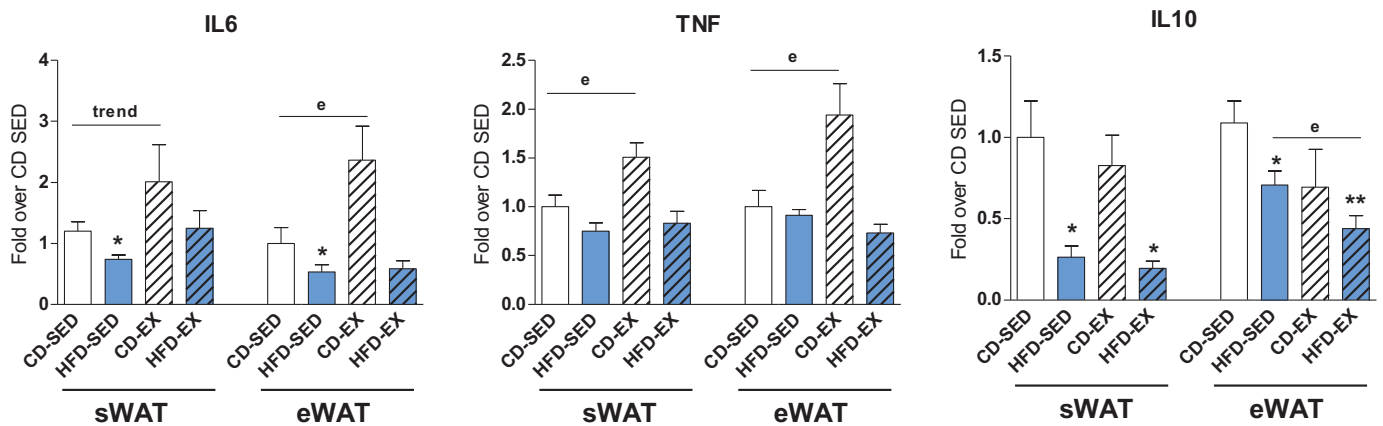


Figure 36. Evaluation par PCR de l'expression des marqueurs pro-inflammatoires (IL-6 et TNF) et anti-inflammatoire (IL-10) en fonction des groupes HFD et CD, et dans les deux types de tissu adipeux.

d) Impact cardiovasculaire de l'exercice chez les souris soumises à un régime HFD

L'obésité et le diabète de type 2 sont connus pour avoir des effets délétères sur le myocarde(10-12, 49). Afin d'évaluer au cours du temps la survenue de la dysfonction cardiaque, une évaluation échocardiographique a été réalisée à 4 semaines (immédiatement avant le protocole exercice) et à 8 semaines (immédiatement avant le sacrifice).

Au terme du protocole, les groupes étaient comparables en termes de fréquence cardiaque et de paramètres usuels de fonction systolique ventriculaire gauche comme la FEVG ou la fraction de raccourcissement (Figure 37).

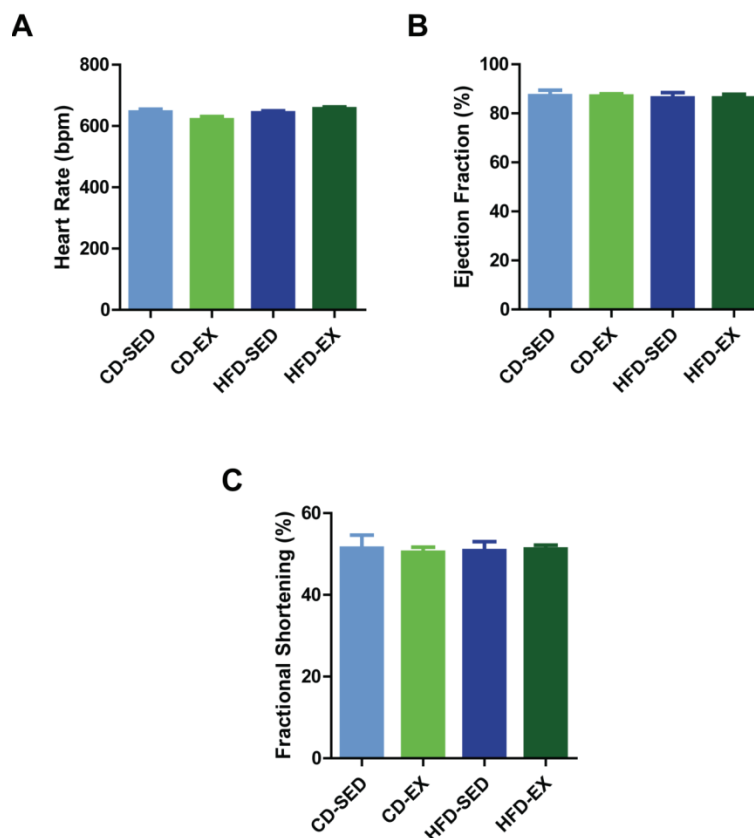


Figure 37. Fréquence cardiaque (A), fraction d'éjection du ventricule gauche (B) et fraction de raccourcissement du ventricule gauche (C) avant les dissections (8 semaines). Aucune différence significative n'était observée entre les groupes.

Par contre, les paramètres de déformation myocardique du ventricule gauche comme le strain rate (SR) au niveau de la paroi antérieure et postérieure étaient altérés chez les souris HFD sédentaires en comparaison du groupe contrôle CD sédentaire (Figure 38).

De façon intéressante, les valeurs du SR après exercice étaient supérieures à celles du SR des groupes sédentaires, aussi bien chez les souris HFD que CD. De plus, l'exercice permettait aux souris HFD de retrouver un niveau de SR comparable à celles du groupe CD (Figure 38).

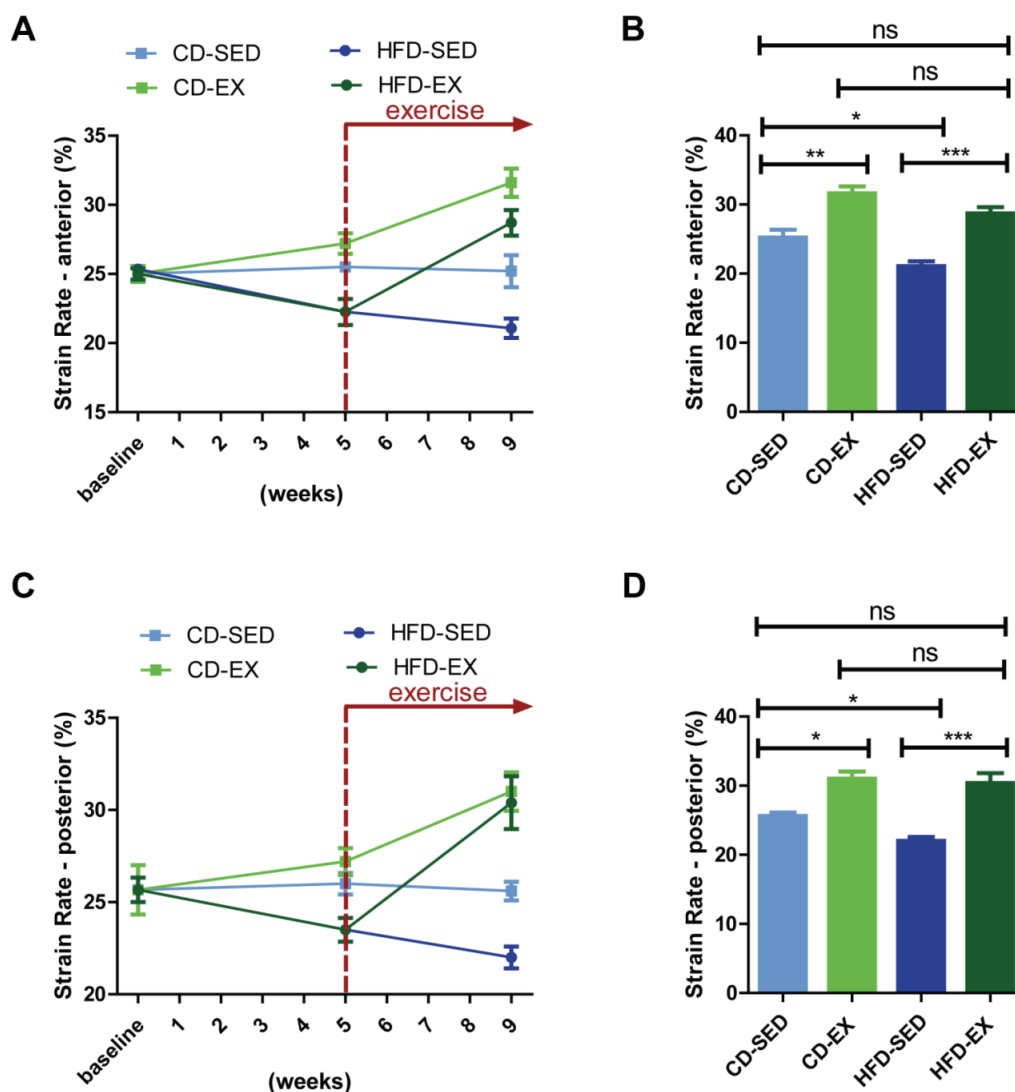


Figure 38. Evolution au cours du temps du strain rate au niveau de la paroi antérieure (A et B) et postérieure (C et D) selon le régime alimentaire (HFD et CD) et l'activité physique (exercice et sédentarité); ns: non significatif; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$.

Afin de confirmer les résultats du strain rate, nous avons effectué des mesures hémodynamiques in-vivo avant le sacrifice. Les mesures de dP/dt_{max} et dP/dt_{min} confirmaient bien les données du SR en retrouvant une altération de la contractilité et de la relaxation du VG chez les souris HFD, dysfonction corrigée par l'exercice (Figure 39). Il est important de noter que ces altérations n'étaient pas liées à un changement des conditions de charges comme le montre la figure 39 sur le niveau de pression artérielle systolique et diastolique.

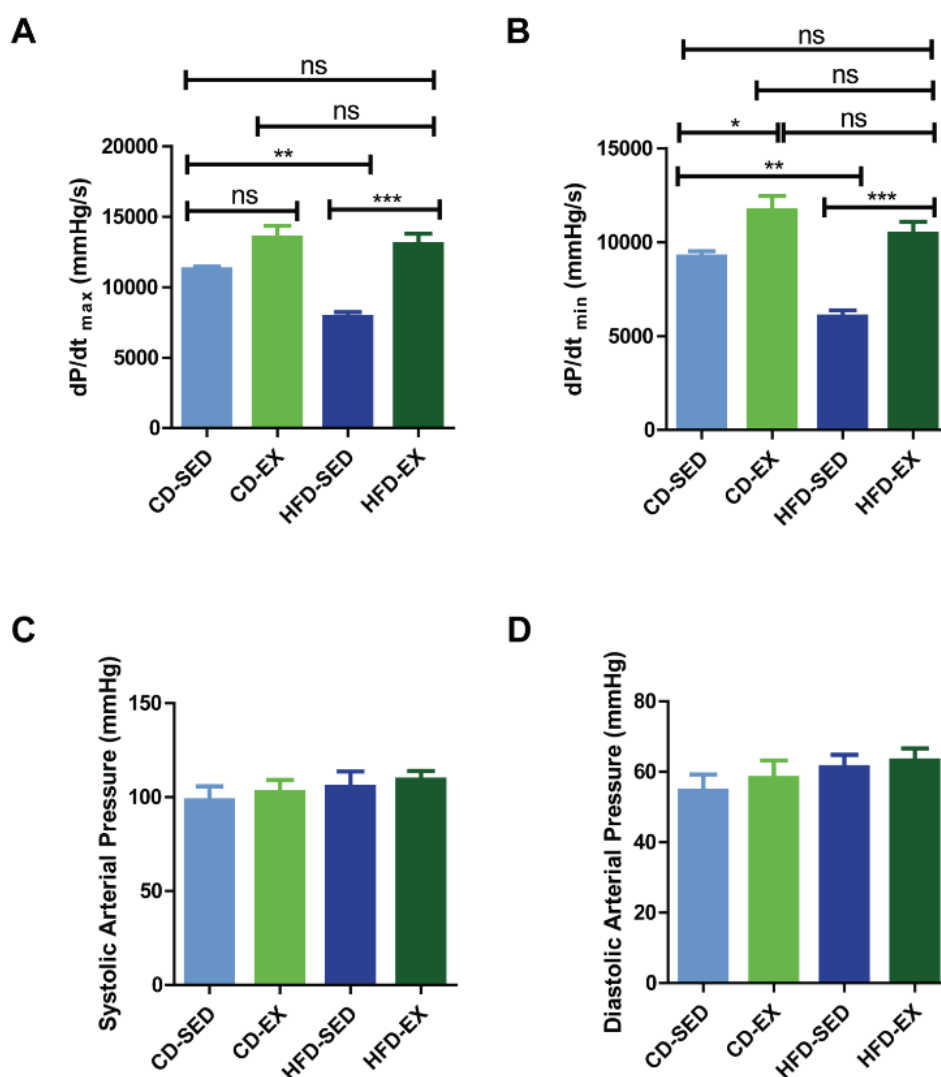


Figure 39. Mesures hémodynamiques in-vivo au moment de la dissection : contractilité (A, dP/dt_{max}) et relaxation (B, dP/dt_{min}) du ventricule gauche, pression artérielle systolique (C) et diastolique (D) en fonction du régime alimentaire (HFD et CD) et de l'activité physique (exercice et sédentarité); ns: non significatif; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$.

Nous avons donc observé une altération de la fonction ventriculaire gauche chez les souris soumises au régime HFD, phénomène corrigé par l'exercice. La question qui découle de cette observation est : quelles sont les modifications structurelles pouvant expliquer ces changements fonctionnels ? Comme le stress et l'exercice sont tous deux connus pour induire une hypertrophie myocardique, nous avons d'abord évalué la masse myocardique. De façon intéressante, la valeur du poids du cœur rapporté à la longueur tibiale était similaire entre les différents groupes (Figure 40). Ensuite, l'analyse histologique du myocarde a montré que la taille des cardiomyocytes était plus importante dans les groupes HFD que CD. De plus, l'exercice induisait une augmentation de la taille des cardiomyocytes dans les deux groupes HFD et CD (figure 40).

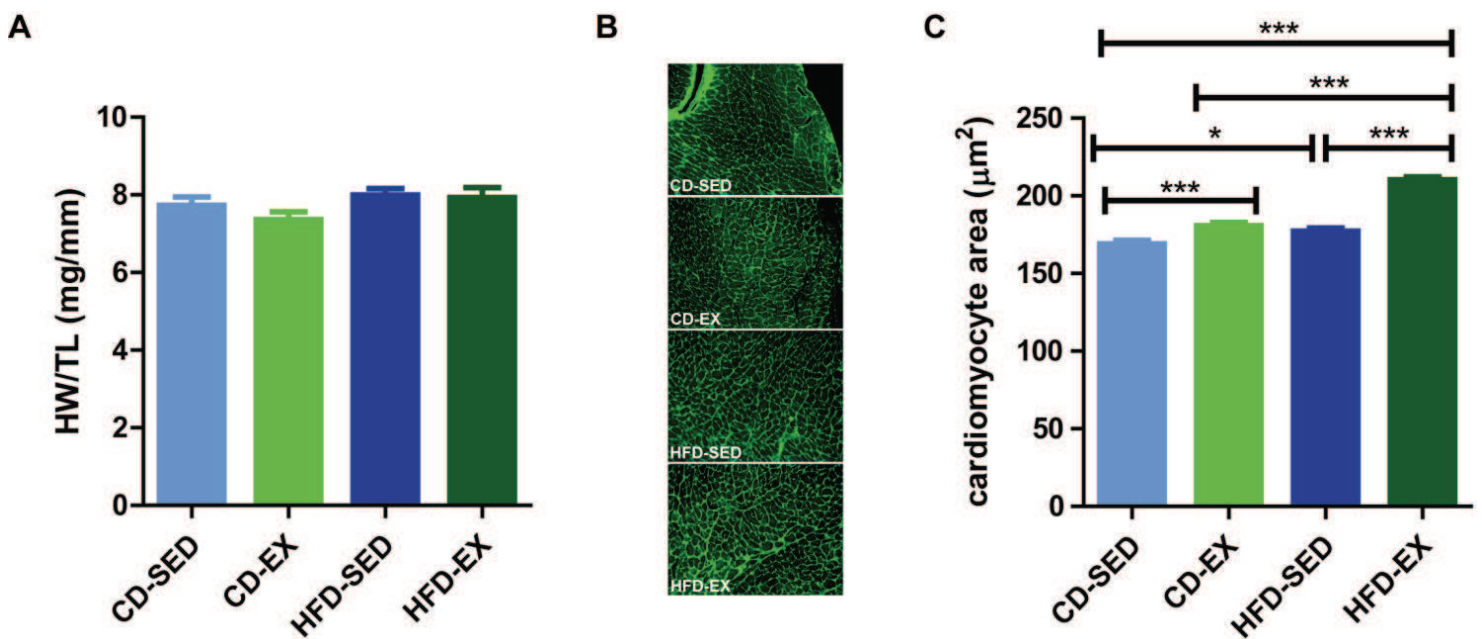


Figure 40. Evaluation de la masse myocardique par le rapport masse du cœur/longueur du tibia (A) et par la taille des cardiomyocytes en histologie (B et C); ns: non significatif; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$.

Nous avons ensuite analysé la fibrose myocardique car contrairement à l'hypertrophie, elle ne survient que dans des circonstances pathologiques. Ainsi, la coloration au rouge sirius des lames d'histologie a mis en évidence la présence d'une fibrose myocardique interstitielle uniquement chez les souris sédentaire HFD, ce qui implique un bénéfice de l'exercice physique sur le remodelage cardiaque et le développement de la matrice extracellulaire (figure 41).

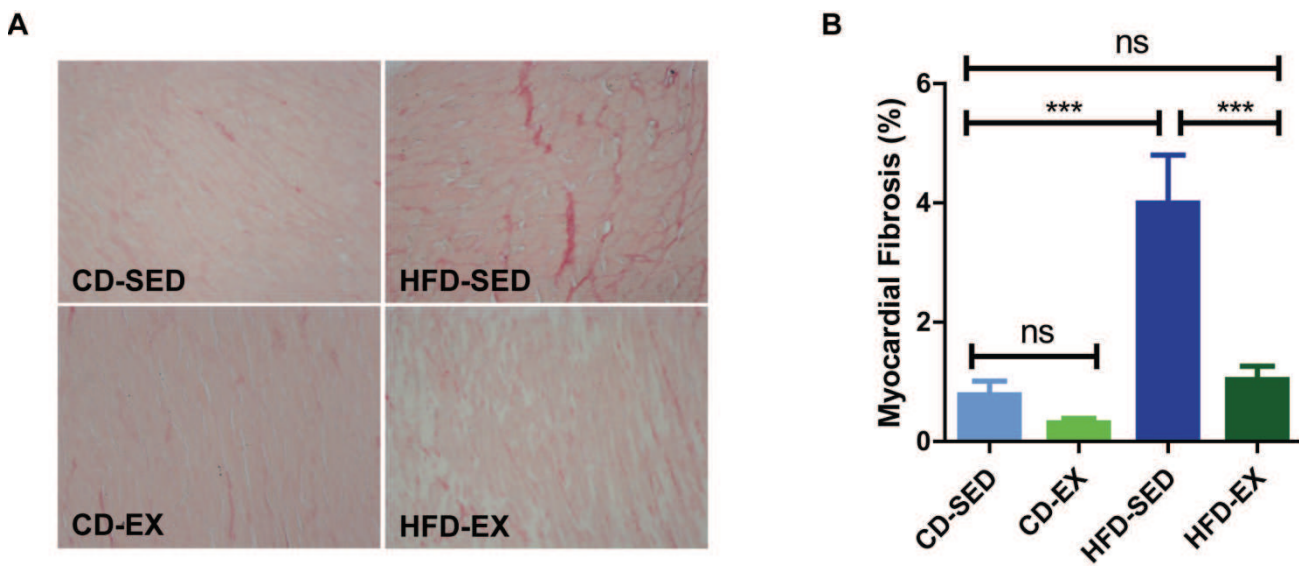


Figure 41. Analyse histologique avec quantification de la fibrose myocardique par coloration au rouge sirius des lames de myocarde ; ns: non significatif; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$.

4) Discussion

Cette étude démontre donc que l'exposition à un régime riche en graisse entraîne des troubles du métabolisme glucidique associés à un remodelage, une dysfonction avec modification du sécrétome, et une sénescence précoce du tissu adipeux.

Elle démontre également que la majorité de ces anomalies sont réversibles après une courte période d'exercice physique (4 semaines), alors même que le poids corporel et l'adiposité restent stables. Schafer et al. avait déjà démontré des résultats similaires mais sur de plus longues périodes d'exposition au régime (30 semaines) et à l'exercice (14 semaines)(50). Nos résultats sont donc concordants avec ceux déjà publiés et apportent en plus l'information qu'une courte exposition suffit à induire de profondes modifications du tissu adipeux au premier rang desquelles survient chronologiquement la sénescence cellulaire ; mais aussi une altération du remodelage et de la fonction cardiaque. Enfin il est intéressant de noter que les anomalies retrouvées au niveau du tissu adipeux, incluant le remodelage sans fibrose, n'étaient pas en lien avec un processus pro-inflammatoire classiquement décrit lors d'un régime HFD mais étaient associées au processus de sénescence du tissu adipeux.

Tout d'abord, l'exposition à un excès d'apport énergétique (sous forme de graisse dans notre étude) nécessite une augmentation des capacités de stockage. Comme vu précédemment, ce stockage se fait au niveau du tissu adipeux sous-cutané et viscéral, ce que nous avons également retrouvé dans notre étude. L'augmentation du poids corporel des souris était donc associée à une franche augmentation de la masse des différents sites du tissu adipeux, notamment au niveau viscéral. A cette augmentation de masse, s'associait une hypertrophie adipocytaire sans fibrose, aussi bien en sous-cutané qu'au niveau viscéral. De façon parallèle à cette augmentation de l'adiposité, apparaissaient des anomalies du métabolisme glucidique conduisant à une insulino-résistance. Se pose alors la question du lien entre remodelage du tissu adipeux et

troubles métaboliques : sont-ils liés au remodelage du tissu adipeux lui-même ou à une modification du sécrétome du tissu adipeux ?

Dans notre étude sur le modèle de souris HFD, nous avons remarqué que les taux plasmatiques des adipokines (adiponectine et leptine) impliquées dans les métabolismes glucidique et lipidique étaient perturbés en cas de régime HFD. Or, la seule source de production de ces adipokines est le tissu adipeux. Dans cette étude nous avons bien confirmé que la modification du taux plasmatique de ces adipokines était en rapport avec une variation de leur niveau de transcription dans le tissu adipeux. Il est donc probable que les perturbations métaboliques systémiques induites par le régime HFD soient liées à des modifications du sécrétome du tissu adipeux.

Cette hypothèse est soutenue par plusieurs éléments. Tout d'abord, nous avons observé dans le groupe HFD couplé à l'exercice une diminution de la transcription et du taux plasmatique de la leptine de façon concomitante à l'amélioration du métabolisme glucidique sans que le niveau d'adiposité globale ne change. D'autre part, une étude de 2002 parue dans *Diabetes* incluant des rats âgés et des rats mutés pour le récepteur tissulaire de la leptine, confirmait que l'ablation chirurgicale de la graisse permettait de restaurer un métabolisme glucidique correct, et qu'elle était associée à une nette diminution de la transcription et du taux plasmatique de leptine(35). Cependant, cette amélioration n'était observée que dans le groupe où la graisse viscérale était retirée, mais non dans le groupe avec ablation de la graisse sous-cutanée. Des études chez l'homme allaient dans le même sens. Ainsi, Klein et al. a démontré en 2004 que chez des patients obèses, la liposuction seule ne permettait pas d'améliorer le métabolisme glucidique, les concentrations plasmatiques en cytokines pro-inflammatoires ou en adiponectine, ni les facteurs de risque de la maladie athéromateuse(36). Au contraire, Thörne et al. a démontré en 2002 que l'adjonction d'une omentectomie à la mise en place d'un anneau gastrique chez des

patients sévèrement obèses, permettait d'améliorer significativement le métabolisme glucidique par rapport à l'anneau gastrique seul(37).

Dans notre étude, la perturbation de la transcription des adipokines prédominait également dans le tissu adipeux viscéral (surtout pour la diminution de l'adiponectine), cependant l'exercice ne permettait de diminuer la masse de tissu adipeux et les taux de leptine (plasmatique et de transcription) qu'au niveau sous-cutané. Il est donc possible que la baisse du taux de leptine, même si uniquement d'origine sous-cutanée, suffise à améliorer le métabolisme glucidique, et que l'ablation de la graisse viscérale aurait donné de meilleurs résultats. Un modèle de souris HFD avec ablation de la graisse viscérale serait donc intéressant pour étayer cette hypothèse.

L'autre information capitale de cette étude était l'apparition d'un vieillissement prématuré des adipocytes, or il est admis que cette sénescence peut engendrer une dysfonction du tissu adipeux, participer au développement d'une insulino-résistance et enfin avoir un impact sur des organes à distance (rôle sur la stéatose hépatique).

C'est la première étude explorant simultanément les modifications du tissu adipeux et du tissu cardiaque lors d'un régime HFD associé à l'exercice physique. Il est remarquable de noter l'amélioration simultanée de la fonction cardiaque avec la normalisation des paramètres du tissu adipeux. Si on ne peut exclure un bénéfice direct de l'exercice sur le plan myocardique en particulier via l'amélioration de la fonction mitochondriale des cardiomyocytes(51), on peut fortement suspecter l'existence d'un dialogue entre tissu adipeux viscéral et tissu cardiaque. Afin de confirmer de façon formelle le rôle d'un tel « cross-talk » entre tissu adipeux viscéral et cœur, il est important de réaliser une ablation chirurgicale de la graisse épidydimale afin d'établir la preuve de concept de l'implication du sécrétome de ce tissu adipeux remodelé et sénescant dans la genèse de la fibrose myocardique interstitielle et de la dysfonction systolique associée.

5) Conclusion

A ce stade nos travaux nous permettent de conclure que le régime HFD entraîne un stockage excessif et atypique de la graisse. Ce stockage anarchique est lui-même responsable de troubles cardiaques, incluant une dysfonction contractile en rapport avec un remodelage et un processus pro-apoptotique et pro-fibrotique, et d'anomalies du tissu adipeux, incluant un remodelage et une sénescence précoce associée à une modification du tissu adipeux en faveur d'un sécrétome pro-fibrotique.

VIII. Cardiopathie métabolique : un modèle de sénescence cardiaque prématurée ?

1) Problématique

Dans un premier temps, nous avons confirmé que le régime HFD induisait une cardiopathie métabolique ainsi qu'une modification du sécrétome du tissu adipeux et une sénescence précoce du tissu adipeux. Dans un deuxième temps, nous avons démontré que l'exercice physique permettait de prévenir la dysfonction cardiaque induite par le régime HFD ainsi que le remodelage et la sénescence du tissu adipeux. Pour confirmer de façon formelle le rôle du tissu adipeux viscéral dans la survenue des altérations cardiaques et établir la preuve de concept que les anomalies cardiaques induites par le régime HFD sont liées à une sénescence accélérée du tissu adipeux viscéral, nous avons décidé de mettre au point un protocole d'ablation du tissu adipeux viscéral épидидymal chez la souris.

2) Matériel et méthodes

Nous avons repris notre modèle de souris HFD de 5 mois (non mutées, males) ainsi que toutes les méthodes d'évaluation des précédents travaux : évaluation métabolique, évaluation de la fonction cardiaque, évaluation de la fibrose et de la sénescence.

Nous avons dans cette étude adjoint la réalisation d'une ablation du tissu adipeux viscéral (Figure 42). Nous avons utilisé 30 souris réparties selon deux groupes : groupe EWATectomy (n=20) et groupe chirurgie blanche (n=10). Immédiatement après la chirurgie, les souris ont été soumises au régime HFD durant 15 semaines. Avant la chirurgie et au bout des 15 semaines, les souris ont eu une évaluation métabolique et échocardiographique. L'évaluation hémodynamique in-vivo était réalisée immédiatement avant le sacrifice (après les 15 semaines de HFD) et les prélèvements sanguins et tissulaires au moment du sacrifice.

Les souris étaient anesthésiées par inhalation de d'isoflurane à 3% puis une laparotomie médiane de 1cm était réalisée. La graisse épididymale était sectionnée de façon bilatérale dans la cavité péritonéale à l'aide d'un bistouri électrique en prenant bien garde à ne pas endommager les vaisseaux testiculaires et les vésicules séminales. La graisse ainsi ablatée était placée dans une compresse chirurgicale stérile humidifiée. La cavité péritonéale était ensuite suturée avec du fil résorbable et la peau avec du fil de soie (Angiotech, USA). Une injection intrapéritonéale de 2,5mg/kg de buprénorphine (Sigma-Aldrich, France) à visée antalgique était administrée en fin d'intervention. Le groupe contrôle avait une chirurgie blanche (Sham, n=10), c'est-à-dire que les souris avaient exactement le même protocole mais sans résection de tissu adipeux. Les souris étaient ensuite laissées au calme avec une surveillance régulière. Aucune souris n'est décédée de l'intervention et leur poids est resté inchangé. Cinq semaines après la chirurgie, les souris avaient une nouvelle évaluation métabolique et échocardiographique, puis l'évaluation hémodynamique suivie du sacrifice pour les prélèvements sanguins et tissulaires.

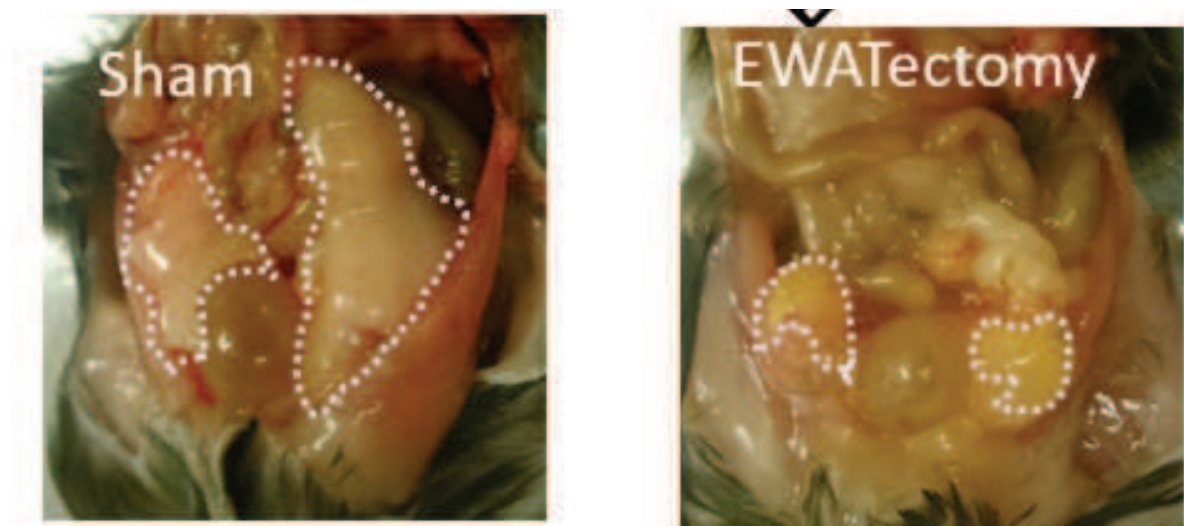


Figure 42. Résultat anatomique de l'ablation du tissu adipeux viscéral (EWATectomy) chez la souris

3) Résultats

Cette étude est en cours et nous présentons ici les résultats préliminaires mais encourageants confirmant la preuve de concept de l'existence d'un dialogue entre tissu adipeux viscéral et cœur au cours d'un régime HFD responsable d'une sénescence accélérée du tissu adipeux.

Tout d'abord, l'ablation du tissu adipeux viscéral entraîne une faible baisse de l'adiposité totale car la perte de la masse adipeuse viscérale était compensée par une légère augmentation de la masse des autres dépôts adipeux (Figure 43).

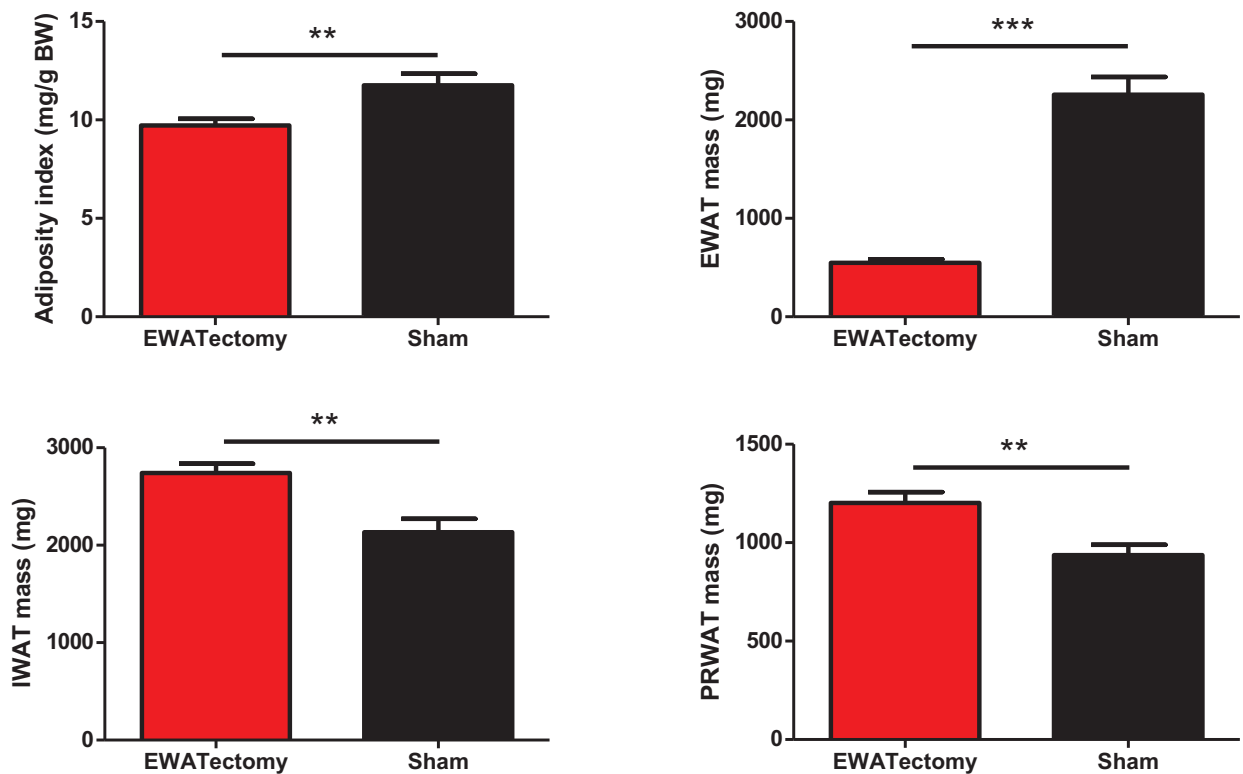


Figure 43. Répartition de la masse des différentes zones de tissu adipeux entre les groupes EWATectomy et chirurgie blanche. IWAT : inguinal, EWAT : épидidymal, PRWAT : péri-rénal, WAT : white adipose tissu.

Sur le plan métabolique, l'ablation du tissu adipeux viscéral ne permettait pas de normaliser les tests de tolérance au glucose ou à l'insuline (Figure 44).

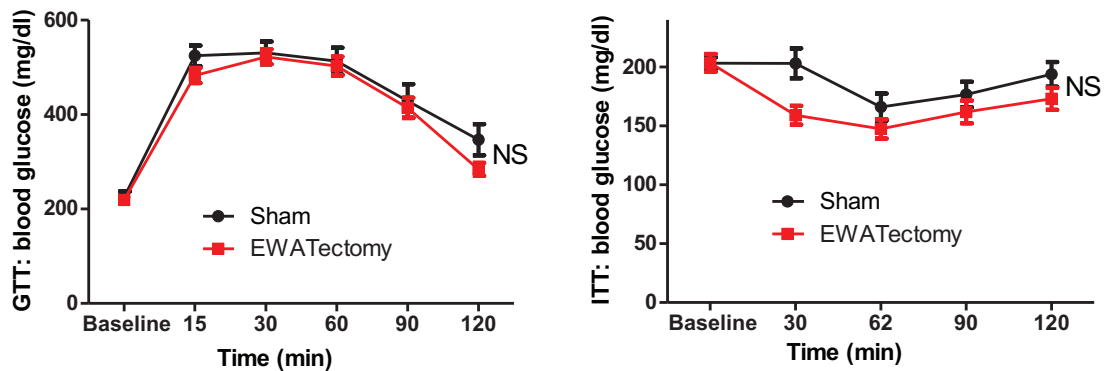


Figure 44. Tests métaboliques de tolérance au glucose (gauche) et à l'insuline (droite) entre les groupes EWATectomy et chirurgie blanche.

De façon intéressante, les souris ayant subi l'ablation du tissu adipeux viscéral amélioraient leur fonction cardiaque (en échographie et in-vivo, Figure 45), et cette amélioration était associée à une diminution de la fibrose myocardique interstitielle (Figure 46).

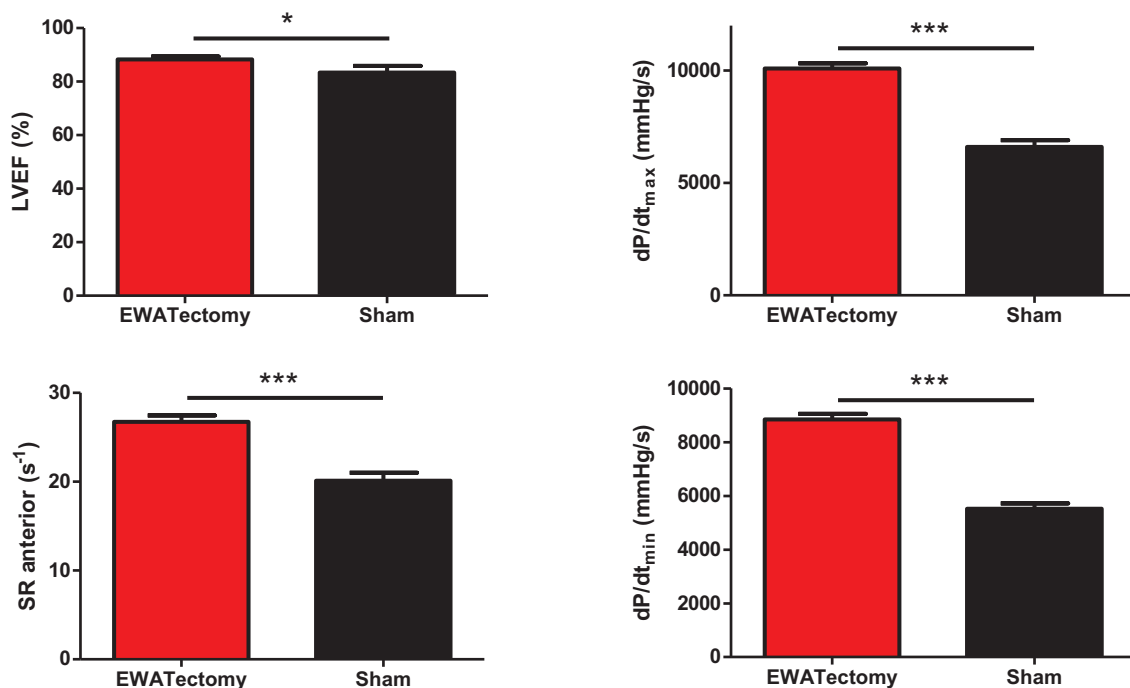


Figure 45. Fonction cardiaque en échocardiographie (LVEF et strain rate) à gauche et en hémodynamique in-vivo à droite entre les groupes EWATectomy et chirurgie blanche.

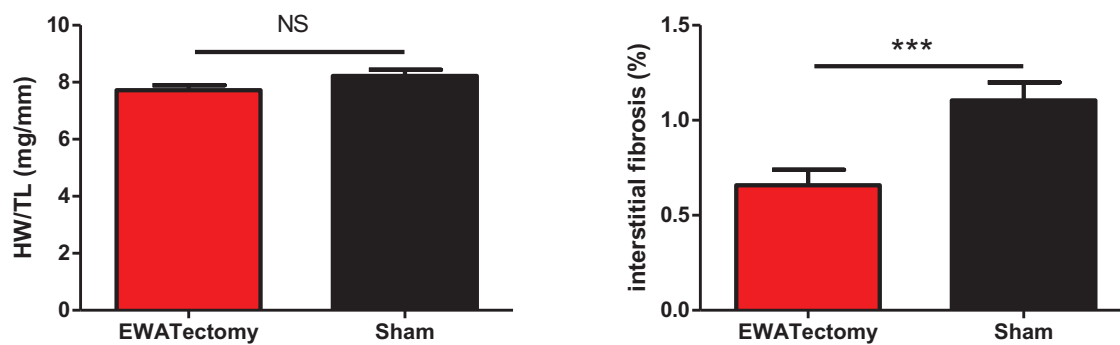


Figure 46. Remodelage cardiaque (à gauche) et fibrose interstitielle myocardique (à droite) entre les groupes EWATectomy et chirurgie blanche.

Cette amélioration spectaculaire des paramètres de fonction cardiaque après ablation du tissu adipeux viscéral confirme l'existence d'un dialogue entre tissu adipeux et cœur et pose la question des acteurs de ce dialogue.

Nous émettons l'hypothèse que les cytokines et adipokines sécrétées par le tissu adipeux viscéral jouent un rôle de premier plan, en particulier les cytokines pro-fibrosantes telles que TGF β , leptine et ostéopontine dont le dosage est en cours.

Cette hypothèse est confortée par les résultats d'une étude que nous avons réalisée sur le rôle prépondérant de TGF β et de l'ostéopontine dans le vieillissement cardiaque.

IX. L'ostéopontine : un acteur clé du dialogue entre tissu adipeux et cœur dans le contexte du vieillissement

1) Problématique

Nous avons donc authentifié chez les souris exposées au régime HFD, d'une part le développement d'une cardiopathie métabolique et d'autre part l'apparition d'une sénescence précoce du tissu adipeux associée à une modification de son sécrétome. Nous avons confirmé le rôle du tissu adipeux viscéral dans la survenue des altérations cardiaques et établi la preuve de concept que les anomalies cardiaques induites par le régime HFD sont liées à une sénescence accélérée du tissu adipeux par une étude associant l'ablation du tissu adipeux viscéral épидидymal au régime HFD chez la souris.

Compte tenu de la modification du sécrétome du tissu adipeux associé à un profil pro-fibrosant et à une sénescence cellulaire du tissu adipeux, nous avons formulé l'hypothèse que l'ostéopontine, membre de la famille SIBLING (Small Integrin-Binding Ligand N-linked Glycoproteins) pouvait être impliquée dans le dialogue entre tissus adipeux et cardiaque.

Nous avons donc étudié son rôle dans le cadre du processus de vieillissement physiologique dans une première étape. Ce travail a donné lieu à la rédaction d'un article soumis à Circulation et en révision favorable dans lequel je suis deuxième auteur.

Nous commencerons la présentation de ce travail par un rappel sur la matrice extracellulaire et le rôle de l'ostéopontine.

La matrice extracellulaire (MEC) :

La matrice extracellulaire (MEC) est le composant non cellulaire présent dans tous les tissus et organes, constitué d'une variété de molécules de structure et de signalisation sécrétées à partir de cellules mésenchymateuses différenciées comprenant notamment les fibroblastes.

La MEC est un système complexe de par sa composition, sa structure et sa grande variabilité en fonction des conditions physiologiques et pathologiques. Les constituants de la matrice extracellulaire ont de nombreux domaines de liaison avec les cellules, facilitant l'adhésion de celles-ci et leur organisation en tissus.

Bien que la MEC ait été considérée pendant longtemps comme une structure inerte, ses activités sont multiples. La MEC joue différents rôles physiologiques selon les facteurs de croissance de liaison et d'interaction avec les récepteurs de surface cellulaire, dans le soutien structural, dans la régulation du comportement des cellules en influant sur leur différenciation, prolifération, l'adhérence, la nutrition, le stockage moléculaire, support des migrations cellulaires et la régulation de leurs fonctions.

Les différents composants de la MEC sont dégradés par différentes protéinases (en particulier, les métalloprotéinases et le système plasmine/activateurs du plasminogène). Le renouvellement de la MEC est déterminant dans la croissance, le développement ou la réparation des tissus, mais intervient aussi dans de nombreux processus pathologiques (cancérogenèse, inflammation, etc.).

La MEC est principalement constituée de 3 types de macromolécules :

- les fibres constituées de collagène ou d'élastine ;
- de glycoprotéines (moins abondantes que les fibres) jouant un rôle important dans l'adhérence cellulaire. Les principales glycoprotéines matricielles sont la fibronectine, la laminine, l'ostéopontine, la vitronectine, la tenascine ;
- des polysaccharides très hydratés représentant le gel de remplissage de la matrice.

L'ostéopontine (OPN) :

L'ostéopontine (OPN, du grec Osteo= os et pontin= pont) est une glycoprotéine phosphorylée de la MEC, exprimée par de nombreux tissus et différents types de cellules. L'OPN est

considérée comme une protéine structurale faisant un pont entre les cellules et la MEC par l'intermédiaire de sa séquence RGD (arginine-glycine-acide aspartique) et par le motif polyacide aspartique présent dans la séquence primaire de la protéine(52).

L'OPN a plusieurs appellations selon le site où elle est présente. Elle est aussi appelée BSPII (bone sialoprotein II), Spp1 (secreted phosphoprotein I), uropontin (OPN isolée à partir de l'urine) ainsi que lactopontine (OPN du lait). L'OPN fut également identifiée comme une lymphokine potentielle, produite par les lymphocytes activés et les macrophages sous le nom d'Eta-1 (early T-lymphocyte activation gene 1)(53). Cette pluralité de noms représente la multifonctionnalité de l'OPN. Le comité officiel de nomenclature HUGO, chargé de définir les noms des gènes humains, a choisi le terme secreted phosphoprotein 1 pour l'OPN. Néanmoins, le nom d'ostéopontine a largement été retenu et gardé pour la nomenclature du gène humain(54).

L'OPN fait partie de la famille des SIBLING (Small Integrin-Binding Ligand NlinkedGlycoproteins), famille de cinq glycoposphoprotéines comprenant outre l'ostéopontine (OPN), la sialoprotéine osseuse (Bone Sialoprotein, BSP), la protéine de la dentine matricielle 1 (Dentin Matrix Protein, DMP1), MEPE (Matrix Extracellular Phosphoglycoprotein) et la sialophosphoprotéine de la dentine (Dentin SialoPhosphoProtein, DSPP)(55).

Les SIBLINGs sont un groupe émergent d'outils moléculaires que les cellules cancéreuses utilisent pour faciliter leur expansion. L'OPN est probablement le membre de la famille des SIBLINGs le mieux étudié à ce jour. Elle est la seule SIBLING pour laquelle il existe des preuves irréfutables de son rôle dans de nombreuses étapes du développement du cancer et de sa progression. Lorsque ces protéines sont sécrétées, elles peuvent agir en tant que modulateurs de l'adhésion cellulaire et des facteurs autocrines et paracrines, par leur interaction avec les récepteurs de surface cellulaire tels que les intégrines.

Sa présence dans différents organes (l'os, la dentine, les glandes mammaires, le rein, le cerveau, les ganglions de l'oreille interne) et sa sécrétion par les cellules épithéliales dans de nombreux liquides biologiques (la bile, le sang, l'urine, le lait et le liquide séminal) suggèrent qu'elle est à la fois une molécule structurale, un facteur humoral et une cytokine(56). Cette large expression nécessite une régulation transcriptionnelle très spécifique en fonction du système tissulaire dans lequel elle est retrouvée. L'expression de l'OPN est ainsi modulée par un grand nombre d'hormones, de cytokines ainsi que de facteurs de croissance qui peuvent influencer la transcription du gène, l'épissage de l'ARNm, sa stabilité et sa traduction(57). Dans les macrophages activés, l'expression de l'OPN est induite par les lipopolysaccharides (LPS) et l'oxyde nitrique (NO)(58, 59). Les inducteurs de l'inflammation tels que le TNF α et l'interleukine 1 augmentent fortement l'expression de l'OPN(60), de même que plusieurs facteurs de croissance et de différenciation tels que l'EGF (epidermal growth factor), le PDGF (platelet-derived growth factor), le TGF β (transforming growth factor) et les BMPs (bone morphogenetic proteins)(57, 61).

La protéine ostéopontine humaine comporte 314 acides aminés et a un poids moléculaire variant entre 41 et 70 kDa selon l'épissage alternatif et les modifications post-traductionnelles par glycosylation et phosphorylation(62). La structure primaire de l'OPN met en évidence la présence de domaines spécifiques de clivage et de liaison aux intégrines, au calcium, à l'hydroxyapatite. Ces domaines sont impliqués dans les différentes fonctions physiopathologiques attribuées à l'OPN : inflammation, lactation, réponse à un stress (mécanique, biochimique, lésion tissulaire), minéralisation et processus métastatique.

À l'extrémité N-terminale de la protéine, un peptide signal est responsable de la régulation de la sécrétion d'OPN, une fois clivée la protéine est sécrétée. Le domaine riche en aspartate se lie fortement à l'hydroxyapatite. Le 2ème domaine, le plus important dans la protéine, est la séquence RGD ou arginine-glycine-aspartate. Cette séquence est présente chez tous les

membres de la famille SIBLING, et elle est particulièrement importante, après phosphorylation, pour la liaison aux intégrines $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha 8\beta 1$. Cette liaison est rendue possible après clivage de la protéine par la thrombine. Suit le domaine RGD, une séquence de 6 acides aminés permettant la liaison à d'autres intégrines dont la plus importante est l'intégrine $\alpha 9\beta 1$ qui est surexprimée dans 50 % des cancers colorectaux. La protéine comporte également un site de liaison au calcium et un dernier domaine, en C terminal, qui permet la liaison par un pont héparine au variant 6 du CD44 (CD44v6) mais aussi le variant 3(63).

La régulation des interactions multiples de l'OPN passe principalement par les modifications post-traductionnelles de la protéine telles que la phosphorylation, la glycosylation, la sulfatation et la transglutamination(64). La transglutamination permet à l'OPN de se lier à certains éléments de la matrice extracellulaire. L'OPN se lie de façon covalente à la fibronectine et au collagène de type 1(65, 66). La transglutamination va permettre également aux cellules cancéreuses de s'attacher à l'OPN dans des sites secondaires et ainsi former des métastases(67). L'OPN peut être clivée par la thrombine en libérant le motif RGD ce qui peut altérer la fonction et exposer le site de liaison aux intégrines. L'OPN humaine est également un substrat pour les métalloprotéinases matricielles comme la MMP-3 (stromélysine-1) et MMP-7 (matrilysine)(68). Le clivage de l'OPN augmenterait l'adhérence et la migration cellulaire via les intégrines. L'OPN interagit avec différents récepteurs de type intégrine et le récepteur CD44, de manière dépendante ou indépendante du motif RGD :

- La liaison de l'OPN aux différents dimères d'intégrines pourrait expliquer la multitude des fonctions et des voies de signalisation que peut activer l'OPN. Parmi ces fonctions, on trouve l'attachement cellulaire, la migration des cellules, leur survie, le chimiotactisme et une signalisation intracellulaire dans différentes cellules

- Le CD44, récepteur de l'acide hyaluronique, a également été identifié comme un récepteur pour l'OPN(69). Cette interaction est impliquée dans la migration des macrophages et des cellules tumorales.

Les fonctions de l'OPN sont donc pléiotropiques dans de nombreux tissus, permettant ainsi de favoriser et faciliter l'adhésion, la migration d'une variété de types cellulaires par interaction avec les différents variants de l'intégrine et de CD44. L'OPN est également une cytokine qui active de nombreuses voies de signalisation cellulaire et de survie(56).

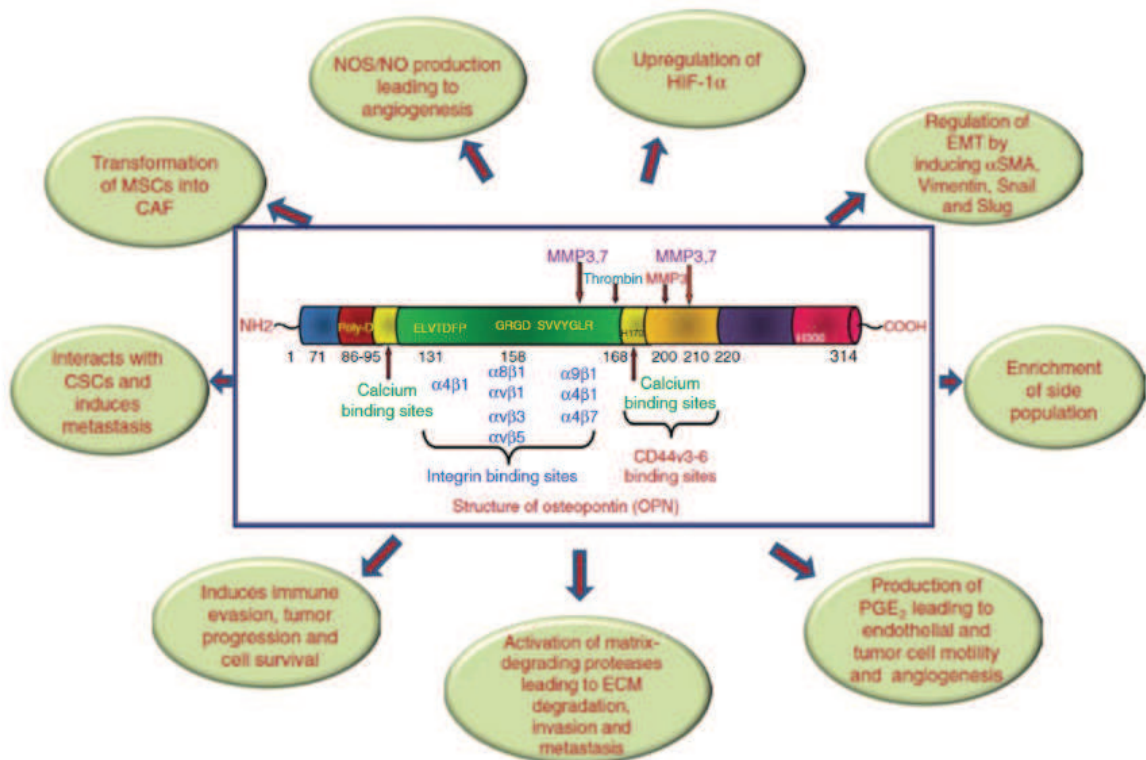


Figure 47. Les différents domaines de l'OPN, ses récepteurs et ses fonctions (CAF fibroblastes associés au cancer, CSC : cellules souches du cancer ; EMT : transition épithéliomésenchymateuse/ MSC : cellules souches mésenchymateuses ; PGE₂ : prostaglandine E₂) d'après Bandopadhyay et al, 2014.

L'OPN est considérée comme une molécule pro-inflammatoire majeure jouant un rôle actif dans différentes maladies immunologiques ou infectieuses. L'OPN peut se lier aux leucocytes activés et aux macrophages afin de changer le profil de sécrétion des cytokines et activer la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'interféron γ ou l'interleukine 12(70), et inhiber la sécrétion de cytokines régulatrices telles que l'interleukine-10(59).

Enfin l'OPN est une cible du gène suppresseur de tumeur TP53 et joue donc un rôle important dans le processus de sénescence cellulaire. La stimulation de l'expression de l'OPN par p53 empêcherait les cellules ayant un ADN endommagé d'entrer dans un cycle de transformation cancéreuse(71). Pazolli a identifié l'OPN par microarray, comme l'un des transcripts les plus élevés dans les fibroblastes sénescents(72). In vivo, les macrophages intramusculaires de souris âgées produisent des taux élevés d'OPN par rapport aux souris jeunes(73).

Compte tenu des données récentes de notre groupe concernant l'augmentation de l'expression et de la sécrétion d'OPN avec l'âge(74), nous nous sommes intéressés au rôle de l'ostéopontine dans le processus de vieillissement cardiaque et avons posé la question de la source principale d'OPN avec le vieillissement physiologique ainsi que du rôle du tissu adipeux viscéral. Nous avons par ailleurs étudié des souris déficientes en OPN (souris OPN^{-/-}) afin de mieux comprendre le rôle de l'OPN dans le vieillissement cardiaque.

2) Matériel et méthodes

a) Le modèle animal

Nous avons repris les mêmes souris C57/BL6J non mutées (groupe sauvage) que précédemment, ainsi que des souris déficientes (homozygote) pour le gène de l'ostéopontine (groupe OPN). Les souris OPN (B6.129S6(Cg)-Spp1tm1Blh/J) provenaient du laboratoire Jackson (ME, USA). Les conditions d'hébergement ainsi que la nourriture (CD) étaient similaires aux précédentes études. Les souris avaient chaque mois la mesure de leur poids, les tests métaboliques et l'échocardiographie. L'évaluation hémodynamique était faite immédiatement avant le sacrifice.

b) Protocole d'ablation du tissu adipeux viscéral

Nous avons utilisé 20 souris sauvages (n=10 par groupe) âgées de 12 mois (poids 28-36g) pour ce protocole. L'ablation du tissu adipeux viscéral concernait la graisse épидидymale (groupe EWATectomy, n=10). Avant cette chirurgie, les souris ont eu une évaluation complète (tests métaboliques et échocardiographie). Les souris étaient anesthésiées par inhalation de d'isoflurane à 3% puis une laparotomie médiane de 1cm était réalisée. La graisse épидидymale était sectionnée de façon bilatérale dans la cavité péritonéale à l'aide d'un bistouri électrique en prenant bien garde à ne pas endommager les vaisseaux testiculaires et les vésicules séminales. La graisse ainsi ablatée était placée dans une compresse chirurgicale stérile humidifiée. La cavité péritonéale était ensuite suturée avec du fil résorbable et la peau avec du fil de soie (Angiotech, USA). Une injection intrapéritonéale de 2,5mg/kg de buprénorphine (Sigma-Aldrich, France) à visée antalgique était administrée en fin d'intervention. Le groupe comparateur avait une chirurgie blanche (Sham, n=10), c'est-à-dire que les souris avaient exactement le même protocole mais sans résection de tissu adipeux. Les souris étaient ensuite laissées au calme avec une surveillance régulière. Aucune souris n'est décédée de l'intervention

et leur poids est resté inchangé. Cinq semaines après la chirurgie, les souris avaient une nouvelle évaluation métabolique et échocardiographique, puis l'évaluation hémodynamique suivie du sacrifice pour les prélèvements sanguins et tissulaires.

c) Inhibition pharmacologique de l'ostéopontine

Nous avons également utilisé 20 souris sauvages âgées de 12 mois (poids 28-35g). La molécule administrée était de l'agélastatine A (AA), fournie par le Pr Takehiko Yoshimitsu de l'école des sciences pharmaceutique de l'université d'Okayama au Japon. L'AA permet d'inhiber *in vivo* la production d'OPN. L'AA était diluée avec de l'eau avec 1/10^{ème} de 2-hydroxypropyle- β -cyclodextrine (Sigma-Aldrich) pour le rendre hydrosoluble. Après l'évaluation basale des fonctions métabolique et cardiaque, les souris ont eu tous les 4 jours pendant 4 semaines une injection intrapéritonéale de 1,5mg/kg d'AA ou de placebo. Le poids corporel était recueilli avant chaque injection. Après l'évaluation métabolique et cardiaque finale, les souris ont eu une évaluation hémodynamique *in-vivo* suivie du sacrifice par dislocation cervicale. Puis, les organes et le sang étaient récoltés et préparés pour d'autres analyses.

d) Tissus humains d'oreillette cardiaque

Des échantillons de tissu humain (auricule droit) étaient recueillis chez des patients ayant une chirurgie cardiaque programmée et provenaient d'une collection de tissu atrial réalisé par l'équipe du Professeur Stéphane Hatem à l'Hôpital de la Pitié-Salpêtrière. Ce tissu était prélevé au niveau du site de canulation veineuse. Chaque patient avait donné son consentement, après approbation du protocole par le Comité d'Ethique de la Pitié-Salpêtrière (Comité de Protection des Personnes, Ile-de-France VI).

e) Cultures cellulaires et traitements

La culture primaire de fibroblastes cardiaques néonataux de souris a été réalisée avec le système Neonatal Cardiomyocyte Isolation (Worthington Biochemical, NJ, USA) selon les instructions du fabricant. En résumé, les souris C57 / BL6JRj néonatales (Janvier) étaient euthanasiées par décapitation, et leurs ventricules étaient séparés et coupés en morceaux dans une solution salée glacée. Les cœurs coupés étaient incubés dans une solution salée à 4°C contenant de la trypsine pendant 24 heures, puis étaient encore digérés par 300 U / mL de collagénase de type 2 à 37°C pendant 30 à 45 minutes. Les cellules en suspension étaient filtrées à l'aide d'un tamis de 70 µm puis placées dans une boîte de pétri contenant un milieu spécifique (Medium 199, Gibco and Life Technologies, France) supplémenté avec du sérum de veau à 10%. Trente minutes plus tard, les cellules flottantes étaient retirées et les cellules attachées étaient considérées comme étant des fibroblastes cardiaques. Les fibroblastes cardiaques purifiés étaient ensuite placés sur des plaques de culture à 12 puits à une densité de 2×10^5 cellules / puits. Après une privation de 24 heures, les cellules ont été stimulées avec du plasma (25%) pendant 24 heures.

f) Tests métaboliques, échocardiographie et mesures hémodynamiques

Le protocole de réalisation de ces examens était strictement identique au protocole de la première étude sur le modèle de cardiopathie métabolique. Après l'analyse hémodynamique in-vivo, le sang était prélevé dans l'artère carotide à l'aide d'un tube EDTA (SARSTEDT, Allemagne) puis centrifugé 10 minutes puis congelé et conservé à -80°C. Les souris étaient sacrifiées juste après par dislocation cervicale.

g) Analyse histologique et activité de la SA-β-galactosidase

Ces deux analyses étaient réalisées selon le même protocole que vu précédemment.

h) PCR quantitative

L'ARN total était extrait d'échantillons d'organes réduit en poudre à l'aide d'un kit dédié (Qiagen, France). L'ARN issu des fibroblastes cardiaques en culture était également extrait à l'aide d'un kit Qiagen, selon les instructions du fabricant. Le premier brin d'ADN était amplifié à partir de 0,5-1,0 µg d'ARN total à l'aide du kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit et d'un thermo cycler SimpliAmp (Applied Biosystems, CA, USA), selon les instructions du fabricant. La PCR quantitative était réalisée et analysée avec une amorce TaqMan® et le système StepOne™ Real-Time PCR (Applied Biosystems). Le gène de β-actin était utilisé comme contrôle.

i) Western Blot

Vingt mg de myocarde en poudre ou 80 mg de tissus adipeux étaient homogénéisés dans un tampon "Platonic" à base d'urée (7M), 10% de glycérol, 10 mM de Tris-HCl (pH 6,8), 1% de SDS, 1 mM de dithiothréitol, associé à un cocktail de protéase et d'inhibiteur de phosphatase (Pierce, France). Après le vortex, les lysats étaient passés à travers une aiguille 21G au moins 6 fois, puis mélangés pendant 30 minutes à 4°C et enfin centrifugés pour obtenir le surnageant. La concentration en protéines était ajustée selon la méthode de Bradford (Bio-rad, France). La totalité des protéines dénaturées (20µg) était chargée à 10% de SDS-PAGE. Les protéines séparées étaient transférées sur des membranes PVDF (Invitrogen), bloquées par un tampon TBS-Tween (0,1%) et marquées par des anticorps primaires spécifiques pour des protéines sélectionnées à 4°C pendant une nuit. Les membranes étaient ensuite incubées avec un anticorps secondaire (Abcam). La quantification par densitomètre était normalisée aux taux de β-actine dans chaque échantillon.

j) Dosage des cytokines et adipokines

Méthode identique à la première étude en utilisant le Luminex. Les marqueurs plasmatiques dosés étaient l'OPN, le TGF β 1 et le BNP. L'OPN au niveau du tissu adipeux était également quantifiée.

3) Résultats

a) Le tissu adipeux viscéral est une source importante d'OPN

Tout d'abord nous avons remarqué que le taux plasmatique d'OPN chez la souris sauvage âgée était plus élevé que chez la souris jeune (Figure 48A). L'étude par PCR nous a permis d'identifier le tissu adipeux viscéral (épididymal : EWAT) comme étant la source principale d'OPN (Figure 48B), ce qui était confirmé en immunofluorescence et en Western Blot (Figure 48C, D). Par contre, l'analyse du myocarde des souris sauvages âgées retrouvait très peu d'OPN et aucun signal n'était détectable en Western Blot (Figure 48E, F). Sur les prélèvements humains de personnes âgées, l'OPN était très abondante au niveau de la graisse épiscopordique (donc viscérale) mais très peu présente dans le myocarde atrial (Figure 48G).

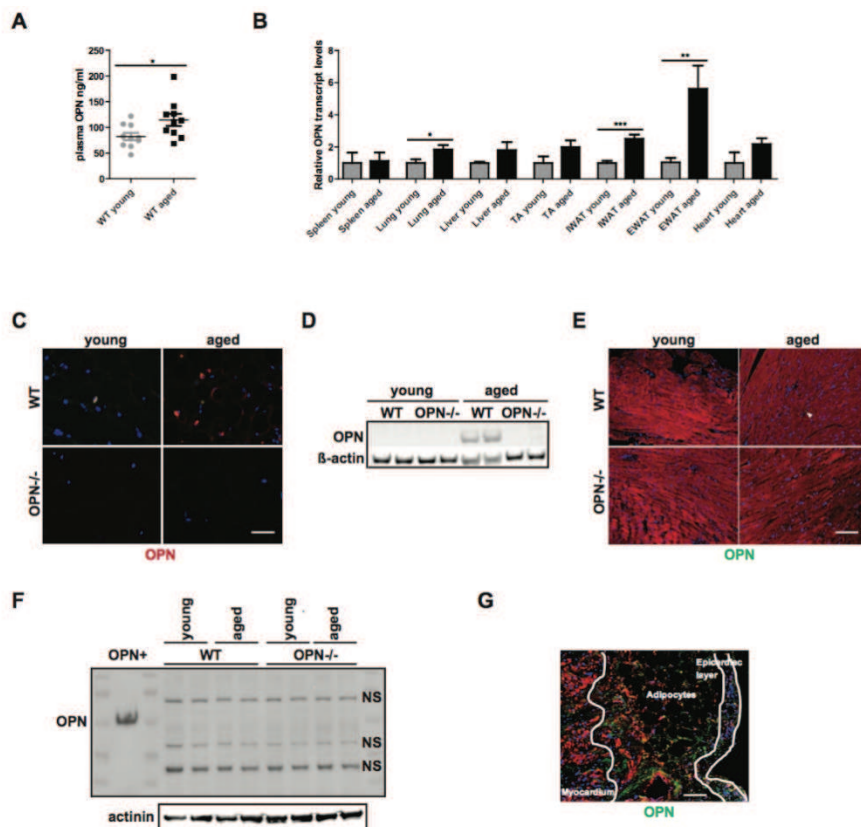


Figure 48. Identification du tissu adipeux viscéral comme principale source de production de l'ostéopontine.

b) Le tissu adipeux viscéral joue un rôle clé dans l'induction de la fibrose et la dysfonction myocardique au cours du vieillissement

Comme précédemment observé, les souris âgées avaient un taux plasmatique de TGF β 1, de TGF β 2 et de leptine plus élevé que les jeunes. La culture de graisse viscérale (EWAT) confirmait que ces biomarqueurs étaient sécrétés de façon plus importante chez les souris âgées que chez les jeunes. Durant le vieillissement, le tissu adipeux viscéral joue donc un rôle clé dans la libération de substances pro-fibrotiques. Nous avons observé dans une précédente étude que le vieillissement était associé au développement d'une fibrose et d'une dysfonction cardiaque. Nous avons donc émis l'hypothèse que ces anomalies cardiaques pouvaient être secondaires à l'action des substances sécrétées par le tissu adipeux viscéral. Nous avons donc décidé de réaliser une ablation de la graisse viscérale épидидymale (EWATectomy) chez des souris sauvages âgées et de les suivre sur le plan cardiaque (protocole selon Figure 49).

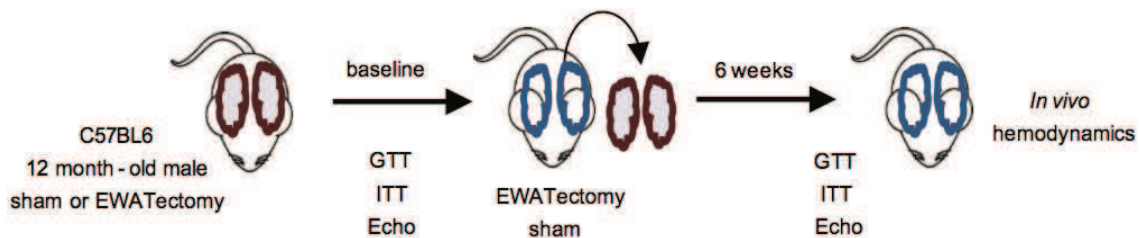


Figure 49. Protocole d'EWATectomy.

L'intervention entraînait une diminution significative de la masse d'EWAT mais pas de la masse corporelle de la souris (Figure 50B, C) en raison d'une augmentation de la masse des autres portions de tissu adipeux. De façon intéressante, les taux plasmatiques d'OPNet de TGF β 1 étaient diminués dans le groupe EWATectomy en comparaison du groupe chirurgie blanche (Figure 50D, E). De même, le niveau de fibrose interstitielle myocardique était nettement plus bas dans le groupe EWATectomy (Figure 50F), ainsi que le taux de fibroblastes

et que le niveau de phosphorylation de Smad3 (Figure 50G, H). Sur le plan fonctionnel, le groupe EWATectomy améliorait sa fonction cardiaque à la fin du suivi, aussi bien en échocardiographie qu'en hémodynamique in-vivo (Figure 50I, J). Par ailleurs, les paramètres métaboliques étaient similaires dans les deux groupes. Il est donc probable que les altérations myocardiques au cours du vieillissement soient secondaires à la sécrétion par le tissu adipeux des souris âgées de substances pro-fibrotiques comme l'OPN et le TGF β .

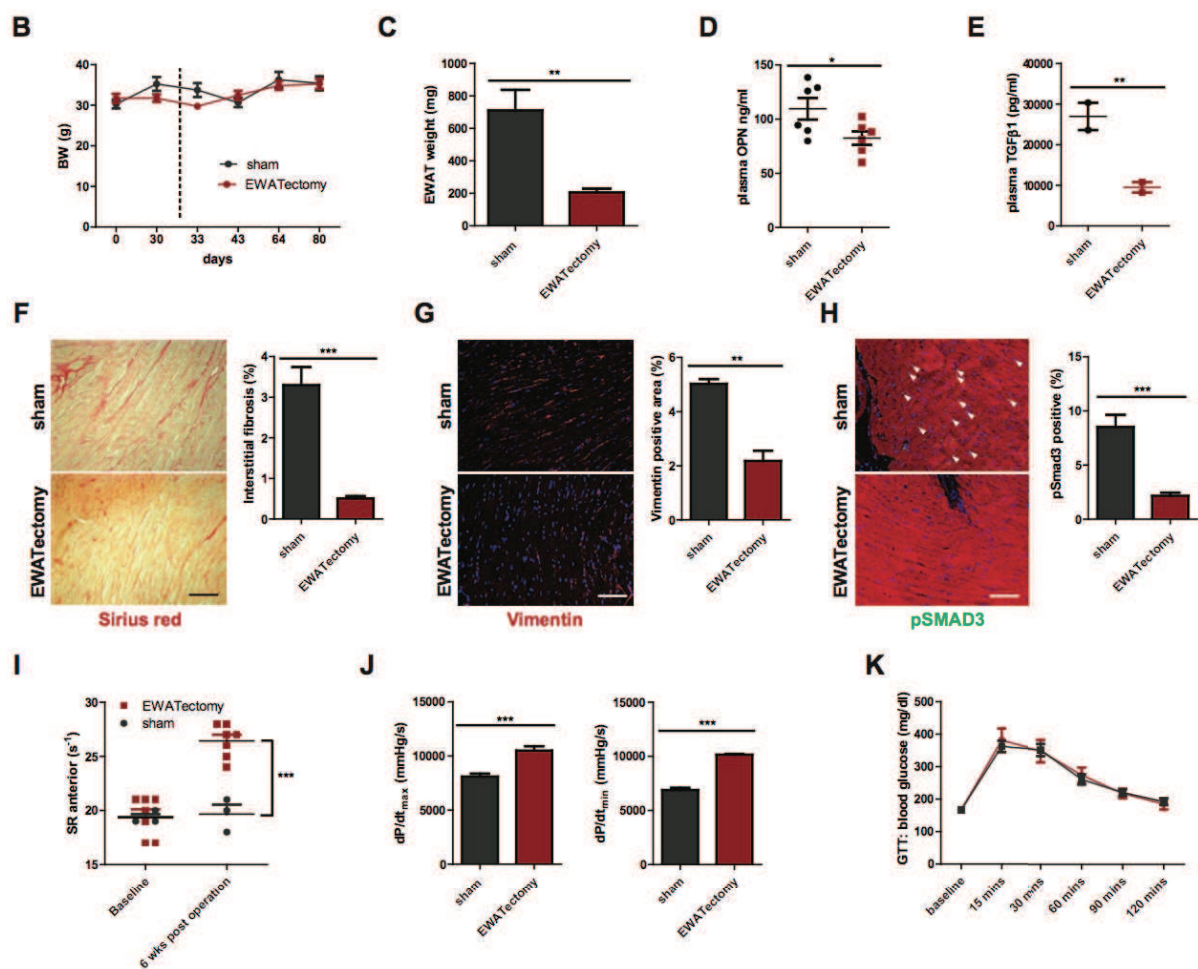


Figure 50. Description du phénotype cardiaque (fibrose et dysfonction).

c) Les souris déficientes pour l'OPN sont protégées du vieillissement cardiaque

Nous avons évalué des souris sauvages et des souris déficientes pour l'OPN à l'âge de 2 et 14 mois. Concernant l'hypertrophie, le rapport poids du cœur/longueur tibiale n'augmentait avec l'âge que chez les souris sauvages, alors que la taille des cardiomyocytes augmentait dans les deux groupes. Concernant la fibrose myocardique, seules les souris sauvages développaient de la fibrose avec l'âge (souris jeunes prises comme référence), en association avec une augmentation du taux de fibroblastes et du niveau de phosphorylation de Smad3 (Figure 51A à D). De même, le taux plasmatique en TGF β 1 et 2 augmentait avec l'âge dans le groupe sauvage alors que les souris OPN déficientes âgées avaient un taux similaire aux souris jeunes. L'analyse par PCR du myocarde montrait une nette différence dans le taux de protéines de la matrice extracellulaire entre les deux groupes âgés avec un taux plus bas dans le groupe muté pour l'OPN (Figure 51E). Concernant la fonction cardiaque, la FEVG restait stable dans les deux groupes au cours du vieillissement alors que le strain rate était diminué uniquement dans le groupe sauvage âgé (Figure 51F). Ce résultat était confirmé par les mesures hémodynamiques in-vivo. Les souris déficientes pour l'OPN n'altéraient donc pas leur fonction cardiaque au cours du vieillissement. Ces résultats concordaient avec le taux de fibrose et le taux plasmatique de BNP qui étaient plus bas dans le groupe muté OPN âgé (taux similaires aux groupes OPN et sauvage jeunes) que dans le groupe sauvage âgé (Figure 51G, H).

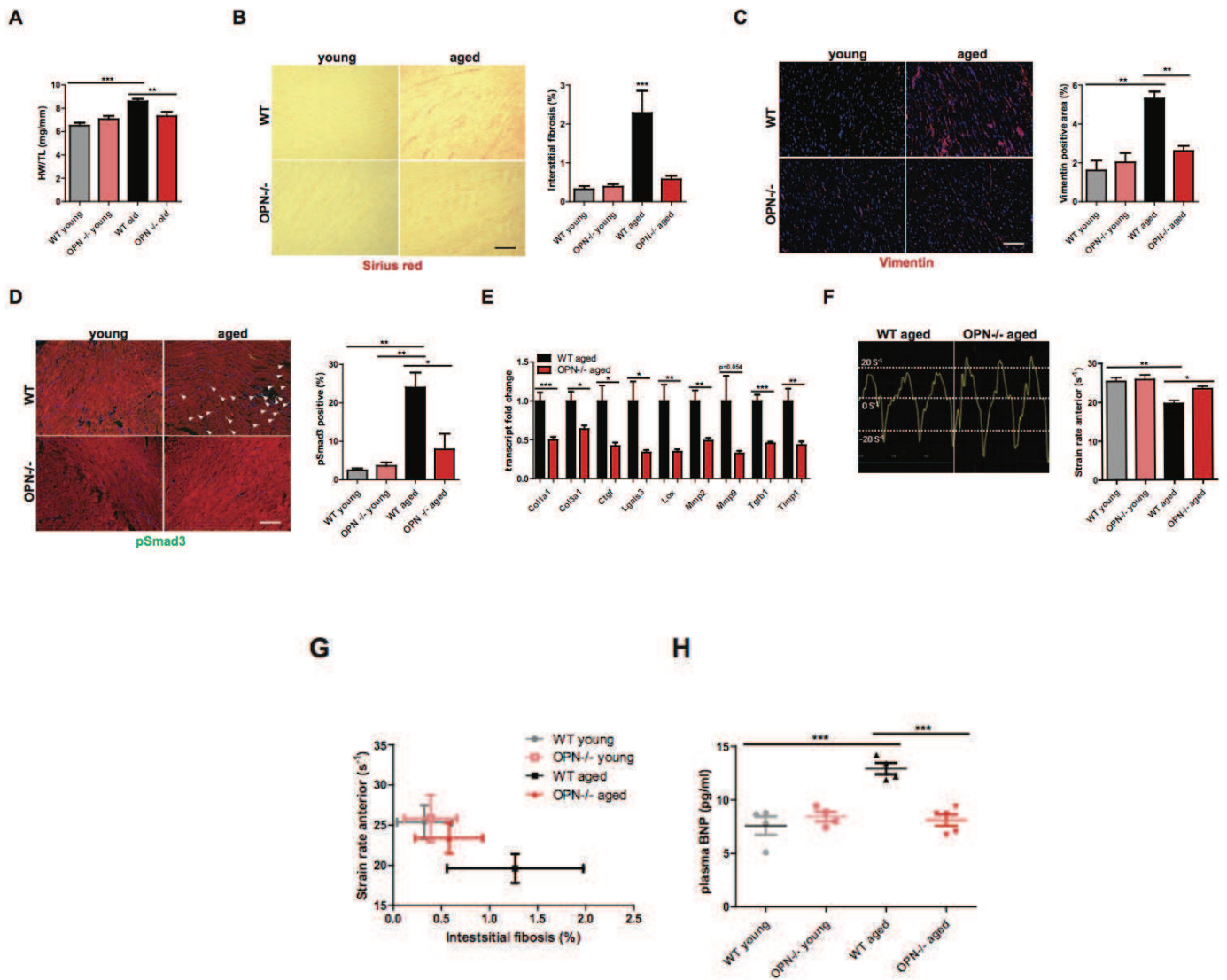


Figure 51. « Cardioprotection » vis-à-vis du vieillissement chez des souris déficientes pour le gène de l'ostéopontine.

d) L'OPN favorise la fibrose myocardique par modulation de la sénescence des fibroblastes

Le rôle de la sénescence des fibroblastes dans le processus de fibrose cicatricielle a été décrit dans des études récentes. Nous avons donc voulu voir si la réduction de la fibrose en cas de délétion du gène de l'OPN était également en rapport avec la sénescence des fibroblastes. Tout d'abord, des fibroblastes cardiaques isolés à partir de souris venant de naître ont été incubés avec du plasma de souris âgées sauvages et OPN déficientes (Figure 52A). De façon intrigante, nous avons retrouvé une activité de la SA- β -galactosidase et des marqueurs de sénescence (p16, p53 et p21) augmentés après incubation avec le plasma des souris OPN déficientes. Nous avons également observé dans ce même groupe une diminution de l'activation des fibroblastes (Acta2 et Fn1, Figure 52B, C et D) associée à une diminution des marqueurs de prolifération fibroblastiques (Ki67). Une corrélation inverse entre prolifération et sénescence des fibroblastes était retrouvée (Figure 52E). Pour confirmer ces résultats in-vivo, nous avons réalisé un co-marquage (p16 et fibroblaste) sur les cœurs prélevés sur les souris âgées sauvages et OPN déficientes. Chez les souris OPN déficientes, p16 était retrouvé exclusivement au niveau des fibroblastes, indiquant donc une sénescence sélective des fibroblastes cardiaques chez les souris âgées OPN déficientes et pas chez les sauvages (Figure 52F). En étudiant les cœurs issus des groupes EWATectomy, nous avons retrouvé les mêmes résultats que dans le groupe OPN déficient chez les souris qui ont eu l'ablation de la graisse viscérale alors que dans le groupe chirurgie blanche, le myocarde était riche en fibroblastes mais sans activation de p16 (Figure 52G). La conclusion est donc que la graisse viscérale joue un rôle dans l'activation et la sénescence des fibroblastes cardiaques, et qu'il semble exister un effet bénéfique de la sénescence des fibroblastes liée à l'absence d'OPN.

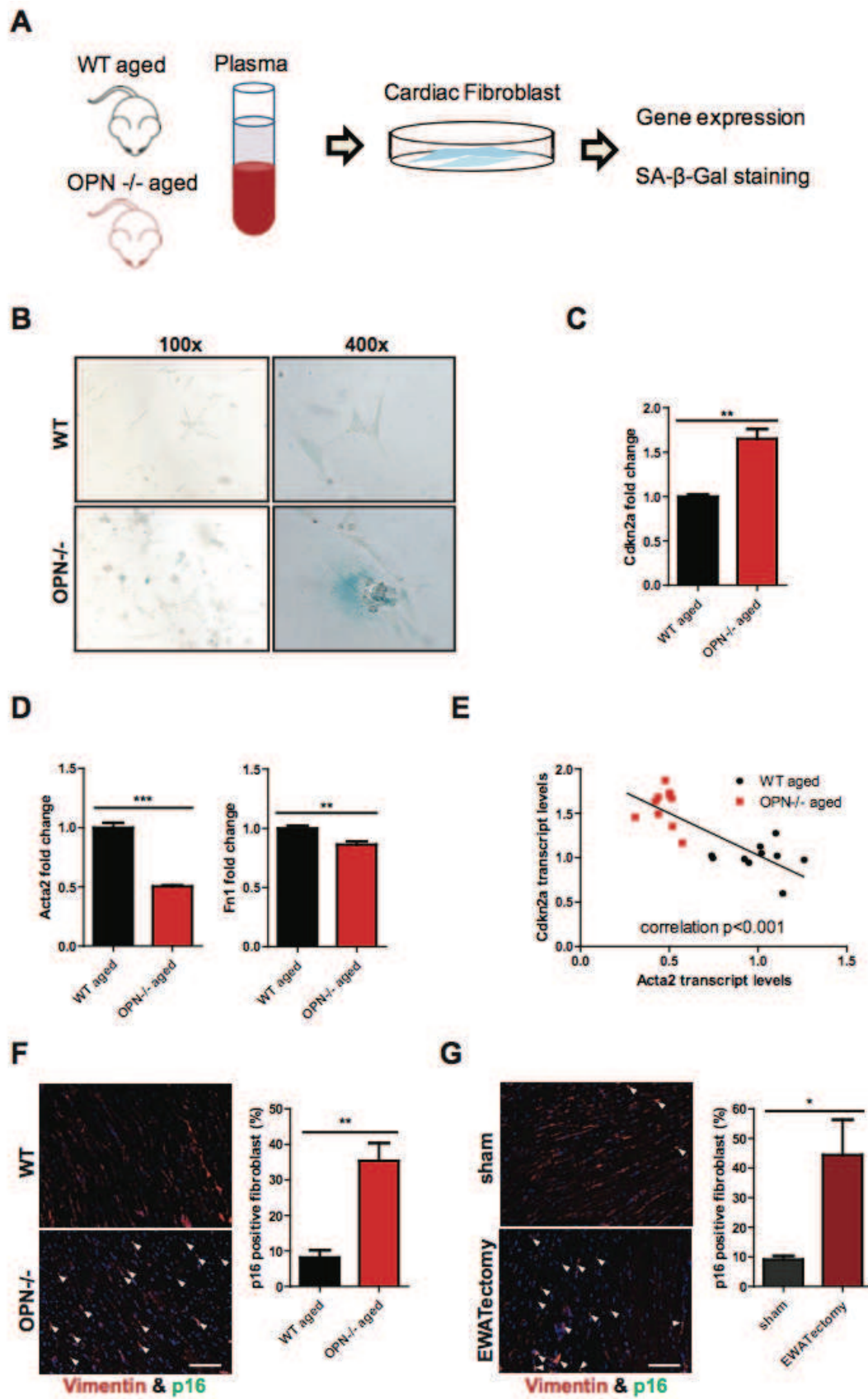


Figure 52. Relation entre l'ostéopontine et la modulation des fibroblastes cardiaques.

e) L'Agelastatine A (AA), inhibiteur de l'ostéopontine, prévient la sénescence cardiaque

Afin de confirmer le rôle de l'OPN dans le développement des anomalies cardiaques liées au vieillissement, nous avons testé un inhibiteur pharmacologique chez des souris sauvages âgées (Figure 53A). Le poids des souris ne variait pas entre les 2 groupes (AA et placebo). L'injection d'AA diminuait le taux d'OPN dans le tissu adipeux viscéral épидидymal (Figure 53B). L'injection d'AA réduisait la fibrose cardiaque, le taux de fibroblastes cardiaques et le niveau de phosphorylation de Smad3 (Figure 53C, D et E). L'AA réduisait également la transcription de facteurs pro-fibrotiques (TGFB1, Figure 53F). De façon intéressante, l'AA reproduisait les modifications induites par l'EWATectomy et la délétion du gène de l'OPN sur les fibroblastes, à savoir une augmentation des marqueurs de sénescences fibroblastiques comme p16 (Figure 53G). Enfin, l'injection d'AA permettait de restaurer la fonction cardiaque selon le strain rate et l'hémodynamique in-vivo (Figure 53H, I).

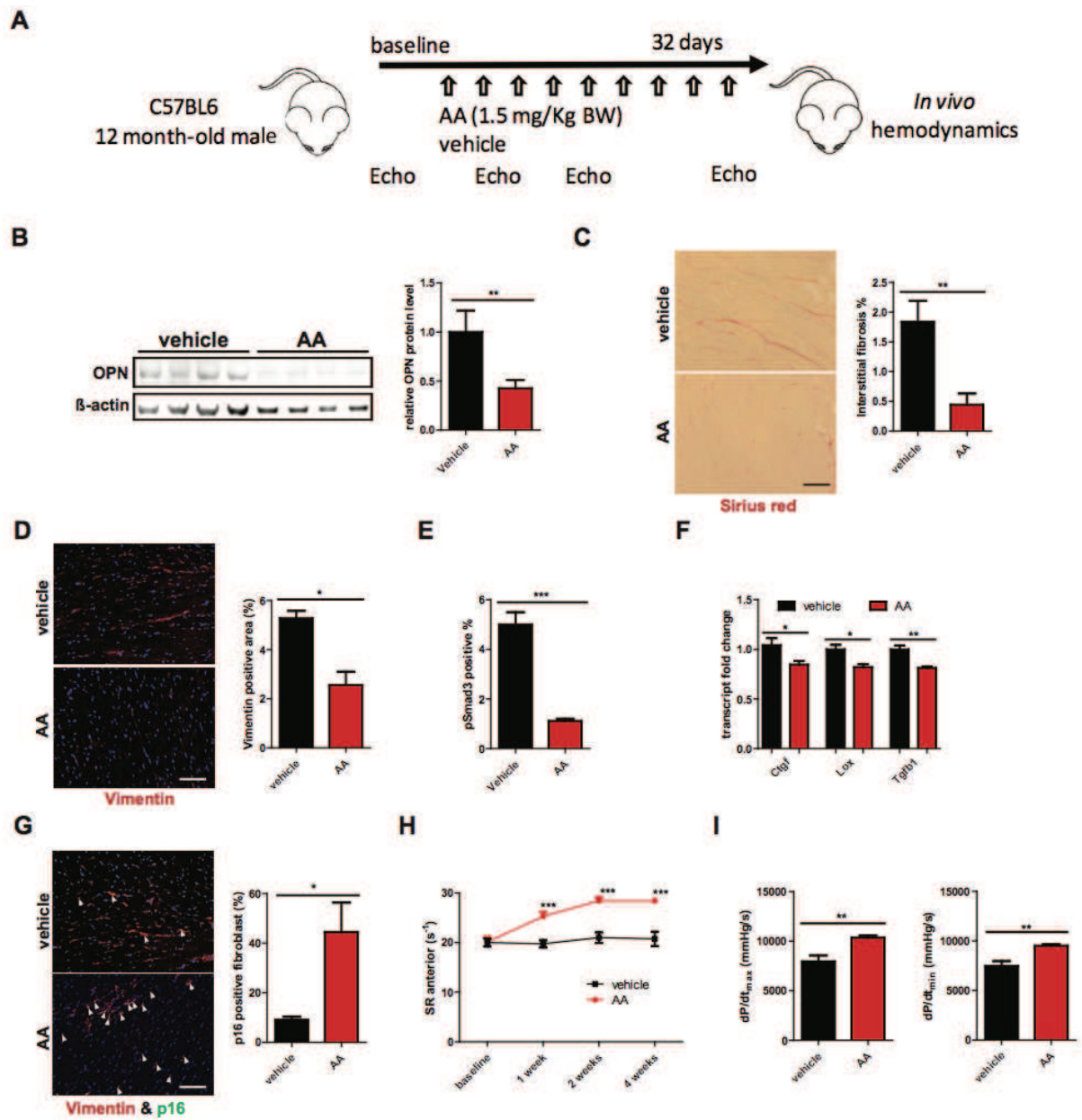


Figure 53. Modifications cardiaques liées à l'injection d'Agelastatine A, inhibiteur de l'ostéopontine.

4) Discussion

Notre étude a permis de mettre en évidence un nouveau rôle du tissu adipeux viscéral dans le processus de vieillissement du cœur, via la sécrétion de facteurs pro-fibrotiques comme l'OPN et le TGF β (Figure 54). Le vieillissement cardiaque (fibrose et dysfonction) est même directement lié au profil sécrétoire du tissu adipeux viscéral puisque l'ablation de la graisse viscérale et l'absence d'OPN (génétique et pharmacologique) permettent de corriger ces anomalies. Enfin, ces effets bénéfiques sur le cœur sont en rapport avec une induction de la sénescence des fibroblastes cardiaques. Comme l'augmentation de la fibrose myocardique liée au vieillissement est un facteur majeur de développement d'insuffisance cardiaque à FEVG préservée, l'OPN pourrait être une cible thérapeutique intéressante pour moduler la sénescence cardiaque.

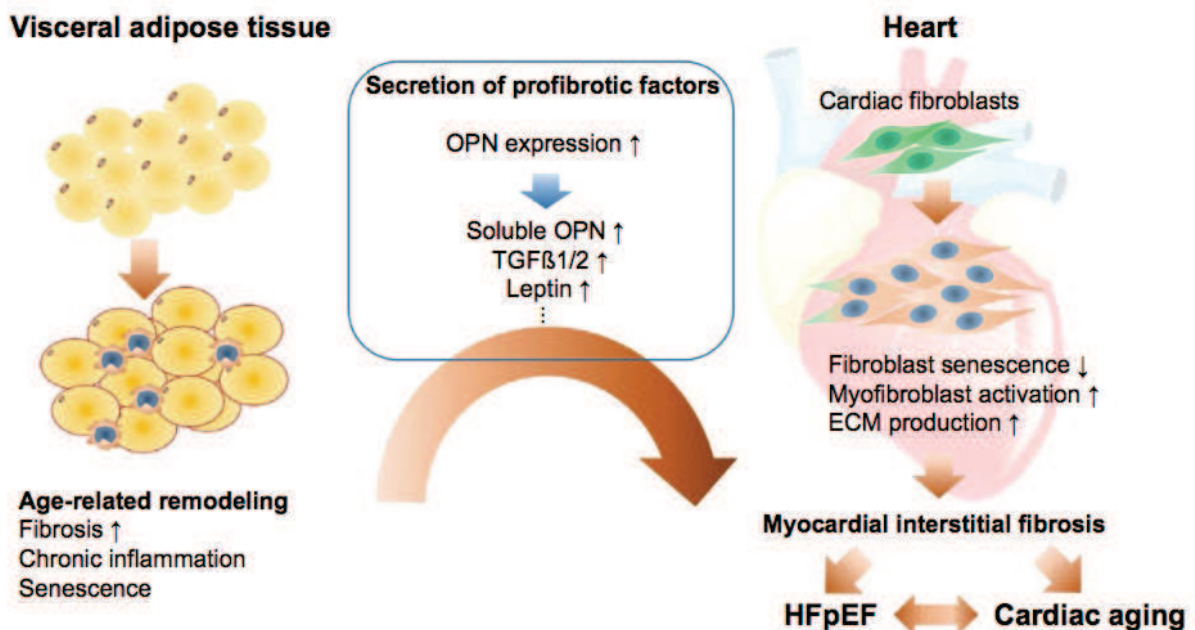


Figure 54. Résumé des résultats de l'étude sur la sénescence cardiaque induite par le tissu adipeux viscéral via l'action de l'ostéopontine.

a) Rôle de l'ostéopontine dans les pathologies cardiovasculaires

L'ostéopontine est une phosphoprotéine qui fait partie de la famille des protéines matricellulaires. Les protéines matricellulaires font partie des composants indispensables de la matrice extracellulaire qui comprend donc 1) des protéines de structure comme le collagène et l'élastine, 2) des protéines spécialisées comme la fibronectine et les protéoglycanes et 3) des protéines non structurales, les protéines matricellulaires. Ces dernières permettent de réguler le développement de la matrice extracellulaire par interaction avec des récepteurs cellulaires, les protéines de structure et des facteurs solubles tels que les facteurs de croissance et les cytokines. L'OPN a d'abord été étudiée au niveau de la matrice osseuse, et plus récemment, dans les pathologies cardiovasculaires. Ces dernières années, l'ostéopontine a été étudiée dans de nombreux domaines comme les pathologies cardiovasculaires, le vieillissement, les pathologies inflammatoires chroniques (notamment ostéo-articulaires) et les cancers.

L'OPN joue un rôle dans le processus inflammatoire. Elle joue un rôle dans la polarisation et le recrutement (chémo-attraction) des polynucléaires neutrophiles. Ainsi, les neutrophiles délétés pour le gène de l'OPN, la migration des neutrophiles est ralentie et la polarisation moindre, alors que l'administration exogène d'OPN réduit ce phénomène(75). L'OPN joue également un rôle dans la modulation des macrophages : migration, adhésion, activation, phagocytose, production de cytokines pro-inflammatoire et sécrétion de facteurs de croissance. En cas de lésion aigue (ex infarctus du myocarde), l'OPN favorise le recrutement de macrophages dans le but de phagocyter les cellules mortes et donc de nettoyer le site atteint en vue de la réparation cicatricielle. Enfin, l'OPN joue un rôle direct sur la régulation des cytokines pro-inflammatoires, principalement par modulation des macrophages. Ainsi, elle favorise la production de l'Il-12, cytokine pro-inflammatoire qui favorise la production de TNFalpha, et elle diminue la production de l'Il-10, cytokine anti-inflammatoire qui inhibe la production de l'Il-1alpha, Il-6, Il-8 et TNFalpha.

L'OPN joue également un rôle dans le développement de la matrice extracellulaire par action sur le recrutement, la prolifération et la différenciation des myofibroblastes, ainsi que sur le développement de la matrice extracellulaire. L'absence d'OPN entraîne des anomalies de fonctionnement au niveau des fibroblastes comme une moins bonne adhésion aux protéines de structures de la matrice extracellulaire (collagène I, fibronectine, laminine), une plus faible résistance au détachement pour ceux qui y sont attachés, une prolifération moins étendue et une diminution de leur capacité à assembler le collagène. Enfin, l'absence d'OPN limite la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes, probablement par diminution du TGFβ1. L'absence d'OPN induit donc une diminution des mécanismes aboutissant au développement de la fibrose.

Enfin, l'OPN joue un rôle dans le remodelage cardiaque par diminution de l'apoptose des cardiomyocytes(76), par augmentation de l'hypertrophie des cardiomyocytes en réponse à un changement de régime de pression, et par augmentation de l'angiogenèse. Ces différents mécanismes sont résumés dans la Figure 55 qui est basée sur un modèle de souris avec infarctus.

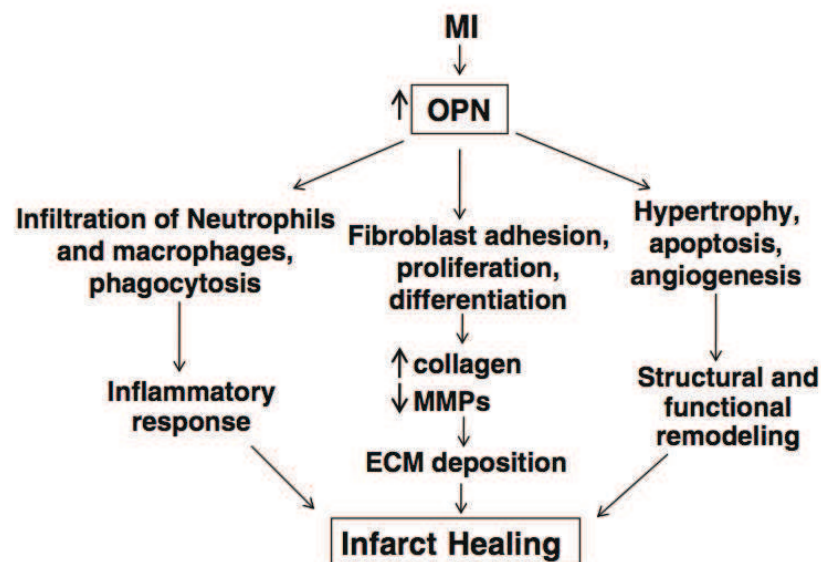


Figure 55. Résumé des mécanismes d'action de l'ostéopontine dans l'inflammation, la formation de matrice extracellulaire et le remodelage cardiaque dans un modèle de souris en post-infarctus du myocarde.

L'OPN a donc un rôle majeur dans le processus de cicatrisation, notamment en cas de souffrance myocardique comme au cours de l'infarctus. Dans ce cas, la fibrose par le développement de la matrice extracellulaire est bénéfique pour limiter le remodelage négatif ou le risque de rupture myocardique. Cependant, de nombreuses études animales et chez l'homme remettent en cause ce processus, probablement par emballement de celui-ci qui devient alors néfaste. Ainsi, chez des patients insuffisants cardiaques (notamment à FEVG préservée), l'augmentation plasmatique d'OPN (et autres marqueurs de la matrice extracellulaire) est associée à une augmentation des événements cardiovasculaires(77). Il en est de même en cas de cardiopathie ischémique(78) ou hypertensive(79).

b) Le tissu adipeux viscéral est une source importante d'OPN au cours du vieillissement

Durant le vieillissement, le tissu adipeux viscéral acquiert un phénotype pro-inflammatoire entraînant un remodelage avec une dysfonction de l'adipogénèse, la production de cytokines inflammatoires et une activation immunitaire(48, 80). Bien que de nombreuses publications antérieures se sont focalisées sur l'état pro-inflammatoire du tissu adipeux viscéral pour expliquer le lien entre vieillissement, troubles métaboliques et pathologies cardiovasculaires, nous nous sommes focalisé sur l'aspect pro-fibrotique. En effet, chez notre modèle murin, nous n'avons pas observé d'état pro-inflammatoire mais surtout une augmentation des marqueurs de fibrose (OPN et TGF β et leptine). Il est décrit que l'OPN augmente au niveau du tissu adipeux viscéral chez des souris rendues obèse par une alimentation riche en graisse, et qu'elle entraîne une inflammation du tissu adipeux avec dysfonction métabolique. Notre travail démontre que le vieillissement est également une condition favorisant la production d'OPN par le tissu adipeux viscéral. Cette donnée était confirmée par le fait que le taux d'OPN était plus bas après ablation de la graisse viscérale. Au cours du vieillissement, le tissu adipeux joue donc un rôle

« endocrinien » (OPN, TGF β et leptine) primordial dans la survenue de modifications physiologiques au sein d'autres organes, notamment le cœur.

c) Au cours du vieillissement, le tissu adipeux viscéral induit une fibrose myocardique à distance.

Partant du principe que l'ablation du tissu adipeux viscéral permet de réduire le taux de facteurs pro-fibrotiques circulants, nous avons utilisé ce même modèle pour évaluer la fibrose myocardique liée au vieillissement. En effet, l'ablation du tissu adipeux viscéral chez des souris âgées permettait de diminuer drastiquement la fibrose myocardique tout en améliorant la contractilité. Nos résultats sont discordants avec de précédentes études dans lesquelles l'ablation de la graisse sous-cutanée n'était pas toujours synonyme d'amélioration de l'état cardiovasculaire, ce qui montre bien le rôle primordial de la graisse viscérale et non pas sous-cutanée dans le vieillissement du myocarde. De plus, ces résultats étaient indépendants des troubles métaboliques liés à l'âge puisque l'ablation du tissu adipeux viscéral ne modifiait pas les tests métaboliques. Ce processus fibrotique lié au vieillissement semblait principalement lié à la production d'OPN car elle augmentait la production de TGF β et la prolifération des fibroblastes cardiaques.

d) Ostéopontine et vieillissement cardiaque

L'ostéopontine est connue pour son implication active dans la physiopathologie de nombreuses pathologies cardiaques (cardiopathie hypertensive, infarctus, insuffisance cardiaque). Cependant, son rôle dans la sénescence cardiaque reste inconnu. Dans cette étude, nous avons identifié l'OPN comme étant un médiateur humoral du tissu adipeux viscéral, responsable d'une fibrose myocardique interstitielle via l'activation des fibroblastes en myofibroblastes. En effet, nous avons observé une augmentation parallèle du taux de fibroblastes et de la fibrose

interstitielle myocardique chez les souris sauvages âgées mais pas chez les souris OPN déficientes. Les souris sauvages âgées avaient également une surexpression myocardique et plasmatique (TGFB) de gènes impliqués dans le développement de la fibrose, le remodelage de la matrice extracellulaire et la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes par rapport aux souris OPN déficientes. A contrario, l'absence d'OPN (souris OPN déficientes ou EWATectomy) entraînait une diminution de l'activation et de la prolifération des fibroblastes cardiaques, associée à une augmentation des marqueurs de sénescence (p16, SA-βGal). En l'absence d'OPN, on observait donc une sénescence des fibroblastes cardiaques. L'effet cardioprotecteur de la sénescence des fibroblastes en l'absence d'OPN était lié à la diminution de la fibrose myocardique secondaire au vieillissement, qui permettait elle-même d'améliorer la fonction cardiaque. Cette modulation de la sénescence des fibroblastes cardiaques au cours du vieillissement a déjà été identifiée comme un facteur limitant le développement de la fibrose cardiaque dans certaines conditions pathologiques(81). Nos résultats apportent donc de nouvelles données dans la mal-adaptation des fibroblastes cardiaques au cours du vieillissement, elle-même sous le contrôle de l'OPN produite par le tissu adipeux viscéral. De plus, nous avons démontré pour la première fois que la sénescence des fibroblastes cardiaques permettait de limiter la fibrose myocardique au cours du vieillissement. Le plus faible taux plasmatique d'OPN et de TGFB chez nos souris EWATectomy et OPN déficientes, associé à la moindre fibrose et meilleure fonction myocardique, suggèrent que ces facteurs pro-fibrotiques altèrent cette sénescence fibroblastique. Les tests in-vitro de fibroblastes cultivés avec du plasma de souris OPN déficientes confirmaient ces données.

e) Implications cliniques

Le vieillissement cardiaque et l'insuffisance cardiaque à FEVG préservée partagent la même physiopathologie, à savoir le développement d'une fibrose myocardique interstitielle à l'origine

d'une dysfonction diastolique puis systolique. Les résultats de l'étude I-PRESERVE vont dans ce sens puisque l'augmentation du taux périphérique de marqueurs impliqués dans le renouvellement de la matrice extracellulaire était associée à un taux d'évènement plus important(77). Notre étude apporte de nouvelles données intéressantes sur le plan de la physiopathologie de l'insuffisance cardiaque à FEVG préservée avec comme acteur principal le tissu adipeux viscéral, qui au cours du vieillissement se met à dysfonctionner et à sécréter des facteurs pro-fibrotiques modulant l'activité fibroblastique et favorisant donc la fibrose cardiaque. Plus intéressant, l'inhibition thérapeutique de l'OPN permettait de corriger la sénescence cardiaque.

5) Conclusion

Nous avons donc établi un lien important entre la dysfonction du tissu adipeux viscéral lié au vieillissement, et les anomalies cardiaques que sont le remodelage et la dysfonction myocardique.



Circulation

Manuscript Submission and Peer Review System

Disclaimer: The manuscript and its contents are confidential, intended for journal review purposes only, and not to be further disclosed.

URL: <http://circ-submit.aha-journals.org>

Title:

Manuscript number: CIRCULATIONAHA/2017/031358

Author(s): Daigo SAWAKI, Inserm U955

Visceral adipose tissue drives age-related myocardial fibrosis and dysfunction through osteopontin production.

Running title: Sawaki et al.; Role of visceral adiposity and osteopontin in myocardial aging (54/55)

Daigo Sawaki MD, PhD^{1, *}, Gabor Czibik MD, PhD^{1, *}, Maria Pini PhD^{1, *}, Julien Ternacle MD^{1, 2}, Nadine Suffee PhD³, Raquel Mercedes MD¹, Geneviève Marcelin PhD^{3, 4}, Mathieu Surenaud^{1, 5}, Elisabeth Marcos¹, Philippe Gual MD, PhD^{6, 7, 8}, Karine Clément MD, PhD^{3, 4, 9}, Sophie Hue MD, PhD^{1, 5}, Serge Adnot MD, PhD^{1, 10}, Stephane Hatem MD, PhD^{3, 4}, Izuru Tsuchimochi¹¹, Takehiko Yoshimitsu PhD¹¹, Corneliu Hénégar MD, PhD¹, Geneviève Derumeaux MD, PhD^{1, 2, ‡}

¹ INSERM U955, Université Paris-Est Creteil (UPEC), 51 Av de Lattre de Tassigny, 94100 Créteil, France.

² AP-HP, Department of Cardiology, Henri Mondor Hospital, DHU-ATVB, Créteil, France.

³ INSERM UMRS1166, Université Pierre et Marie Curie (UPMC), Sorbonne University, F-75013, Paris, France

⁴ Institute of Cardiometabolism and Nutrition, ICAN, Pitié-Salpêtrière Hospital, F-75013 Paris, France

⁵ AP-HP Vaccine Research Institute (VRI), Créteil F-94010, France

⁶ INSERM, Unité 1065, Nice, F-06204, France

⁷ University of Nice-Sophia-Antipolis, Nice, F-06204, France

⁸ Centre Hospitalier Universitaire de Nice, Hôpital L'Archet, Nice Cedex 3, F-06202, France

⁹ Assistance Publique Hopitaux de Paris, AP-HP, Pitié-Salpêtrière Hospital, Nutrition and Endocrinology Department and Hepato-biliary and Digestive Surgery Department, F-75013 Paris, France

¹⁰ AP-HP, Department of Physiology, Henri Mondor Hospital, DHU-ATVB, Créteil, France

¹¹ Laboratory of Synthetic Organic and Medicinal Chemistry, Division of Pharmaceutical Sciences, Graduate School of Medicine, Dentistry, and Pharmaceutical Sciences, Okayama University, Okayama, Japan

*These authors contributed equally.

‡ Corresponding author

Address for Correspondence:

Genevieve Derumeaux, INSERM U955, Université Paris-Est Creteil (UPEC), 51 Av de

Lattre de Tassigny, 94100 Créteil, France, E-mail : genevieve.derumeaux@inserm.fr

Tel: +33 1 49 81, Fax: +33 1 49 81 26 67

Words count: 8965

1 **Abstract**

2 **Background**

3 Aging induces cardiac structural and functional changes linked to the
4 increased deposition of extracellular matrix (ECM) proteins, including
5 osteopontin (OPN), conducting to progressive interstitial fibrosis. While OPN
6 is involved in various pathological conditions, its role in myocardial aging
7 remains unknown.

8 **Methods**

9 OPN deficient mice (OPN^{-/-}) with their WT littermates were evaluated at 2
10 and 14 months of age in terms of cardiac structure, function, histology and
11 key molecular markers. OPN expression was determined by RT-PCR,
12 immunoblot and immunofluorescence. Luminex assays were performed to
13 screen plasma samples for various cytokines/adipokines in addition to OPN.
14 Similar explorations were conducted in aged WT mice after surgical removal
15 of the visceral adipose tissue (VAT) or treatment with a small-molecule OPN
16 inhibitor Agelastatin A. Primary WT fibroblasts were incubated with plasma
17 from aged WT and OPN^{-/-} mice, and evaluated for senescence (senescence-
18 associated beta-galactosidase and p16), as well as fibroblast activation
19 markers (Acta2 and Fn1).

20 **Results**

21 Plasma OPN levels increased in WT mice during aging, with VAT showing
22 the strongest OPN induction contrasting with myocardium that did not
23 express OPN. VAT removal in aged WT mice restored cardiac function and
24 decreased myocardial fibrosis in addition to a substantial reduction of

1 circulating OPN and TGF β levels. OPN deficiency provided a comparable
2 protection against age-related cardiac fibrosis and dysfunction. Intriguingly,
3 a strong induction of senescence in cardiac fibroblasts was observed in both
4 VAT removal and OPN^{-/-} mice. The addition of plasma from aged OPN^{-/-} mice
5 to cultures of primary cardiac fibroblasts induced senescence and reduced
6 their activation (compared to aged WT plasma). Finally, Agelastatin A
7 treatment of aged WT mice fully reversed age-related myocardial fibrosis and
8 dysfunction.

9 **Conclusion**

10 During aging VAT represents the main source of OPN and alters heart
11 structure and function via its profibrotic secretome. As a proof-of-concept,
12 interventions targeting OPN, such as VAT removal and OPN deficiency,
13 rescued the heart and induced a selective modulation of fibroblast
14 senescence. Our work uncovers OPN's role in the context of myocardial
15 aging and proposes OPN as a potential new therapeutic target for a healthy
16 cardiac aging.

17 (338/350)

1 **Introduction:**

2 The proportion of elderly individuals is increasing rapidly, leading to a high
3 prevalence of heart failure, a major public health burden in developed
4 countries.¹ Indeed, aging induces cardiac structural and functional changes,
5 including left ventricular (LV) hypertrophy and decline in diastolic function.²
6 ³ An important characteristic of the aging heart is the increased deposition of
7 extracellular matrix (ECM) proteins.⁴ This results in diffuse interstitial
8 fibrosis and predisposes to the development of heart failure with preserved
9 ejection fraction (HFpEF).^{5, 6} Recent studies have highlighted the importance
10 of matricellular proteins in the interaction between cardiac fibrosis,
11 cardiomyocyte hypertrophy and cell death.⁷ Among them, osteopontin (OPN)
12 is a key mediator of left ventricular (LV) remodeling in pathological
13 conditions.⁸⁻¹⁰
14 OPN is not expressed in healthy myocardium, but its expression is triggered
15 by mechanical stress, including pressure overload, hypoxia and cardiac injury,
16 and is associated with a marked interstitial and perivascular fibrosis¹¹
17 leading to the development of heart failure.¹²
18 OPN appears to mediate these profibrotic and hypertrophic actions by
19 increased macrophage chemotaxis and activation, as well as direct effects on
20 fibroblast adhesion and proliferation.¹¹ We and others have recently shown
21 that OPN levels increase with age in plasma¹³ and various tissues.^{14, 15}
22 Whether OPN is also involved in the development of age-related cardiac
23 dysfunction is currently unknown. Based on these findings, we sought to
24 explore the potential role of OPN in age-related cardiac alterations by

1 studying young and aged OPN knockout (OPN^{-/-}) mice and aged-matched
2 control littermates. Here we demonstrate that visceral adipose tissue (VAT)
3 is the main source of circulating OPN during aging. Furthermore, in aged
4 animals VAT removal reduces OPN plasma levels and myocardial fibrosis.
5 Thus, VAT plays a critical role in the progression of interstitial myocardial
6 fibrosis by secreting profibrotic factors and modulating cardiac fibroblast
7 activation. These “rejuvenating” actions were also reproduced by genetic
8 and pharmacological inhibition of OPN. Thus, our work demonstrates the
9 critical role for OPN in the crosstalk between VAT and the heart in the
10 process of myocardial aging and identifies this matricellular protein as a
11 promising target for future therapeutic developments aiming to promote a
12 healthy cardiac aging.

13

14 **Material and Methods**

15

16 **Animals**

17 C57/BL6JRj mice (referred as wild-type: WT) were purchased from Janvier
18 Labs, France. Osteopontin knockout mice (B6.129S6(Cg)-Spp1tm1Blh/J)
19 were purchased from Jackson laboratory (ME, USA), which had been back-
20 crossed with C57/BL6J mice more than 10 generations, and kept as
21 homozygous (referred as OPN^{-/-}). All mice were housed in a specific
22 pathogen free platform at constant temperature (22°C), with a 12-hour light-
23 dark cycle and unrestricted access to a chow diet (CD, A0310, Safe Diets,
24 France) and water. During follow-up, animals underwent monthly body-

1 weight (BW), metabolic and echocardiography evaluations. Before sacrifice,
2 animals also underwent hemodynamic evaluation. All animal experiments
3 were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the
4 French National Institute of Health and Medical Research (INSERM)-Unit
5 955, Créteil, France (ComEth 15-001).

6

7 **Visceral adipose tissue removal surgery**

8 The total of 20 male wild type C57BL/6J mice, approximately 11 months of
9 age and weighed 28~36 g, were used for VAT removal performed by
10 epididymal fat resection (EWATectomy). Before EWATectomy, mice
11 underwent baseline assessment of metabolic and cardiac functions (GTT, ITT
12 and echocardiography). Mice were anesthetized with inhaled 3% isoflurane
13 and a 1 cm single abdominal midline incision was made. Bilateral epididymal
14 fat pads were lifted from the peritoneal cavity onto a sterilized and humidified
15 surgical drape, dissected with an electronic scalpel, and removed without
16 damaging the testicular blood supply. The sham operation was performed in
17 the same manner without fat pads removal. The abdominal peritoneum was
18 closed with prollyn sutures and the skin was closed with silk sutures
19 (Angiotech, USA). The mice were given 2.5 mg/kg buprenorphine (Sigma-
20 Aldrich, France) intraperitoneally and let recover from surgery, and regained
21 body weight. Their body weights were recorded weekly. All the mice remained
22 alive without significant body weight-loss. Five weeks after surgery, final
23 metabolic and cardiac assessments were performed. Then the mice were
24 subjected to *in vivo* hemodynamic analysis and euthanized by neck-

1 dislodgement. The organs and bloods were harvested and processed for
2 further evaluations.

3

4 **Osteopontin inhibition by small molecule**

5 A total of 20 male wild type C57BL/6J mice, 12 months of age and weighed
6 28~35 g, were used. AgelastatinA (AA), small organic molecule known to
7 inhibit OPN production *in vivo*¹⁶ was synthesized and provided by Professor
8 Takehiko Yoshimitsu at Laboratory of Synthetic Organic and Medicinal
9 Chemistry, Division of Pharmaceutical Sciences, Graduate School of Medicine,
10 Dentistry, and Pharmaceutical Sciences, Okayama University, Okayama,
11 Japan.¹⁷ AA was dissolved in water with 1:10 excess of solubilizing agent 2-
12 Hydroxypropyl- β -cyclodextrin (Sigma-Aldrich) to make it water-soluble. After
13 baseline assessment of metabolic and cardiac functions (GTT, ITT and
14 echocardiography), the mice were given 1.5 mg/kg of AA or vehicle only
15 intraperitoneally every 4 days for 4 weeks. Their body weights were recorded
16 at the same time. After final metabolic and cardiac assessments, the mice
17 were subjected to *in vivo* hemodynamic analysis and euthanized by neck-
18 dislodgement. The organs and the blood were collected and processed for
19 further evaluations.

20

21 **Human atrial samples**

22 Human tissue samples (right atrial appendage) were obtained from patients
23 undergoing routine cardiac bypass surgery after informed consent of each
24 patient and with the approval of the Ethical Committee (Comité de Protection

1 des Personnes Ile-de France VI) of Pitié-Salpêtrière Hospital.¹⁸

2

3 **Cell culture and treatments**

4 Primary neonatal mouse cardiac fibroblast culture was performed with the
5 Neonatal Cardiomyocyte Isolation System (Worthington Biochemical, NJ,
6 USA) according to the manufacturer's instructions. Briefly, neonatal
7 C57/BL6JRj mice (Janvier) were euthanized by decapitation, and their
8 ventricles were separated and minced in ice-cold balanced salt solution.
9 Minced hearts were incubated in a balanced salt solution containing Trypsin
10 for 24 hours at 4 °C, and then further digested with 300 U/mL of collagenase
11 type 2 for 30–45 min at 37°C with agitation. The cell suspension was filtered
12 with 70 µm mesh and passed onto dishes with Medium 199 (Gibco and Life
13 Technologies, France) supplemented with 10% FCS. Thirty minutes later,
14 floating cells were removed, and the attached cells were considered as cardiac
15 fibroblasts. The purified cardiac fibroblasts were then passed onto 12-well
16 culture plates at a density of 2×10^5 cells/well, or culture slide (Thermo
17 Scientific, France). After serum starvation for 24 hours, the cells were
18 stimulated with plasma (25% volume of total medium) for 24 hours.

19

20 **Transthoracic echocardiography**

21 Mice were regularly manipulated in order to avoid any stress related to
22 echocardiography assessment. Transthoracic echocardiography (TTE) was
23 performed in non-sedated mice in order to avoid any depression effect of
24 anesthetic agents as previously described.¹⁹ Mice were carefully caught by the

1 left hand and placed in supine position. Data acquisition and analysis were
2 performed monthly. Images were acquired from a parasternal position at the
3 level of papillary muscles using a 13-MHz linear-array transducer with a
4 digital ultrasound system (Vivid 7, GE Medical System). Left ventricular
5 diameters and ejection fraction, anterior and posterior wall thicknesses were
6 serially obtained from gray-scale M-mode acquisition. Peak systolic values of
7 strain rate (SR) in the anterior and posterior wall were obtained using Tissue
8 Doppler Imaging (TDI). TDI loops were acquired from the same parasternal
9 view at a mean frame rate of 450 i/s and a depth of 1 cm. The Nyquist velocity
10 limit was set around 12cm/s. Strain rate analysis was performed offline by an
11 observer blinded to the groups using the EchoPac Software (GE Medical
12 System). The region of interest size was set at 0.2 mm and temporal
13 smoothing filters were turned off for all measurements. Because slight
14 respiratory variations exist, we averaged peak systolic SR on 8 consecutive
15 cardiac cycles. Reproducibility of echocardiography measurements has
16 already been published.^{19, 20}

17

18 **Hemodynamic analysis and blood sample collection**

19 Analyses were performed just before sacrifice and harvesting the organs.
20 Hemodynamic measurements were performed in mice placed on a
21 homeothermic operating table under 1.5% isoflurane anesthesia in
22 spontaneous breathing.^{19, 21} A 1.4-Fr microcatheter (Millar Instruments,
23 Houston, USA) calibrated manually before each experiment, was inserted via
24 the right carotid artery into the aorta for measurement of systolic and

1 diastolic pressure, and then advanced into the LV for measurement of end-
2 diastolic and end-systolic pressures, peak rates of isovolumic pressure
3 development (dP/dt_{max}) and pressure decay (dP/dt_{min}). Data were collected
4 after at least 10 min of steady state, using the lowest isoflurane concentration
5 tolerated. Data were analyzed using the IOX software (EMKA, France). After
6 *in vivo* hemodynamic analysis, blood was taken from carotid artery into
7 EDTA-2Na coated tubes (SARSTEDT, Germany), centrifuged at 1200 g for 10
8 minutes, and kept in -80°C deep freezer. The mice were euthanized by neck
9 dislodgement immediately.

10

11 **Metabolic tolerance tests**

12 Glucose Tolerance Test (GTT): Mice were fasted for 6-7 hours before the study,
13 and then given glucose solution intraperitoneally (1.5 mg/g body weight).
14 Blood samples were collected from tail vein at baseline, 15, 30, 60, 90, 120
15 minutes after injection, and glucose concentration was measured with an
16 automatic glucometer (Accu-Chek Performa, Roche, Germany).

17 Insulin Tolerance Test (ITT): Mice were fasted for 6-7 hours before study, and
18 then given insulin solution intraperitoneally (0.5 mU/g of body weight,
19 Umelin, Lilly, France). Blood samples were collected from tail vein at baseline,
20 30, 60, 90, 120 minutes after injection, and glucose concentration was
21 measured as above.

22

23 **Tissue processing and histological assessment**

24 Dissected organs were fixed with 4% formaldehyde solution (Sigma-Aldrich,

1 France) immediately and subjected to paraffin-embedding after at least 1
2 week fixation. The sections were deparaffinized using xylene and a graded
3 series of ethanol dilutions.

4 Heart tissue sections were stained with Sirius Red for interstitial fibrosis
5 measurement. The pictures were captured using a Zeiss Axioplan 2 Imaging
6 microscope. Three to five images per sample were measured red area
7 normalized by total surface area. All data were measured with the ImageJ
8 software (NIH, <https://imagej.nih.gov/ij/>).

9 For immunofluorescent staining, deparaffinized and hydrated sections were
10 then subjected to heat-mediated antigen retrieval (Citrate buffer pH6.0, Dako,
11 France) and blocking with 30% goat serum. Primary antibodies were applied
12 with antibody diluent (Dako) for over-night at 4°C in humidified chamber.
13 Corresponding secondary antibodies conjugated with fluorescent dyes were
14 used to visualize with DAPI nucleus counter-staining. Used antibodies are
15 described in supplemental table1. Fluorescent pictures were taken with a
16 Zeiss Axio Imager M2 fluorescent microscope, and processed with equipped
17 Zen imaging software.

18

19 **Cellular SA- β -Gal staining**

20 Plasma treated cardiac fibroblasts were washed with chilled PBS, and fixed
21 with 1% formaldehyde solutions (Sigma-Aldrich) for 5 min. Then cells were
22 subjected to staining solution (1 mg/ml Xgal, Sigma-Aldrich) and kept at 37°C
23 for 12 hours. The images were taken by Zeiss Axioplan 2 Imaging microscope
24 for higher magnification.

1

2 **Quantitative real-time PCR**

3 Total RNA was extracted from lyophilized organ samples with RNA easy
4 fibrous kit (Qiagen, France). RNA from cultured cardiac fibroblasts was
5 extracted with RNA easy mini kit (Qiagen) as manufacturer's instruction.
6 First strand DNA was synthesized from 0.5-1.0 µg total RNA with High-
7 Capacity cDNA Reverse Transcription Kit and a thermal cycler SimpliAmp
8 (Applied Biosystems, CA, USA) according to manufacturer's instruction.
9 Quantitative PCR was performed and analyzed with TaqMan® assays with
10 Universal PCR Master Mix using StepOne™ Real-Time PCR System (Applied
11 Biosystems). β-actin was used as internal control. Used Taqman assays are
12 described in supplemental table1.

13

14 **Western Blot Analysis**

15 Twenty mg of lyophilized myocardium or 80 mg of adipose tissues was
16 homogenized in "Platonic" urea lysis buffer containing 7 M urea, 10% glycerol
17 (v/v), 10 mM Tris-HCl (pH6.8), 1% SDS, 1 mM dithiothreitol, supplemented
18 with protease and phosphatase inhibitor cocktail tablets (Pierce, France).
19 After vortex, lysates were sonicated, passed through a 21G needle at least 6
20 times, rotated for 30 minutes at 4°C and spun to obtain supernatant. Protein
21 concentration was adjusted according to Bradford method (Bio-rad, France).
22 Denatured total protein (20µg) was loaded to 10% SDS-PAGE. Separated
23 proteins were transferred to PVDF membranes (Invitrogen), blocked in 5%
24 milk in TBS-Tween (0.1%) and probed for selected proteins with specific

1 primary antibodies at 4°C overnight (Supplemental table1). Membranes were
2 then incubated with corresponding HRP-conjugated secondary antibody
3 (Abcam). Densitometric quantification was normalized to β -actin levels in
4 each sample.

5

6 **Cytokine, adipokine, and growth factor measurement**

7 Collected whole blood samples were centrifuged and plasma fraction was
8 separated, stored at -80 °C. Plasma and ex-vivo visceral adipose tissue
9 conditioned medium were assessed for the levels of mediators such as OPN
10 using a Luminex Bio-Plex cytokine assay kit (Bio-Rad, USA) following the
11 manufacturer's instructions. TGF β 1 concentration was evaluated by
12 Magnetic Milliplex Map Kit (TGF β MAG-64K-03, Millipore, USA), and plasma
13 BNP levels were analyzed with enzyme-linked immunosorbent assay kit
14 (ELISA, Sigma-Aldrich) according to manufacturer's instructions.

15

16 **Statistical Analysis**

17 All data are presented as mean \pm SEM. Difference between two groups was
18 analyzed by unpaired t-test. Comparisons between multiple groups were done
19 using one- or two-way ANOVA followed by Bonferroni correction. P-values
20 <0.05 were considered as significant.

21

22 **Results**

23 **Visceral adipose tissue is a major source of osteopontin during aging**

24 In order to test our hypothesis about a potential role of OPN in the aging

1 process we first determined plasma OPN levels in aged WT mice and observed
2 a significant increase compared with young WT mice (Figure 1A). To identify
3 the source of OPN, we then examined the age-related OPN expression with
4 RT-PCR across organs and found the most prominent upregulation in visceral
5 fat, i.e. epididymal white adipose tissue (EWAT, Figure 1B). The age-related
6 induction of OPN transcript levels in EWAT was associated with increased
7 protein expression as demonstrated by immunofluorescence (Figure 1C) and
8 Western Blot analysis (Figure 1D). Conversely, myocardial immunostaining
9 detected very limited OPN expression in aged WT mice (Figure 1E) with no
10 detectable signal by Western Blot analysis (Figure 1F). In atrial samples
11 obtained from elderly patients undergoing cardiac surgery OPN was
12 abundantly expressed in the epicardial adipose tissue but very little in the
13 atrial myocardium (Figure 1G).

14

15 **Visceral adipose tissue plays a key role in inducing myocardial fibrosis and** 16 **cardiac dysfunction during aging**

17 Since aging appeared to upregulate OPN expression mainly in the VAT, we
18 speculated that VAT may promote cardiac fibrosis by increased OPN²²
19 secretion *per se* or in conjunction with other profibrotic cytokines. We
20 therefore measured plasma levels of circulating profibrotic cytokines in WT
21 mice and identified an age-related increase in adipokines such as leptin,
22 growth factors, and cytokines most notably TGF β 1 and TGF β 2 (Supplemental
23 Figure 1A-D). *Ex vivo* cultured visceral fat, i.e. EWAT explants further
24 confirmed that these factors were secreted at higher levels in aged versus

1 young WT mice (Supplemental Figure 1E-H). Taken together these data
2 suggest a key role of VAT in releasing profibrotic mediators during aging.
3 Following on our previous observation demonstrating the impact of aging on
4 cardiac fibrosis and function,²⁰ we hypothesized that a crosstalk between VAT
5 and myocardium may promote cardiac fibrosis. To test this hypothesis, we
6 performed VAT removal by epididymal fat resection (EWATectomy) in aged
7 WT mice followed by an assessment of myocardial fibrosis and function
8 (Figure 2A). EWATectomy did not alter body weight (Figure 2B), despite a
9 significant decrease in EWAT weight 6 weeks after surgery (Figure 2C), which
10 was compensated by an increase of the other fat pads (Supplemental Figure
11 2A-C). Interestingly, in the EWATectomy group, both plasma OPN (Figure
12 2D) and TGF β 1 levels (Figure 2E) decreased significantly compared to sham
13 animals. After EWATectomy, myocardial fibrosis was dramatically reduced
14 (Figure 2F), which was accompanied by attenuated vimentin-positive
15 fibroblast area (Figure 2G) and Smad3 phosphorylation (Figure 2H). These
16 results suggest a reduced activation of the Smad3 cascade, which plays a
17 critical role in modulating extracellular matrix gene expression.²³
18 EWATectomy vs. sham surgery improved myocardial function evaluated by
19 systolic strain rate, dP/dt_{max} and dP/dt_{min} (Figure 2I, J). Of note, glucose and
20 insulin tolerance tests were similar in sham and EWATectomy animals
21 (Figure 2K; Supplemental Figure 2D).

22 Taken together, the beneficial cardiac effects of EWATectomy support our
23 hypothesis that aged visceral fat is an important source of profibrotic factors,
24 such as OPN and TGF β , and plays therefore a key role in age-related cardiac

1 structural remodeling and dysfunction.

2

3 **Osteopontin-deficient mice are protected against age-related myocardial**
4 **fibrosis and cardiac dysfunction**

5 To explore the hypothesis that an age-dependent OPN increase is involved in
6 cardiac dysfunction, WT and OPN^{-/-} mice were evaluated at 2 and 14 months
7 of age. Heart weight indexed to tibia length (HW/TL) increased with age in
8 WT mice but not in OPN^{-/-} mice (Figure 3A). Cardiomyocyte size (WGA
9 staining; Supplemental Figure 3A&B) increased with age in both WT and
10 OPN^{-/-} mice. Interestingly, in aged WT mice but not in aged OPN^{-/-} mice,
11 compared to young mice as reference, aging was associated with a marked
12 increase in myocardial interstitial fibrosis (Figure 3B), in parallel with
13 increased fibroblast area (Figure 3C) and Smad3 phosphorylation (Figure 3D).
14 This enhanced interstitial myocardial fibrosis was associated with a rise in
15 plasma TGFβ1 and TGFβ2 levels in aged WT mice, whilst in aged OPN^{-/-} mice
16 plasma TGFβ levels were comparable with levels found in young mice (WT
17 young: 6684±1145 vs OPN^{-/-} aged: 5957±1370 pg/ml, p=0.6971).

18 Since profibrotic changes are thought to be driven mainly by TGFβ and
19 connective tissue growth factor (CTGF), we specifically assessed the
20 modulation of these genes in the heart by RT-PCR. TGFβ and CTGF
21 expression levels in the whole heart showed reduced age-related profibrotic
22 gene expression in OPN^{-/-} versus WT myocardium (Figure 3E). This result
23 was further confirmed by an age-related downregulation of various ECM
24 proteins by OPN deficiency, such as collagen type 1 (Col1) and type 3 (Col3)

1 together with lysyl-oxylase (Lox), and factors involved in ECM remodeling,
2 such as metalloproteinases (MMP2 and 9) and tissue inhibitors of
3 metalloproteinases (TIMP1). We also found that galectin 3 (Lgal3) was
4 significantly decreased in OPN^{-/-} mice compared with WT during the aging
5 process. We then assessed the impact of aging on myocardial function and
6 confirmed our previous observation²⁰ that conventional parameters of systolic
7 function (Table 1) did not show any deterioration in aged WT mice, whereas
8 systolic strain rate (SR), an index of regional myocardial contractility,
9 significantly decreased (Figure 3F & Table 1) compared to young WT mice.
10 Systolic SR on the other hand was preserved in aged OPN^{-/-} mice with similar
11 values as in young mice. This protective effect against age-related myocardial
12 dysfunction was further confirmed by *in vivo* hemodynamics (Supplemental
13 Figure 3C-D & Table1). This preservation of myocardial function was in line
14 with the reduction of interstitial fibrosis in aged OPN^{-/-} mice in comparison
15 with aged WT mice (Figure 3G), and was confirmed by a normalized plasma
16 level of BNP in aged OPN^{-/-} mice (Figure 3H).

17

18 **OPN promotes myocardial fibrosis through modulation of cardiac fibroblast** 19 **senescence**

20 Recent publications underline the role of fibroblast senescence in the
21 modulation of fibrotic repair in pathological conditions (pressure overload²⁴
22 and myocardial infarction²⁵). We therefore aimed to explore whether the
23 reduction of fibrosis in aged OPN^{-/-} hearts may be related to selective
24 fibroblast senescence. Primary cardiac fibroblasts isolated from newborn mice

1 were incubated with plasma from aged WT and OPN^{-/-} mice (Figure 4A).
2 Interestingly, senescence-associated beta-galactosidase (SA-βGal) activity
3 (Figure 4B) and senescence markers p16 (Figure 4C), p53, p21 and serpine1
4 (Supplemental Figure 4A) were induced after incubation with aged OPN^{-/-}
5 compared to WT plasma. We also found reduced activation of fibroblasts by
6 aged OPN^{-/-} plasma, as demonstrated by the expression of smooth muscle
7 actin (Acta 2) and fibronectin (Fn1) (Figure 4D) together with decreased
8 proliferation of fibroblasts (Ki67, Supplemental Figure 4B). When p16 was
9 plotted against Acta2, we observed a strong inverse relationship between
10 their expression levels (Figure 4E).
11 To confirm these findings *in vivo*, aged WT and OPN^{-/-} hearts were co-stained
12 with p16 and the fibroblast marker vimentin. Immunofluorescence of p16 in
13 OPN^{-/-} mice exclusively localized in vimentin-positive cells, indicative of
14 selective cardiac fibroblast senescence in OPN^{-/-} mice but not in WT (Figure
15 4F). With this finding in OPN^{-/-} mice we then checked whether p16 expression
16 co-localized with fibroblasts in EWATectomy hearts. We found a similar
17 pattern as in OPN^{-/-} mice whilst sham-operated WT mice were rich in
18 vimentin signal, but not in p16 (Figure 4G). These results confirm EWAT's
19 role in modulating both cardiac fibroblast activation and their senescence,
20 and illustrate a functionally beneficial increased senescence of cardiac
21 fibroblasts associated with deficiency in OPN.

22

23 **The osteopontin inhibitor Agelastatin A prevents age-related myocardial**
24 **fibrosis and dysfunction**

1 To confirm the role of OPN in age-associated cardiac disorders, we tested
2 whether its pharmacological inhibition in aged animals could reverse cardiac
3 decline. To address this question an OPN inhibitor, Agelastatin A, was
4 administered to aged WT mice (Figure 5A).^{16, 17} Agelastatin A (AA)
5 administration did not affect the body weight (Supplemental Figure 5A).
6 Compared to vehicle, AA reduced OPN protein levels in EWAT (Figure 5B).
7 Treatment with AA remedied age-dependent cardiac remodeling as
8 demonstrated by reduced fibrotic deposition (Figure 5C), fibroblast area
9 (Figure 5D) and Smad3 phosphorylation (Figure 5E). AA downregulated a
10 series of profibrotic genes, such as TGF β 1 and CTGF (Figure 5F). Intriguingly,
11 in the heart this treatment recapitulated the effect of EWATectomy and OPN
12 deficiency on selective fibroblast senescence, as demonstrated by enhanced
13 cardiac p16 signal co-localizing with vimentin (Figure 5G). Finally, we found
14 that AA fully restored myocardial function as evaluated by systolic strain rate
15 (Figure 5H) and dP/dt_{max} and dP/dt_{min} (Figure 5I).

16

17 **Discussion**

18 Our study sheds new light on the role of visceral adipose tissue (VAT) as an
19 important driver of the aging process in the heart. Specifically, we
20 demonstrated that the aged VAT is a major source of profibrotic factors, such
21 as OPN and TGF β . Subsequently, age-dependent cardiac fibrosis and
22 dysfunction are closely linked to the VAT secretory profile and rescued by
23 EWATectomy, whilst OPN's role was confirmed by both genetic deletion and
24 pharmacologic inhibition. Furthermore, we demonstrate that this rescue

1 effect is mediated by the induction of senescence in cardiac fibroblasts. Since
2 age-related myocardial interstitial fibrosis is a critical factor in the
3 development of HFpEF, OPN could represent a novel target for therapeutic
4 interventions to modulate the cardiac remodeling process through antifibrotic
5 actions.

6 **Visceral adipose tissue is a major source of osteopontin during physiological** 7 **aging**

8 During aging VAT acquires a pro-inflammatory phenotype and progressively
9 undergoes tissue remodeling leading to impaired adipogenesis, inflammatory
10 cytokine production, and immune response activation.^{26, 27} Whilst a lot of
11 emphasis has been put on the pro-inflammatory state of the remodeled VAT
12 to interconnect aging, metabolic disorders and cardiovascular disease,²³ we
13 focus here on the pro-fibrotic impact of VAT on myocardium. Indeed, in our
14 murine model of physiological aging, we did not observe any increase in the
15 usual inflammatory markers (IL6, TNF α , IL1 β , data not shown) but a marked
16 increase in profibrotic factors such as TGF β and OPN.²⁸ We also identified an
17 age-related increase in leptin, a profibrotic adipokine that may interact with
18 OPN in triggering remote cardiac tissue fibrosis.²⁹

19 OPN, also known as secreted phosphoprotein 1 (SPP1), is a matricellular
20 protein involved in cell-matrix interactions, identified originally in
21 osteoblasts and osteoclasts but also secreted by many different cell types,
22 including immune cells and fibroblasts.³⁰ Its widespread effects are
23 illustrated by its role in high fat diet-induced obesity, where OPN expression
24 increases in VAT and induces VAT inflammation and abnormal glucose

1 metabolism.³¹ Our data demonstrate that aging is another important
2 pathophysiological condition of OPN upregulation in the VAT. By using a VAT
3 removal model, we confirmed that the elevated OPN plasma levels observed
4 in aged mice are mainly due to an increased OPN secretion by the VAT.
5 Therefore VAT plays an important role in the context of aging since it acts as
6 an endocrine organ releasing profibrotic cytokines (TGF β) and adipokines
7 (leptin), in addition to OPN, with potential effects on remote organs and more
8 specifically on myocardium.³²

9 **Visceral adipose tissue has remote effects on the development of myocardial** 10 **fibrosis during aging**

11 Starting from our observation that VAT removal led to a reduction in
12 circulating pro-fibrotic factors, we used VAT lipectomy to remotely alleviate
13 age-related (i.e. pre-existing) myocardial fibrosis. Indeed, VAT removal
14 performed in aged mice dramatically reduced interstitial myocardial fibrosis
15 and improved myocardial contractility and relaxation. While surgical VAT
16 removal has been shown to improve lifespan in rats,³³ we provide here the
17 first causal evidence that VAT is an important underlying cause of interstitial
18 myocardial fibrosis and subsequent cardiac aging. Our results are contrasting
19 with those obtained after removing large quantities of subcutaneous
20 abdominal fat, which are not consistently improving the cardiovascular risk
21 in humans or rodents,³⁴ thus illustrating the key role played by the VAT but
22 not the subcutaneous fat in myocardial aging.

23 Of note, the impact of visceral fat on myocardial function and fibrosis was
24 independent of any age-related metabolic alteration, since after VAT removal

1 metabolic tests (GTT and ITT) were unchanged. These findings point to the
2 role of VAT-released adipokines and profibrotic factors in mediating cardiac
3 fibrosis.^{35, 36} Beyond TGF- β increase and its recognized effects on fibroblast
4 proliferation and myofibroblast differentiation,³⁷ we specifically focused on
5 the role of age-induced OPN, which increases TGF- β secretion and has a
6 direct role on cardiac fibroblast growth and adhesion.²⁸

7 **Osteopontin and myocardial aging**

8 Whilst OPN's involvement in myocardial aging was unknown, there is
9 abundant evidence demonstrating that it plays an active role in many cardiac
10 diseases. Indeed, increased levels of OPN are associated with heart failure,³⁸⁻
11 ⁴⁰ cardiac hypertrophy⁴¹ and pressure overload.⁹ After myocardial infarction,
12 OPN also plays a major role by coordinating the intercellular signals required
13 to integrate myofibroblast proliferation, migration, and extracellular matrix
14 deposition with macrophage recruitment.⁸

15 However, OPN has not been found in the unstressed heart, which is consistent
16 with our results. Instead, here we identify a role in cardiac aging for VAT-
17 derived OPN as a critical humoral mediator responsible for the development
18 of interstitial myocardial fibrosis. Our results confirm that OPN expression
19 is required for activation of fibroblasts into myofibroblasts.²² Indeed we
20 demonstrate a parallel increase of myofibroblast number, as shown by
21 vimentin staining, with that of interstitial myocardial fibrosis in aged WT but
22 not in aged OPN^{-/-} mice.

23 Aging also upregulates myocardial levels of genes involved in fibrosis (CTGF)
24 and ECM remodeling (MMP-2, MMP-9 and TIMP-1) in old WT compared with

1 OPN^{-/-} mice. In addition, aging in WT mice but not in OPN^{-/-} mice was
2 associated with an increase in TGFβ plasma levels, a crucial factor mediating
3 fibrosis by promoting collagen and matrix synthesis and transdifferentiation
4 of fibroblasts to myofibroblasts via activation of Smad molecules.²²
5 The reduced cardiac fibroblast presence, activation, and collagen expression
6 led us to hypothesize that OPN deficiency induces a phenotype of fibroblast
7 senescence. This was confirmed by a marked increase in SA-βGal activity in
8 cardiac fibroblasts co-cultured with aged OPN^{-/-} mice plasma, and was
9 further supported by the induction of p16.
10 Taken together our results demonstrate that cardioprotective effects in aged
11 OPN^{-/-} mice are mediated by cardiac fibroblasts senescence, which reduces
12 age-related interstitial myocardial fibrosis and ultimately improves cardiac
13 function. Similar beneficial effects of cellular senescence have already been
14 reported in the context of development,⁴² wound healing⁴³ and tumor
15 suppression.⁴⁴ This modulation of cardiac fibroblast senescence during aging
16 is in agreement with recent reports suggesting that it contributes to limit
17 cardiac fibrosis under pathological conditions, such as myocardial infarction²⁵
18 or pressure-overload models²⁴. Our results bring new pathophysiological
19 insights into the maladaptive, age-dependent cardiac fibroblast proliferation
20 and activation that is under control of OPN produced in VAT.
21 In addition, we demonstrate for the first time that fibroblast senescence is
22 directly linked to attenuated cardiac interstitial fibrosis during physiological
23 cardiac aging. The reduced circulating OPN and TGFβ levels in our VAT
24 removal and OPN deficiency models, along with reduced age-related cardiac

1 fibrosis and dysfunction, suggest that these profibrotic factors secreted by the
2 VAT alter fibroblast senescence in the myocardium. The fact that cardiac
3 fibroblasts cultured with plasma from aged OPN^{-/-} mice showed increased
4 senescence reinforces our *in vivo* observation.

5 **Clinical implications**

6 Heart failure with preserved ejection fraction (HFpEF) is a common public
7 health problem steeply increasing with age and is associated with significant
8 morbidity and mortality.⁶ A common pathophysiological feature of HFpEF
9 and myocardial aging is the accumulation of extracellular matrix material
10 within the heart leading to myocardial fibrosis, a major contributor to
11 impaired cardiac relaxation and further decrease in contractility. This has
12 been recently suggested by I-PRESERVE study.⁴⁰ Specifically, this study
13 found that increased peripheral collagen turnover markers in addition to
14 OPN were correlated with increased mortality and cardiovascular
15 hospitalization in an HFpEF population. These results also suggest that
16 pathological fibrosis in the heart may contribute to adverse clinical outcomes
17 in patients with HFpEF. In support of a critical blood-borne secretome,
18 parabiosis experiments showed hearts of young animals acquiring HFpEF-
19 like features when exposed to blood from old animals, while hearts of old
20 animals reversed HFpEF-like features when exposed to blood of young
21 animals.⁴⁵ Our study provides new insights into the genesis of HFpEF and
22 identifies a key role of the VAT in driving the age-related cardiac remodeling
23 and inducing progressive interstitial myocardial fibrosis through the
24 secretion of profibrotic mediators such as OPN and TGFβ.

1 Importantly, using OPN as a molecular target, we managed to reverse age-
2 related cardiac dysfunction with Agelastatin A. This observation reinforces
3 the key role of OPN in cardiac aging and identifies it as a potential
4 pharmacological target for preventing cardiac aging.

5 **Conclusion:**

6 Our results demonstrate that OPN is a key regulator of cardiac aging and
7 uncover an interesting crosstalk between visceral adipose tissue and
8 myocardium, which could contribute to the pathogenesis of age-related heart
9 failure with preserved ejection fraction (Figure 6). Future therapeutic
10 strategies that directly target OPN could represent an innovative way to limit
11 cardiac fibrosis and subsequent disorders.

13 **Source of findings**

14 This work was supported by RHU CARMMA grant (ANR-15-RHUS-0003)

16 **Disclosure**

17 none

19 **Affiliations**

20 From INSERM IMRB U955, Université Paris-Est Creteil (UPEC), Créteil,
21 France (D.S., G.C., M.P., J.T., R.M., M.S., E.M., S.H., S.A., C.H., G.D.) ; AP-
22 HP, Department of Cardiology, Henri Mondor Hospital, DHU-ATVB, Créteil,
23 France (J.T., G.D.) ; INSERM UMRS1166, Université Pierre et Marie Curie
24 (UPMC), Sorbonne University, Paris, France (N.S., G.M., K.C., S.H.) ;
25 Institute of Cardiometabolism and Nutrition, ICAN, Pitié-Salpêtrière

1 Hospital, Paris, France (G.M., K.C., S.H.) ; AP-HP Vaccine Research
2 Institute (VRI), Créteil, France (M.S., S.H.) ; INSERM, Unité 1065, Nice,
3 France (P.G.) ; University of Nice-Sophia-Antipolis, Nice, France (P.G.) ;
4 Centre Hospitalier Universitaire de Nice, Hôpital L'Archet, Nice Cedex 3,
5 France (P.G.) ; Assistance Publique Hopitaux de Paris, AP-HP, Pitié-
6 Salpêtrière Hospital, Nutrition and Endocrinology Department and Hepato-
7 biliary and Digestive Surgery Department, Paris, France (K.C.) ; AP-HP,
8 Department of Physiology, Henri Mondor Hospital, DHU-ATVB, Créteil,
9 France (S.A.) ; Laboratory of Synthetic Organic and Medicinal Chemistry,
10 Division of Pharmaceutical Sciences, Graduate School of Medicine,
11 Dentistry, and Pharmaceutical Sciences, Okayama University, Okayama,
12 Japan (I.T., T.Y.)

13

14 **Reference**

- 15 1. Lazzarini V, Mentz RJ, Fiuzat M, Metra M and O'Connor CM. Heart
16 failure in elderly patients: distinctive features and unresolved issues. *Eur J*
17 *Heart Fail.* 2013;15:717-23.
- 18 2. Dannenberg AL, Levy D and Garrison RJ. Impact of age on
19 echocardiographic left ventricular mass in a healthy population (the
20 Framingham Study). *Am J Cardiol.* 1989;64:1066-8.
- 21 3. Chen W and Frangogiannis NG. The role of inflammatory and
22 fibrogenic pathways in heart failure associated with aging. *Heart Fail Rev.*
23 2010;15:415-22.
- 24 4. Frangogiannis NG. Matricellular proteins in cardiac adaptation and
25 disease. *Physiol Rev.* 2012;92:635-88.
- 26 5. Borlaug BA and Paulus WJ. Heart failure with preserved ejection
27 fraction: pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Eur Heart J.*

- 1 2011;32:670-9.
- 2 6. Shah SJ, Kitzman DW, Borlaug BA, van Heerebeek L, Zile MR, Kass
3 DA and Paulus WJ. Phenotype-Specific Treatment of Heart Failure With
4 Preserved Ejection Fraction: A Multiorgan Roadmap. *Circulation*.
5 2016;134:73-90.
- 6 7. Tian Y and Morrisey EE. Importance of myocyte-nonmyocyte
7 interactions in cardiac development and disease. *Circ Res*. 2012;110:1023-34.
- 8 8. Trueblood NA, Xie Z, Communal C, Sam F, Ngoy S, Liaw L, Jenkins
9 AW, Wang J, Sawyer DB, Bing OH, Apstein CS, Colucci WS and Singh K.
10 Exaggerated left ventricular dilation and reduced collagen deposition after
11 myocardial infarction in mice lacking osteopontin. *Circ Res*. 2001;88:1080-7.
- 12 9. Xie Z, Singh M and Singh K. Osteopontin modulates myocardial
13 hypertrophy in response to chronic pressure overload in mice. *Hypertension*.
14 2004;44:826-31.
- 15 10. Dahiya S, Givvimani S, Bhatnagar S, Qipshidze N, Tyagi SC and
16 Kumar A. Osteopontin-stimulated expression of matrix metalloproteinase-9
17 causes cardiomyopathy in the mdx model of Duchenne muscular dystrophy. *J*
18 *Immunol*. 2011;187:2723-31.
- 19 11. Matsui Y, Jia N, Okamoto H, Kon S, Onozuka H, Akino M, Liu L,
20 Morimoto J, Rittling SR, Denhardt D, Kitabatake A and Uede T. Role of
21 osteopontin in cardiac fibrosis and remodeling in angiotensin II-induced
22 cardiac hypertrophy. *Hypertension*. 2004;43:1195-201.
- 23 12. Singh M, Foster CR, Dalal S and Singh K. Role of osteopontin in heart
24 failure associated with aging. *Heart Fail Rev*. 2010;15:487-94.
- 25 13. Arnlov J, Evans JC, Benjamin EJ, Larson MG, Levy D, Sutherland P,
26 Siwik DA, Wang TJ, Colucci WS and Vasan RS. Clinical and
27 echocardiographic correlates of plasma osteopontin in the community: the

1 Framingham Heart Study. *Heart*. 2006;92:1514-5.

2 14. Saker M, Lipskaia L, Marcos E, Abid S, Parpaleix A, Houssaini A,
3 Validire P, Girard P, Noureddine H, Boyer L, Vienney N, Amsellem V,
4 Marguerit L, Maitre B, Derumeaux G, Dubois-Rande JL, Jourdan-Lesaux C,
5 Delcroix M, Quarck R and Adnot S. Osteopontin, a Key Mediator Expressed
6 by Senescent Pulmonary Vascular Cells in Pulmonary Hypertension.
7 *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2016;36:1879-90.

8 15. Paliwal P, Pishesha N, Wijaya D and Conboy IM. Age dependent
9 increase in the levels of osteopontin inhibits skeletal muscle regeneration.
10 *Aging (Albany NY)*. 2012;4:553-66.

11 16. Mason CK, McFarlane S, Johnston PG, Crowe P, Erwin PJ, Domostoj
12 MM, Campbell FC, Manaviazar S, Hale KJ and El-Tanani M. Agelastatin A:
13 a novel inhibitor of osteopontin-mediated adhesion, invasion, and colony
14 formation. *Mol Cancer Ther*. 2008;7:548-58.

15 17. Yoshimitsu T, Ino T and Tanaka T. Total synthesis of (-)-agelastatin A.
16 *Org Lett*. 2008;10:5457-60.

17 18. Suffee N, Moore-Morris T, Farahmand P, Rucker-Martin C, Dilanian
18 G, Fradet M, Sawaki D, Derumeaux G, LePrince P, Clement K, Dugail I,
19 Puceat M and Hatem SN. Atrial natriuretic peptide regulates adipose tissue
20 accumulation in adult atria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114:E771-E780.

21 19. Ternacle J, Wan F, Sawaki D, Surenaud M, Pini M, Mercedes R,
22 Ernande L, Audureau E, Dubois-Rande JL, Adnot S, Hue S, Czibik G and
23 Derumeaux G. Short-term high-fat diet compromises myocardial function: a
24 radial strain rate imaging study. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*. 2017.

25 20. Derumeaux G, Ichinose F, Raheer MJ, Morgan JG, Coman T, Lee C,
26 Cuesta JM, Thibault H, Bloch KD, Picard MH and Scherrer-Crosbie M.
27 Myocardial alterations in senescent mice and effect of exercise training: a

1 strain rate imaging study. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2008;1:227-34.

2 21. Wan F, Letavernier E, Le Saux CJ, Houssaini A, Abid S, Czibik G,
3 Sawaki D, Marcos E, Dubois-Rande JL, Baud L, Adnot S, Derumeaux G and
4 Gellen B. Calpastatin overexpression impairs postinfarct scar healing in mice
5 by compromising reparative immune cell recruitment and activation. *Am J*
6 *Physiol Heart Circ Physiol*. 2015;309:H1883-93.

7 22. Lenga Y, Koh A, Perera AS, McCulloch CA, Sodek J and Zohar R.
8 Osteopontin expression is required for myofibroblast differentiation. *Circ Res*.
9 2008;102:319-27.

10 23. Bujak M, Ren G, Kweon HJ, Dobaczewski M, Reddy A, Taffet G, Wang
11 XF and Frangogiannis NG. Essential role of Smad3 in infarct healing and in
12 the pathogenesis of cardiac remodeling. *Circulation*. 2007;116:2127-38.

13 24. Meyer K, Hodwin B, Ramanujam D, Engelhardt S and Sarikas A.
14 Essential Role for Premature Senescence of Myofibroblasts in Myocardial
15 Fibrosis. *J Am Coll Cardiol*. 2016;67:2018-28.

16 25. Zhu F, Li Y, Zhang J, Piao C, Liu T, Li HH and Du J. Senescent cardiac
17 fibroblast is critical for cardiac fibrosis after myocardial infarction. *PLoS One*.
18 2013;8:e74535.

19 26. Tchkonja T, Morbeck DE, Von Zglinicki T, Van Deursen J, Lustgarten
20 J, Scrbble H, Khosla S, Jensen MD and Kirkland JL. Fat tissue, aging, and
21 cellular senescence. *Aging Cell*. 2010;9:667-84.

22 27. Bapat SP, Myoung Suh J, Fang S, Liu S, Zhang Y, Cheng A, Zhou C,
23 Liang Y, LeBlanc M, Liddle C, Atkins AR, Yu RT, Downes M, Evans RM and
24 Zheng Y. Depletion of fat-resident Treg cells prevents age-associated insulin
25 resistance. *Nature*. 2015;528:137-41.

26 28. Collins AR, Schnee J, Wang W, Kim S, Fishbein MC, Bruemmer D,
27 Law RE, Nicholas S, Ross RS and Hsueh WA. Osteopontin modulates

- 1 angiotensin II-induced fibrosis in the intact murine heart. *J Am Coll Cardiol.*
2 2004;43:1698-705.
- 3 29. Coombes JD, Choi SS, Swiderska-Syn M, Manka P, Reid DT, Palma E,
4 Briones-Orta MA, Xie G, Younis R, Kitamura N, Della Peruta M, Bitencourt
5 S, Dolle L, Oo YH, Mi Z, Kuo PC, Williams R, Chokshi S, Canbay A, Claridge
6 LC, Eksteen B, Diehl AM and Syn WK. Osteopontin is a proximal effector of
7 leptin-mediated non-alcoholic steatohepatitis (NASH) fibrosis. *Biochim*
8 *Biophys Acta.* 2016;1862:135-44.
- 9 30. Denhardt DT, Noda M, O'Regan AW, Pavlin D and Berman JS.
10 Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of
11 inflammation, tissue remodeling, and cell survival. *J Clin Invest.*
12 2001;107:1055-61.
- 13 31. Shirakawa K, Yan X, Shinmura K, Endo J, Kataoka M, Katsumata Y,
14 Yamamoto T, Anzai A, Isobe S, Yoshida N, Itoh H, Manabe I, Sekai M,
15 Hamazaki Y, Fukuda K, Minato N and Sano M. Obesity accelerates T cell
16 senescence in murine visceral adipose tissue. *J Clin Invest.* 2016;126:4626-
17 4639.
- 18 32. Iozzo P. Viewpoints on the way to the consensus session: where does
19 insulin resistance start? The adipose tissue. *Diabetes Care.* 2009;32 Suppl
20 2:S168-73.
- 21 33. Muzumdar R, Allison DB, Huffman DM, Ma X, Atzmon G, Einstein
22 FH, Fishman S, Poduval AD, McVei T, Keith SW and Barzilai N. Visceral
23 adipose tissue modulates mammalian longevity. *Aging Cell.* 2008;7:438-40.
- 24 34. Klein S, Fontana L, Young VL, Coggan AR, Kilo C, Patterson BW and
25 Mohammed BS. Absence of an effect of liposuction on insulin action and risk
26 factors for coronary heart disease. *N Engl J Med.* 2004;350:2549-57.
- 27 35. Gabriely I, Ma XH, Yang XM, Atzmon G, Rajala MW, Berg AH,

- 1 Scherer P, Rossetti L and Barzilai N. Removal of visceral fat prevents insulin
2 resistance and glucose intolerance of aging: an adipokine-mediated process?
3 *Diabetes*. 2002;51:2951-8.
- 4 36. Fabbrini E, Tamboli RA, Magkos F, Marks-Shulman PA, Eckhauser
5 AW, Richards WO, Klein S and Abumrad NN. Surgical removal of omental fat
6 does not improve insulin sensitivity and cardiovascular risk factors in obese
7 adults. *Gastroenterology*. 2010;139:448-55.
- 8 37. Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Prunotto M, Desmouliere A, Varga
9 J, De Wever O, Mareel M and Gabbiani G. Recent developments in
10 myofibroblast biology: paradigms for connective tissue remodeling. *Am J*
11 *Pathol*. 2012;180:1340-55.
- 12 38. Singh K, Sirokman G, Communal C, Robinson KG, Conrad CH,
13 Brooks WW, Bing OH and Colucci WS. Myocardial osteopontin expression
14 coincides with the development of heart failure. *Hypertension*. 1999;33:663-
15 70.
- 16 39. Stawowy P, Blaschke F, Pfautsch P, Goetze S, Lippek F, Wollert-Wulf
17 B, Fleck E and Graf K. Increased myocardial expression of osteopontin in
18 patients with advanced heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2002;4:139-46.
- 19 40. Krum H, Elsik M, Schneider HG, Ptaszynska A, Black M, Carson PE,
20 Komajda M, Massie BM, McKelvie RS, McMurray JJ, Zile MR and Anand IS.
21 Relation of peripheral collagen markers to death and hospitalization in
22 patients with heart failure and preserved ejection fraction: results of the I-
23 PRESERVE collagen substudy. *Circ Heart Fail*. 2011;4:561-8.
- 24 41. Graf K, Do YS, Ashizawa N, Meehan WP, Giachelli CM, Marboe CC,
25 Fleck E and Hsueh WA. Myocardial osteopontin expression is associated with
26 left ventricular hypertrophy. *Circulation*. 1997;96:3063-71.
- 27 42. Storer M, Mas A, Robert-Moreno A, Pecoraro M, Ortells MC, Di

1 Giacomo V, Yosef R, Pilpel N, Krizhanovsky V, Sharpe J and Keyes WM.
2 Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic
3 growth and patterning. Cell. 2013;155:1119-30.

4 43. Demaria M, Ohtani N, Youssef SA, Rodier F, Toussaint W, Mitchell JR,
5 Laberge RM, Vijg J, Van Steeg H, Dolle ME, Hoeijmakers JH, de Bruin A,
6 Hara E and Campisi J. An essential role for senescent cells in optimal wound
7 healing through secretion of PDGF-AA. Dev Cell. 2014;31:722-33.

8 44. Perez-Mancera PA, Young AR and Narita M. Inside and out: the
9 activities of senescence in cancer. Nat Rev Cancer. 2014;14:547-58.

10 45. Loffredo FS, Steinhauser ML, Jay SM, Gannon J, Pancoast JR,
11 Yalamanchi P, Sinha M, Dall'Osso C, Khong D, Shadrach JL, Miller CM,
12 Singer BS, Stewart A, Psychogios N, Gerszten RE, Hartigan AJ, Kim MJ,
13 Serwold T, Wagers AJ and Lee RT. Growth differentiation factor 11 is a
14 circulating factor that reverses age-related cardiac hypertrophy. Cell.
15 2013;153:828-39.

16

Disclaimer: The manuscript is confidential, intended for peer review only, and not to be published.

1 **Figure legends**

2

3 **Figure 1. Visceral adipose tissue is a major source of osteopontin during**
4 **aging.**

5 (A) Plasma OPN levels in aged vs. young WT mice, N=10/group. (B) Relative
6 OPN gene expression in organs of young and aged WT mice (TA: anterior
7 tibial muscle; IWAT and EWAT, inguinal and epididymal white adipose
8 tissue, respectively), N=3-9/group. (C) Visceral adipose tissue (EWAT)
9 immunofluorescence for OPN (red); counterstaining with DAPI (blue) and
10 F4/80 (green), scale bar 25 μ m. (D) Immunoblotting for OPN in the EWAT
11 (β -actin as loading control). (E) Myocardial immunofluorescence for OPN
12 (green): counterstaining with DAPI (blue) and α -actinin (red). The white
13 arrow indicates a single OPN-positive cell, scale bar 50 μ m. (F)
14 Immunoblotting for OPN in myocardium, with recombinant mouse OPN
15 protein as positive control and α -actinin as loading control, NS denotes non-
16 specific bands. (G) Immunofluorescence for OPN (green) in human atrial
17 epicardium: counterstaining with α -actinin (red) and DAPI (blue), scale bar
18 25 μ m. Plotted data is individual values + mean (A) or mean \pm SEM (B).
19 Statistical significance was evaluated by unpaired t-test: *p<0.05, **p<0.01,
20 and ***p<0.001.

21

22 **Figure 2. Visceral adipose tissue plays a key role in inducing myocardial**
23 **fibrosis and cardiac dysfunction during aging.**

24 (A) Schematic representation of the visceral (epididymal) white adipose
25 tissue removal (EWATectomy) protocol in aged WT mice. (B) Body weight
26 change after sham operation or EWATectomy, N=8/group. Dashed line
27 signifies the time of surgery. (C) EWAT weight after sham surgery or

1 EWATectomy, N=8/group. (D) Plasma levels of OPN after sham surgery or
2 EWATectomy, N=6/group. (E) Plasma levels of active TGF β -1, N=2/group.
3 (F) Sirius Red staining and quantification of myocardial interstitial fibrosis,
4 N=4/group. (G) Vimentin staining and quantification of cardiac fibroblast
5 area; counterstaining with DAPI (blue), N=3/group. (H) Phosphorylated
6 Smad3 (pSmad3; green) staining and quantification of myocardial pSmad3
7 positive cells; counterstaining with DAPI (blue) and Phalloidin (red),
8 N=3/group. For F to H the scale bar shows 50 μ m. (I) Echocardiographic
9 strain rate (SR) assessment before/after sham surgery (grey dots) and
10 EWATectomy (red dots), N=8/group. (J) *In vivo* hemodynamic assessment
11 (dP/dt_{max} & dP/dt_{min}) at the end of the protocol, N=8/group. (K)
12 Intraperitoneal glucose tolerance test (GTT) after sham operation and
13 EWATectomy, N=8/group. Plotted data is presented as mean \pm SEM (B, C,
14 F-H & J) or individual values + mean (D, E, I). Statistical significance was
15 evaluated by unpaired t-test or two-way ANOVA: *p<0.05, **p<0.01, and
16 ***p<0.001.

17
18 **Figure 3. Osteopontin-deficient mice are protected against age-related**
19 **myocardial fibrosis and cardiac dysfunction.**

20 (A) Heart weight to tibia length (HW/TL) in young and aged WT and OPN
21 KO mice, N=7-15/group. (B) Sirius Red, (C) Vimentin (red) and (D)
22 phosphorylated Smad3 (pSmad3: green; Phalloidin: red) staining of the
23 ventricular myocardium, scale bar 50 μ m and quantification based on N=3-4
24 hearts per group. (E) Myocardial fibrosis-related gene induction by aging.
25 N=6 hearts/group. (F) Echocardiographic strain-rate (SR) curves and
26 quantification by peak values in aged WT and OPN^{-/-} myocardium,
27 N=5/group. (G) Bi-plot of mean \pm SD comparing interstitial myocardial

1 fibrosis versus SR (systolic function). (H) Plasma BNP levels, N=4-5/group.
2 Plotted data is presented as mean \pm SEM (A, B, C, D, E, & F) or individual
3 values + mean (H). Statistical significance evaluated by unpaired t-test or
4 one-way ANOVA with Bonferroni correction: *p<0.05, **p<0.01, and
5 ***p<0.001.

6

7 **Figure 4. OPN promotes myocardial fibrosis by modulating senescence of**
8 **cardiac fibroblasts.**

9 (A) Schematic representation of cardiac fibroblast culture with plasma
10 coming from aged WT or OPN $-/-$ mice. Primary cultured WT mouse cardiac
11 fibroblasts were stimulated with indicated plasma for 24 hours, and then
12 analyzed for gene expression or SA- β -Gal positivity. (B) SA- β -Gal staining
13 after incubation with plasma. (C) Relative transcript levels of p16 (Cdkn2a),
14 N=4/group. (D) Relative transcript levels of fibroblast activation markers
15 (Acta2 and Fn1), N=4/group. (E) Correlation between p16 (Cdkn2a) and
16 Acta2 transcript levels, N=10/group. (F) Myocardial p16 (green; white
17 arrows) and vimentin (red) co-staining of aged WT and OPN $-/-$ mice, and
18 (G) aged sham and EWATectomy mice. Bar graphs denote quantification of
19 p16-positive fibroblasts. Sections were counterstained with DAPI (blue),
20 N=3/group, scale bar 50 μ m. Plotted data is presented as mean \pm SEM (C, D,
21 F & G) or as individual data (E). Statistical significance was evaluated by
22 unpaired t-test: *p<0.05, **p<0.01, and ***p<0.001.

23

24 **Figure 5. The osteopontin inhibitor Agelastatin A restores juvenile cardiac**
25 **structure and function in aged WT mice.**

26 (A) Schematic representation of the Agelastatin A (AA) treatment protocol
27 in aged WT mice. (B) Immunoblotting for OPN in the visceral adipose tissue

1 4 weeks after vehicle or AA treatment. Bar graph shows OPN protein levels
2 relative to β -actin, N=4/group. (C) Sirius Red staining and quantification of
3 myocardial interstitial fibrosis, N=4/group, scale bar 50 μ m. (D) Vimentin
4 staining (red) and quantification of cardiac fibroblast area. Sections were
5 counterstained with DAPI (blue), N=3/group, scale bar 50 μ m. (E)
6 Quantification of phosphorylated Smad3 (pSmad3) immunofluorescence,
7 N=3/group. (F) Relative myocardial profibrotic gene expression after vehicle
8 or AA treatment, N=6/group. (G) Myocardial p16 (green; white arrows) and
9 vimentin (red) staining after vehicle or AA treatment. Sections were
10 counterstained with DAPI (blue), N=3/group, scale bar 50 μ m. (H)
11 Echocardiographic strain-rate (SR) from baseline to 4 weeks of treatment
12 with vehicle or AA, N=8/group. (I) In vivo hemodynamic assessment
13 (dP/dt_{max} , dP/dt_{min}) 4 weeks after vehicle or AA treatment, N=8/group.
14 Plotted data is presented as mean \pm SEM. Statistical significance
15 was evaluated by unpaired t-test or two-way ANOVA: * p <0.05, ** p <0.01,
16 and *** p <0.001.

17
18 **Figure 6. Schematic illustration: Visceral adipose tissue mediates age-**
19 **related cardiac fibrosis through secretion of profibrotic factors stimulating**
20 **myocardial fibroblasts and impairing fibroblast senescence.**

Table 1: Echocardiographic and *in vivo* hemodynamic assessment

Echocardiographic assessment: young & aged, wild-type & OPN^{-/-} mice

Group	HR (beat/min)	AWTd (mm)	LVDd (mm)	LVDs (mm)	PWTd (mm)	LVEF (%)	LVFS (%)	SR _{ant} (/second)	SR _{post} (/second)
WT young	610±23	0.71±0.10	2.78±0.35	1.63±0.35	0.74±0.07	78.9±6.4	42.0±6.4	26.5±2.5	29.0±2.5
OPN ^{-/-} young	606±26	0.73±0.06	2.89±0.31	1.65±0.24	0.76±0.08	79.8±6.4	43.1±6.3	26.7±3.4	27.2±2.7
WT aged	633±33	0.87±0.07	2.72±0.22	1.33±0.27	0.87±0.06	86.5±6.8	50.8±8.5	20.4±1.8	19.2±2.6
OPN ^{-/-} aged	622±18	0.84±0.04	3.35±0.18	1.83±0.29	0.87±0.04	82.1±6.2	45.5±7.0	23.3±1.9	24.1±2.3
<i>P</i> value	0.2752	0.2629	<0.0001	0.0002	0.8988	0.1035	0.0989	0.001	<0.0001

Data indicates mean±SD, n=5/group. Statistical significance (p value) between WT aged and OPN^{-/-} aged mice was calculated by unpaired t-test. Abbreviations; HR: heart rate, AWTd: diastolic anterior wall thickness, LVDd: end-diastolic left ventricular diameter, LVDs: end-systolic left ventricular diameter, PWTd: diastolic posterior wall thickness, LVEF: Left ventricular ejection fraction, LVFS: Left ventricular fractional shortening, SR_{ant}: strain rate in the anterior wall, and SR_{post}: strain rate in the posterior wall.

***In vivo* hemodynamic assessment: young & aged, wild-type & OPN^{-/-} mice**

Group	HR (beat/min)	AoPs (mmHg)	AoPd (mmHg)	LVPs (mmHg)	LVPd (mmHg)	LV dP/dt _{max} (mmHg/second)	LV dP/dt _{min} (mmHg/second)
WT young	544±25	101±8	74±7	106±7	0.8±1.3	10769±549	9324±1116
OPN ^{-/-} young	549±5	97±8	52±11	97±5	2.8±3.4	10265±359	9509±964
WT aged	567±12	86±12	63±7	88±12	2.6±2.8	6891±373	6776±596
OPN ^{-/-} aged	583±27	106±10	68±12	107±11	0.9±1.5	9995±890	9230±811
<i>P</i> value	0.1891	0.0039	0.4096	0.0084	0.1789	<0.0001	0.0006

Data indicates mean±SD, n=5/group. Statistical significance (p value) between WT aged and OPN^{-/-} aged mice was calculated by unpaired t-test. Abbreviations; HR: Heart rate, AoPs: aortic systolic pressure, AoPd: aortic diastolic pressure, LVPs: left ventricular systolic pressure, LVPd: left ventricular diastolic pressure, LV dP/dt_{max}: left ventricular maximum dP/dt, and LV dP/dt_{min}: left ventricular minimum dP/dt.

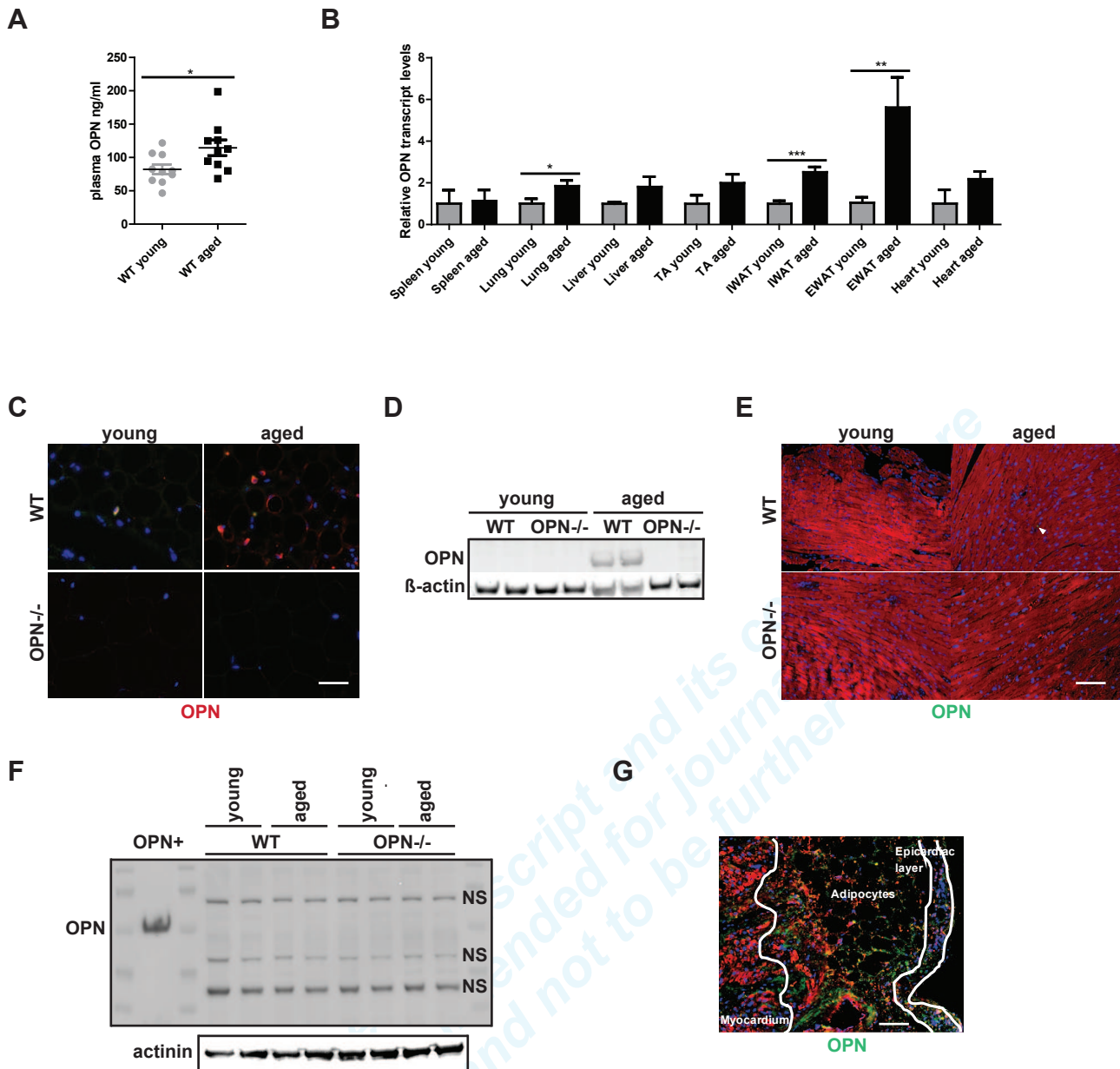


Figure 1. Visceral adipose tissue is a major source of osteopontin during aging.

(A) Plasma OPN levels in aged vs. young WT mice, N=10/group. (B) Relative OPN gene expression in organs of young and aged WT mice (TA: anterior tibial muscle; IWAT and EWAT, inguinal and epididymal white adipose tissue, respectively), N=3-9/group. (C) Visceral adipose tissue (EWAT) immunofluorescence for OPN (red); counterstaining with DAPI (blue) and F4/80 (green), scale bar 25 μ m. (D) Immunoblotting for OPN in the EWAT (β -actin as loading control). (E) Myocardial immunofluorescence for OPN (green): counterstaining with DAPI (blue) and α -actinin (red). The white arrow indicates a single OPN-positive cell, scale bar 50 μ m. (F) Immunoblotting for OPN in myocardium, with recombinant mouse OPN protein as positive control and α -actinin as loading control, NS denotes non-specific bands. (G) Immunofluorescence for OPN (green) in human atrial epicardium: counterstaining with α -actinin (red) and DAPI (blue), scale bar 25 μ m. Plotted data is individual values + mean (A) or mean \pm SEM (B). Statistical significance was evaluated by unpaired t-test: * p <0.05, ** p <0.01, and *** p <0.001.

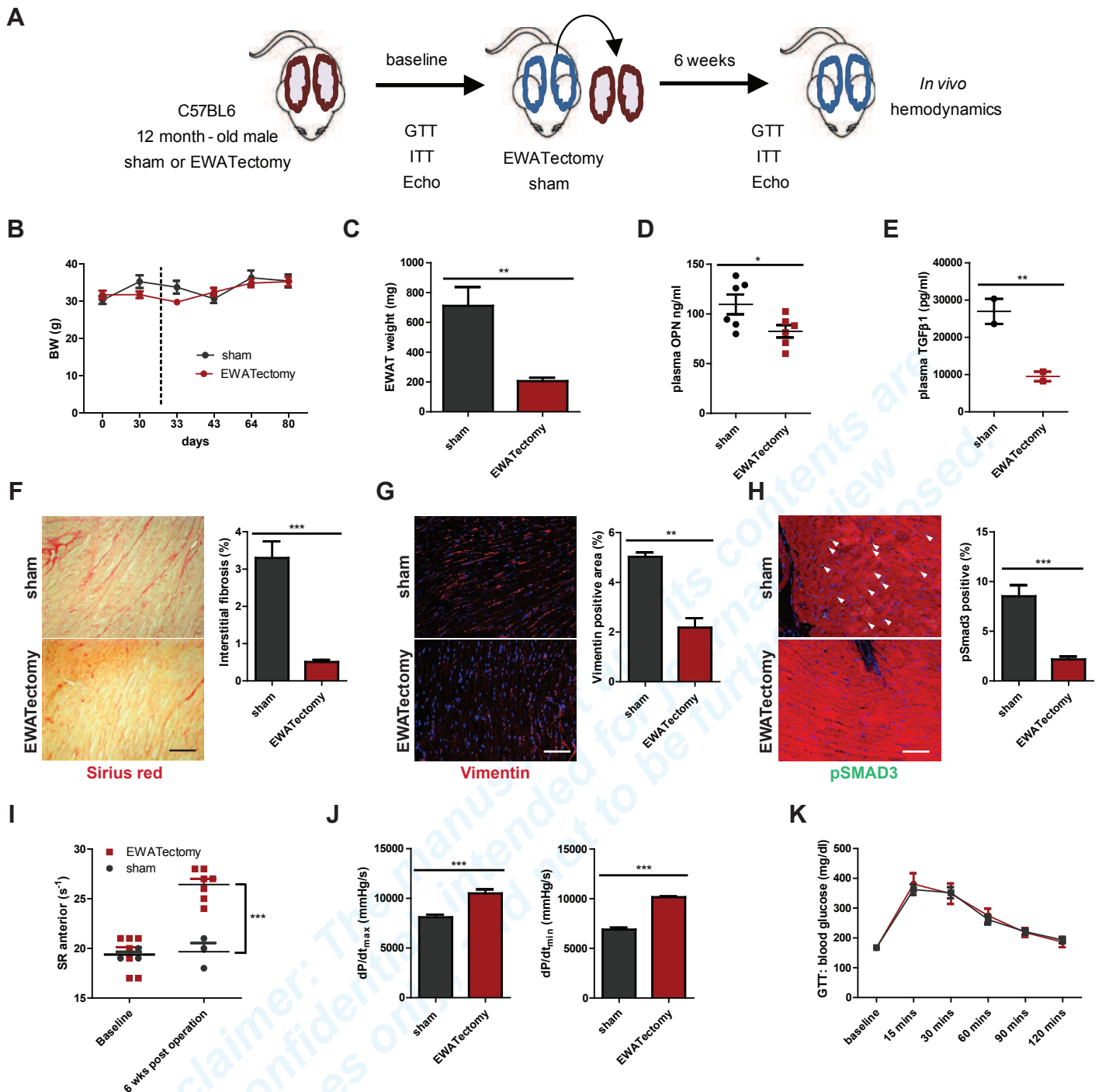


Figure 2. Visceral adipose tissue plays a key role in inducing myocardial fibrosis and cardiac dysfunction during aging.

(A) Schematic representation of the visceral (epididymal) white adipose tissue removal (EWATectomy) protocol in aged WT mice. (B) Body weight change after sham operation or EWATectomy, N=8/group. Dashed line signifies the time of surgery. (C) EWAT weight after sham surgery or EWATectomy, N=8/group. (D) Plasma levels of OPN after sham surgery or EWATectomy, N=6/group. (E) Plasma levels of active TGFβ-1, N=2/group. (F) Sirius Red staining and quantification of myocardial interstitial fibrosis, N=4/group. (G) Vimentin staining and quantification of cardiac fibroblast area; counterstaining with DAPI (blue), N=3/group. (H) Phosphorylated Smad3 (pSmad3; green) staining and quantification of myocardial pSmad3 positive cells; counterstaining with DAPI (blue) and Phalloidin (red), N=3/group. For F to H the scale bar shows 50 μm. (I) Echocardiographic strain-rate (SR) assessment before/after sham surgery (grey dots) and EWATectomy (red dots), N=8/group. (J) In vivo hemodynamic assessment (dP/dt_{max} & dP/dt_{min}) at the end of the protocol, N=8/group. (K) Intraperitoneal glucose tolerance test (GTT) after sham operation and EWATectomy, N=8/group. Plotted data is presented as mean ± SEM (B, C, F-H & J) or individual values + mean (D, E, I). Statistical significance was evaluated by unpaired t-test or two-way ANOVA: *p<0.05, **p<0.01, and ***p<0.001.

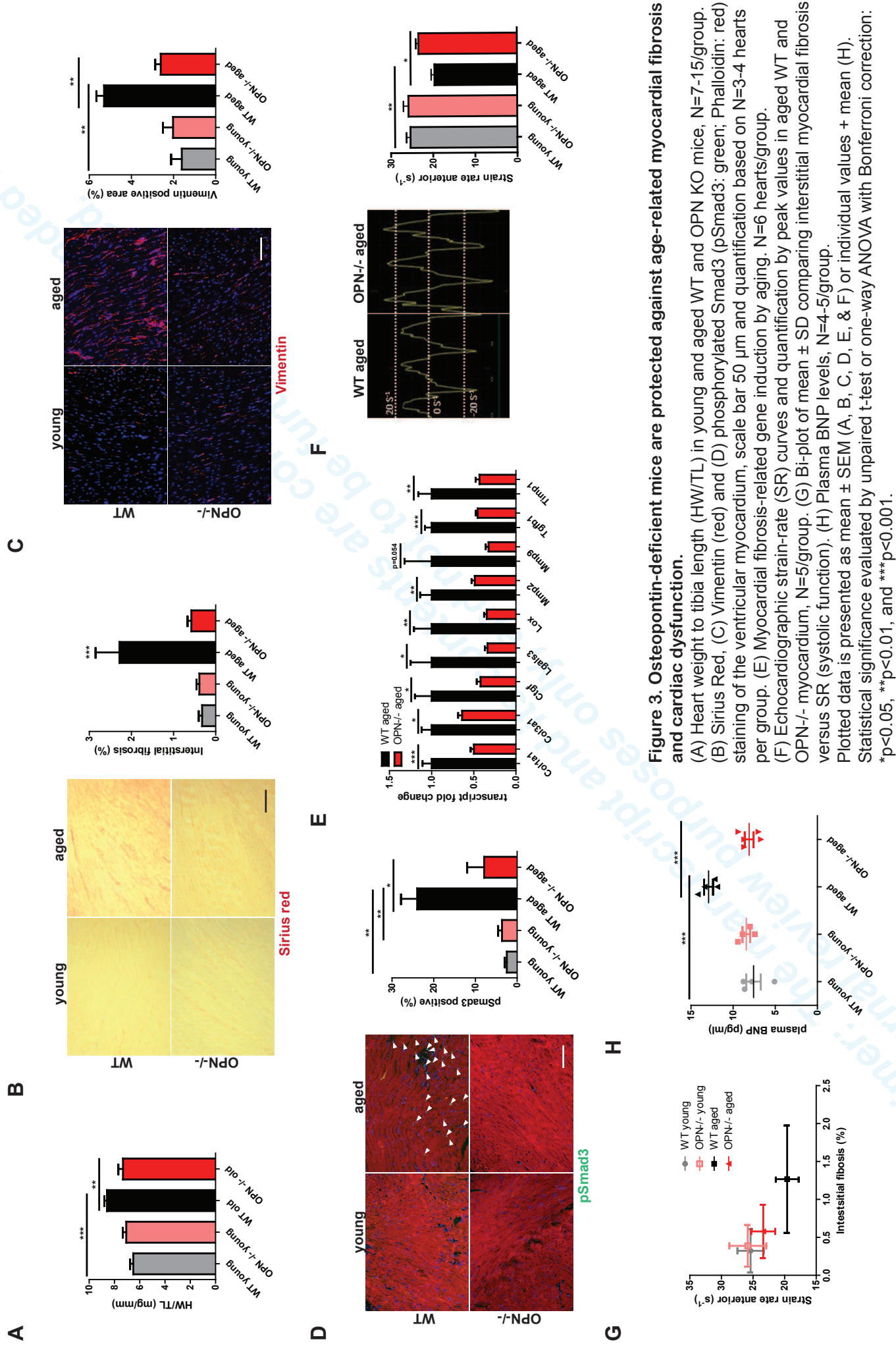


Figure 3. Osteopontin-deficient mice are protected against age-related myocardial fibrosis and cardiac dysfunction. (A) Heart weight to tibia length (HW/TL) in young and aged WT and OPN KO mice, N=7-15/group. (B) Sirius Red, (C) Vimentin (red) and (D) phosphorylated Smad3 (pSmad3; green; Phalloidin; red) staining of the ventricular myocardium, scale bar 50 μ m and quantification based on N=3-4 hearts per group. (E) Myocardial fibrosis-related gene induction by aging. N=6 hearts/group. (F) Echocardiographic strain-rate (SR) curves and quantification by peak values in aged WT and OPN^{-/-} myocardium, N=5/group. (G) Bi-plot of mean \pm SD comparing interstitial myocardial fibrosis versus SR (systolic function). (H) Plasma BNP levels, N=4-5/group. Plotted data is presented as mean \pm SEM (A, B, C, D, E, & F) or individual values + mean (H). Statistical significance evaluated by unpaired t-test or one-way ANOVA with Bonferroni correction: * p <0.05, ** p <0.01, and *** p <0.001.

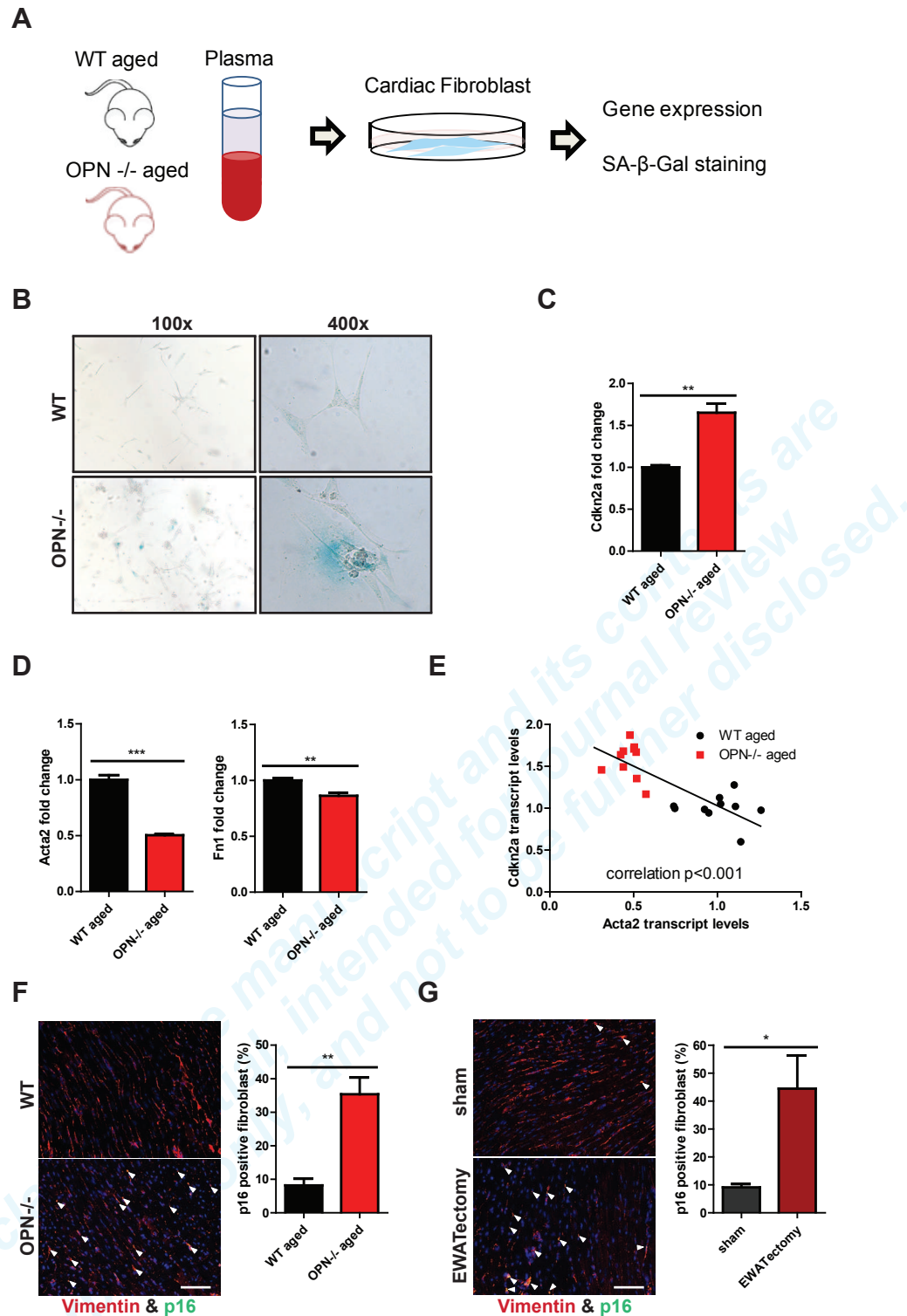


Figure 4. OPN promotes myocardial fibrosis by modulating senescence of cardiac fibroblasts.

(A) Schematic representation of cardiac fibroblast culture with plasma coming from aged WT or OPN ^{-/-} mice. Primary cultured WT mouse cardiac fibroblasts were stimulated with indicated plasma for 24 hours, and then analyzed for gene expression or SA-β-Gal positivity. (B) SA-β-Gal staining after incubation with plasma. (C) Relative transcript levels of p16, N=4/group. (D) Relative transcript levels of fibroblast activation markers (Acta2 and Fn1), N=4/group. (E) Correlation between p16 and Acta2 transcript levels, N=10/group. (F) Myocardial p16 (green; white arrows) and vimentin (red) co-staining of aged WT and OPN ^{-/-} mice, and (G) aged sham and EWATectomy mice. Bar graphs denote quantification of p16-positive fibroblasts. Sections were counterstained with DAPI (blue), N=3/group, scale bar 50 μm. Plotted data is presented as mean ± SEM (C, D, F & G) or as individual data (E). Statistical significance was evaluated by unpaired t-test: *p<0.05, **p<0.01, and ***p<0.001.

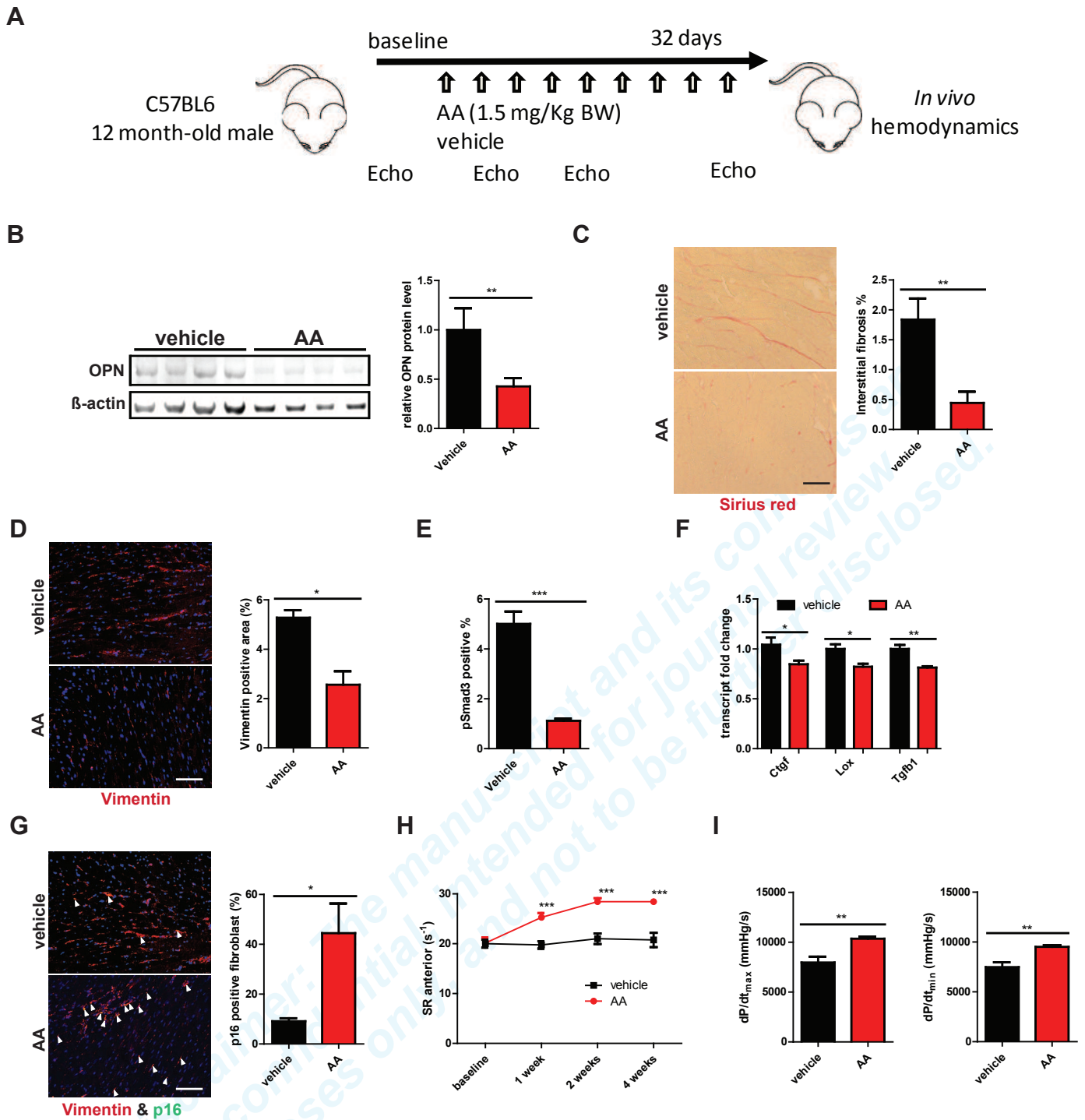
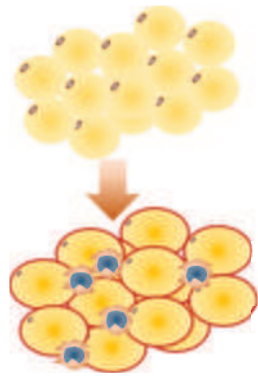


Figure 5. The osteopontin inhibitor Agelastatin A restores juvenile cardiac structure and function in aged WT mice.

(A) Schematic representation of the Agelastatin A (AA) treatment protocol in aged WT mice. (B) Immunoblotting for OPN in the visceral adipose tissue 4 weeks after vehicle or AA treatment. Bar graph shows OPN protein levels relative to β -actin, N=4/group. (C) Sirius Red staining and quantification of myocardial interstitial fibrosis, N=4/group, scale bar 50 μ m. (D) Vimentin staining (red) and quantification of cardiac fibroblast area. Sections were counterstained with DAPI (blue), N=3/group, scale bar 50 μ m. (E) Quantification of phosphorylated Smad3 (pSmad3) immunofluorescence, N=3/group. (F) Relative myocardial profibrotic gene expression after vehicle or AA treatment, N=6/group. (G) Myocardial p16 (green; white arrows) and vimentin (red) staining after vehicle or AA treatment. Sections were counterstained with DAPI (blue), N=3/group, scale bar 50 μ m. (H) Echocardiographic strain-rate (SR) from baseline to 4 weeks of treatment with vehicle or AA, N=8/group. (I) In vivo hemodynamic assessment (dP/dt_{max}, dP/dt_{min}) 4 weeks after vehicle or AA treatment, N=8/group. Plotted data is presented as mean \pm SEM. Statistical significance was evaluated by unpaired t-test or two-way ANOVA: *p<0.05, **p<0.01, and ***p<0.001.

Visceral adipose tissue



Age-related remodeling

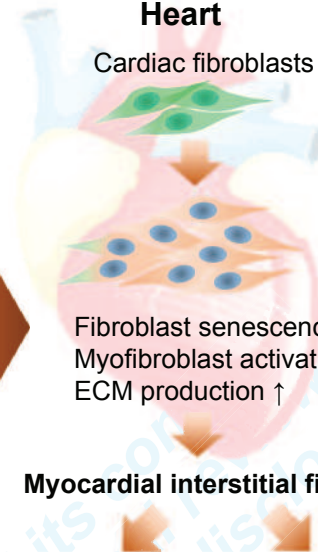
Fibrosis
Chronic inflammation ↑
Senescence

Secretion of profibrotic factors

Soluble OPN ↑
TGFβ1/2 ↑
Leptin ↑
⋮

Heart

Cardiac fibroblasts



Fibroblast senescence ↓
Myofibroblast activation ↑
ECM production ↑

Myocardial interstitial fibrosis

HFpEF

Cardiac aging

Figure 6. Schematic illustration: visceral adipose tissue mediates age-related cardiac fibrosis by impairing fibroblast senescence.

1 **Supplemental materials**

2

3 **Supplemental methods**

4

5 **Luminex analysis**

6 Plasma and explant adipose tissue conditioned medium samples were
7 analyzed using Luminex bead-based multiplex assay with a Bio-Plex 200
8 instrument (Bio-Rad) according to the manufacturer's instructions. TGF β 1
9 and 2 were analyzed by Magnetic Milliplex Map Kit (TGF β MAG-64K-03,
10 Millipore, Billerica, USA). Magnetic Luminex screening assay kit was used
11 for adipokines (Adiponectin: LXSAMSM-1, Leptin: LXSAMSM-19, IGF-1:
12 LXSAMSM-3, Bio-Techne, Abington, UK).

13

14 **Cardiomyocyte size**

15 Heart tissue sections were stained with wheat germ agglutinin (WGA; plasma
16 membrane staining, Alexa Fluor 488 conjugated) for cardiomyocyte size
17 (cross-sectional area). Fluorescent images were taken using a Zeiss Axioplan
18 M2 Imaging microscope. At least 200–300 cells per sample were traced and
19 quantified surface area. All data were measured with the ImageJ software
20 (NIH, <https://imagej.nih.gov/ij/>).

21

22 **Supplemental Figure 1.**

23 (A-D) Plasma levels of (A) TGF β 1/2, (B) Leptin, Adiponectin, Resistin, (C)
24 M-CSF, IGF-1, and (D) MIP1a/CCL3, Eotaxin/CCL11, IL-33, N=6-10/group.
25 (E) Schematic protocol of visceral adipose tissue *ex vivo* culture. (F-H)
26 Conditioned media levels of (F) OPN, TGF β 1/2, (G) Leptin, M-CSF, IGF-1,
27 and (H) MIP1a/CCL3, Eotaxin/CCL11, IL-33, N=2-4/group. Plotted data is

1 presented as individual values + mean. Statistical significance was
2 evaluated by unpaired t-test: *p<0.05, **p<0.01.

3
4 **Supplemental Figure 2.**

5 (A) Inguinal (IWAT) and (B) Perirenal white adipose tissue (PRWAT) weight
6 change after sham operation or EWATectomy, N=8/group. (C) Adiposity
7 index after sham operation or EWATectomy, N=8/group. (D) Intraperitoneal
8 insulin tolerance test (ITT) after sham operation or EWATectomy,
9 N=8/group. Plotted values are presented as mean ± SEM. Statistical
10 significance was evaluated by unpaired t-test or two-way ANOVA: *p<0.05,
11 **p<0.01, and ***p<0.001.

12
13 **Supplemental Figure 3.**

14 (A) Wheat-germ agglutinin (WGA) staining of the myocardium of young and
15 aged WT and OPN ^{-/-} mice, scale bar 50 μm. (B) Cardiomyocyte size in
16 young and aged WT and OPN ^{-/-} mice, N=3/group. (C-D) In vivo
17 hemodynamic assessment of dP/dt_{max} (C) and dP/dt_{min} (D) in young and aged
18 WT and OPN ^{-/-} mice, N=5-10/group. Plotted data is presented as mean ±
19 SEM. Statistical significance was evaluated by one-way ANOVA with
20 Bonferroni correction: **p<0.01, and ***p<0.001.

21
22 **Supplemental Figure 4.** (A) Cdkn1a, Tp53 and Serpine1 relative gene
23 expression in cardiac fibroblasts incubated with plasma of aged WT and
24 OPN ^{-/-} mice, N=4/group. (B) Myocardial Ki67 (green; white arrows) and
25 vimentin (red) co-staining of aged WT and OPN ^{-/-} mice. Bar graphs denote
26 quantification of Ki67-positive fibroblasts. Sections were counterstained
27 with DAPI (blue), N=3/group, scale bar 50 μm. Plotted values are presented

1 as mean \pm SEM. Statistical significance was evaluated by unpaired t-test:

2 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$.

3

4 **Supplemental Figure 5.**

5 (A) Body weight before and during vehicle or AA treatment in aged WT

6 mice, N=8/group. Plotted values are mean \pm SEM.

Disclaimer: The manuscript and its contents are
confidential, intended for journal review purposes
only, and not to be further disclosed.

1 Supplemental table 1: Used Taqman assays and antibodies

2 Taqman assays

Target	gene	Taqman assay ID
<i>Spp1</i>		Mm00436767_m1
<i>Col1a</i>		Mm00801666_g1
<i>Col3a</i>		Mm01254476_m1
<i>Ctgf</i>		Mm01192933_g1
<i>Lgals3</i>		Mm00802901_m1
<i>Lox</i>		Mm00495386_m1
<i>Mmp2</i>		Mm00439498_m1
<i>Mmp9</i>		Mm00442991_m1
<i>Tgfb1</i>		Mm01178820_m1
<i>Timp1</i>		Mm01341361_m1
<i>Cdkn2a</i>		Mm00494449_m1
<i>Acta2</i>		Mm00725412_s1
<i>Fn1</i>		Mm01256744_m1
<i>Cdkn1a</i>		Mm04205640_g1
<i>Tp53</i>		Mm01731290_g1
<i>Serpine1</i>		Mm00435858_m1
<i>Actb</i>		Mm02619580_g1

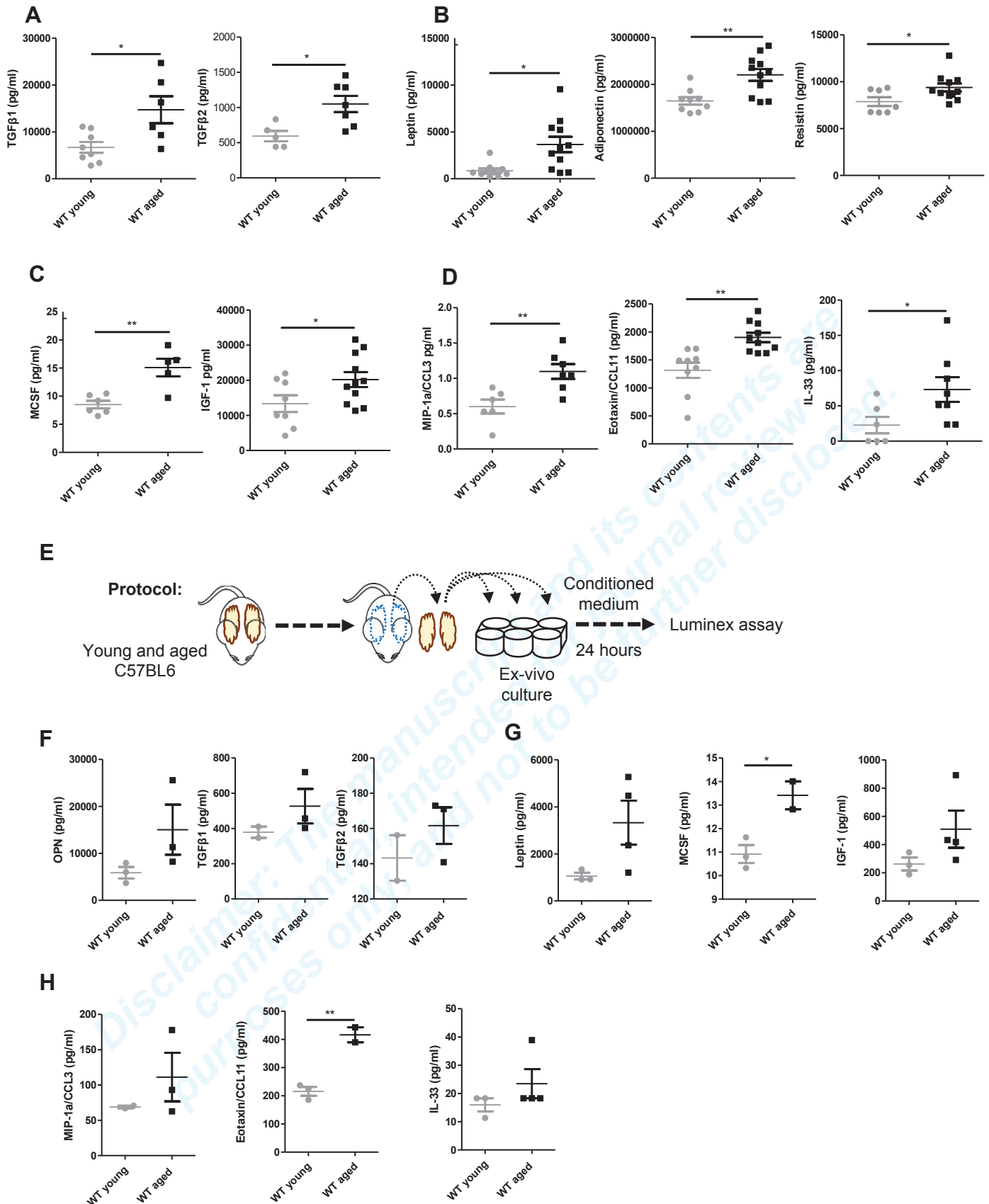
3

4 Antibodies

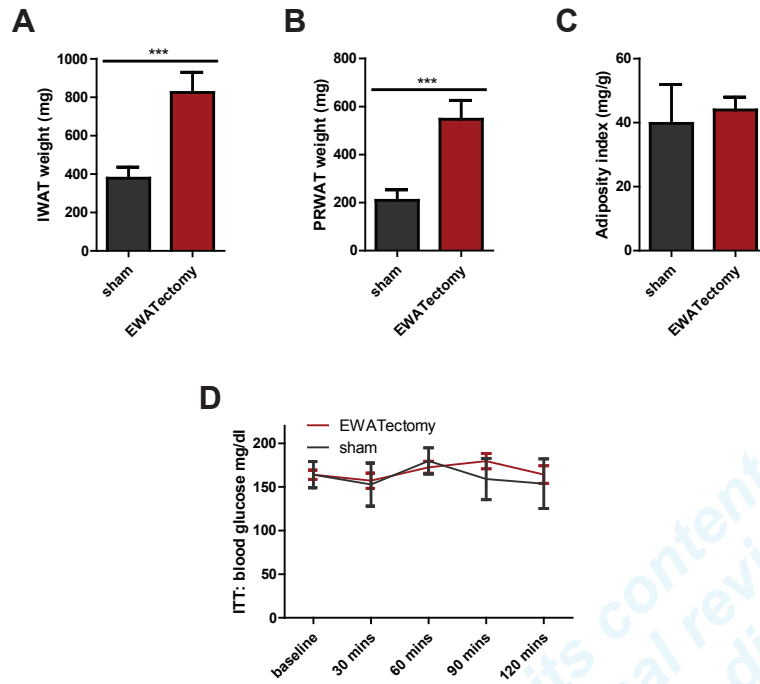
Target protein	Clone/product number	company
Osteopontin	ab8448	abcam, UK
F4/80	A3-1/MCA497GA	AbD Serotec, UK
β -actin	AC-15/ab49900	abcam, UK
α -actinin	EP2529Y/ab68167	abcam, UK
Vimentin	EPR3776/ab92547	abcam, UK
Phosphorylated smad3	EP823Y/ab52903	abcam, UK
Phalloidin	P5282	Sigma Aldrich, France
p16	2D9A12/ab54120	abcam, UK
Ki67	ab15580	abcam, UK

5

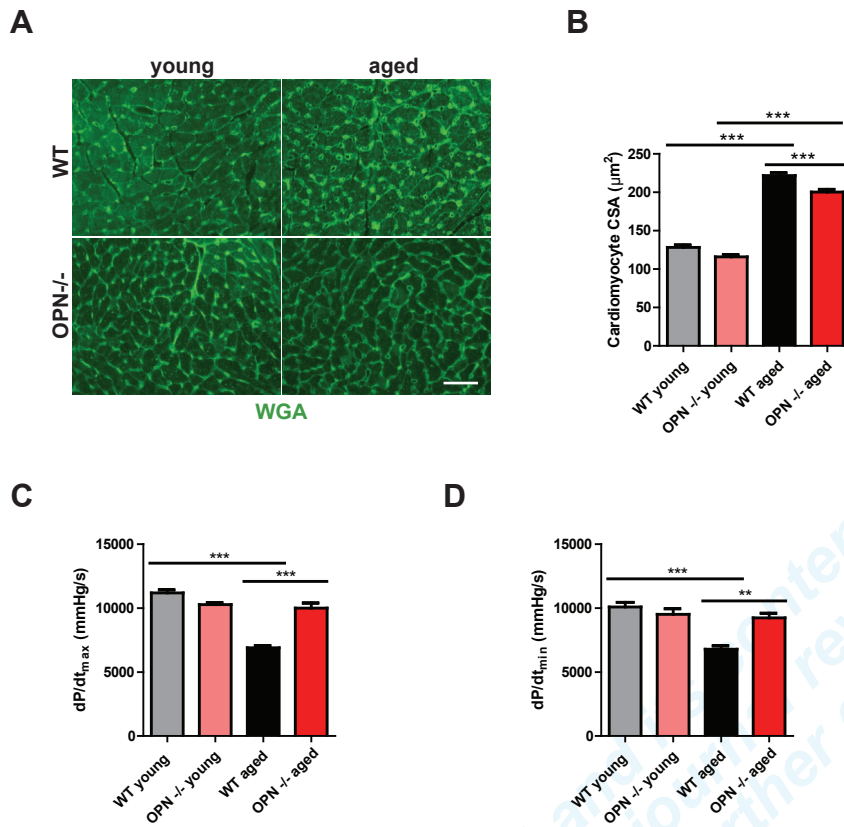
6



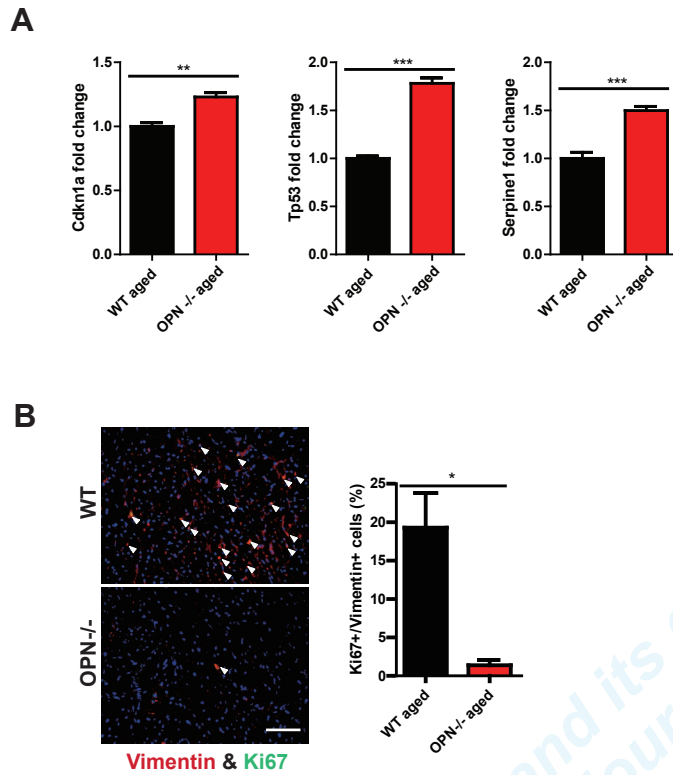
Supplemental Figure 1. (A-D) Plasma levels of (A) TGFβ1/2, (B) Leptin, Adiponectin, Resistin, (C) M-CSF, IGF-1, and (D) MIP1a/CCL3, Eotaxin/CCL11, IL-33, N=6-10/group. (E) Schematic protocol of visceral adipose tissue ex vivo culture. (F-H) Conditioned media levels of (F) OPN, TGFβ1/2, (G) Leptin, M-CSF, IGF-1, and (H) MIP1a/CCL3, Eotaxin/CCL11, IL-33, N=2-4/group. Plotted data is presented as individual values + mean. Statistical significance was evaluated by unpaired t-test: *p<0.05, **p<0.01.



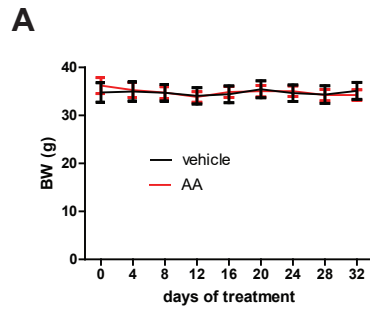
Supplemental Figure 2. (A) Inguinal (IWAT) and (B) Perirenal white adipose tissue (PRWAT) weight change after sham operation or EWATectomy, N=8/group. (C) Adiposity index after sham operation or EWATectomy, N=8/group. (D) Intraperitoneal insulin tolerance test (ITT) after sham operation or EWATectomy, N=8/group. Plotted values are presented as mean \pm SEM. Statistical significance was evaluated by unpaired t-test or two-way ANOVA: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$.



Supplemental Figure 3. (A) Wheat-germ agglutinin (WGA) staining of the myocardium of young and aged WT and OPN^{-/-} mice, scale bar 50 μm . (B) Cardiomyocyte size in young and aged WT and OPN^{-/-} mice, N=3/group. (C-D) In vivo hemodynamic assessment of dP/dt_{max} (C) and dP/dt_{min} (D) in young and aged WT and OPN^{-/-} mice, N=5-10/group. Plotted data is presented as mean \pm SEM. Statistical significance was evaluated by one-way ANOVA with Bonferroni correction: ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.



Supplemental Figure 4. (A) Cdkn1a, Tp53 and Serpine1 relative gene expression in cardiac fibroblasts incubated with plasma of aged WT and OPN^{-/-} mice, N=4/group. (B) Myocardial Ki67 (green; white arrows) and vimentin (red) co-staining of aged WT and OPN^{-/-} mice. Bar graphs denote quantification of Ki67-positive fibroblasts. Sections were counterstained with DAPI (blue), N=3/group, scale bar 50 μ m. Plotted values are presented as mean \pm SEM. Statistical significance was evaluated by unpaired t-test: *p<0.05, **p<0.01, and ***p<0.001.



Supplemental Figure 5. (A) Body weight before and during vehicle or AA treatment in aged WT mice, N=8/group. Plotted values are mean \pm SEM.

Disclaimer: The manuscript and its contents are confidential, intended for journal review purposes only, and not to be further disclosed.



Circulation

Manuscript Submission and Peer Review System

[Tracking System Home](#)
[Author Help](#)
[Reviewer Help](#)
[Tips](#)
[Change Journal](#)
[Logout](#)

[Print Email](#)

Date: 10-24-2017 14:59:07

Last Sent: 10-24-2017 14:59:07

Triggered By: Redacted

BCC: Redacted

Subject: CIRCULATIONAHA/2017/031358 Decision Letter

Message:

October 23, 2017

Dr. Geneviève Derumeaux, MD, PhD
INSERM U955
Université Paris-Est Creteil (UPEC)
France

RE: CIRCULATIONAHA/2017/031358

Visceral adipose tissue drives age-related myocardial fibrosis and dysfunction through osteopontin production

Dear Dr. Derumeaux,

We appreciate the opportunity to consider your manuscript for publication in **Circulation**.

Your manuscript has been evaluated by the editors and by external peer reviewers. Although your manuscript is not acceptable for publication in **Circulation** in its present form, we would be willing to consider a substantially revised manuscript if you can adequately address the comments of the reviewers and editors. We make no commitment to publish your revised manuscript, as the issues raised by the reviewers and editors are substantial. Overall, approximately 6% of all submitted manuscripts are ultimately published. Among papers invited for major revision, the final acceptance rate is approximately 50%.

With your response to comments, please provide each comment verbatim in bold followed by your response. If substantive changes have been made to the manuscript, please provide a clear description of what you did and where. If you insert important sentences, paragraphs or sections in response to the comments, please include them in this response. Please also be clear about any deletions. Additionally, a marked-up version of the revision with the changes highlighted or tracked should be uploaded as a supplemental file. Please include the line numbers on both the tracked changes document and on the "clean" version.

Should you choose to resubmit, please comply with our Instructions to Authors. In particular, the following are required upon submission of your revision.

1. The manuscript text should not exceed 5,000 words, and the number of figures should not exceed 8. If your manuscript does not comply, it will be returned to you for further revision prior to review.
2. If you add any new authors to your revised submission, please provide a statement from each original author (or one statement signed by all authors) confirming and authorizing the addition of the new author(s). If an author is removed from the paper, we require a signed agreement from that author authorizing the removal. Please provide these statements as supplemental files with your revision. Review of your manuscript will be delayed until we receive the signed agreement(s).
3. As a benefit to our readers, please include a Clinical Perspective on your manuscript, which should provide a concise summary of the key observations and their clinical relevance, written for the clinical cardiology audience. It should address the following 2 questions, in bulleted format: 1) What is new? (no more than 100 words) and 2) What are the clinical implications? (no more than 100 words). This Clinical Perspective should be included in the main manuscript, following the abstract.
4. Please ensure that your manuscript adheres to the AHA Journals' implementation of the Transparency and Openness Promotion (TOP) Guidelines (available online at <http://www.ahajournals.org/content/TOP-guidelines>).

a. In accordance with this policy, you must, at the beginning of the Methods section, indicate whether you will or will not make the data, methods used in the analysis, and materials used to conduct the research available to any researcher for purposes of reproducing the results or replicating the procedure. Examples are provided below:

"The data, analytic methods, and study materials will be/have been made available to other researchers for purposes of reproducing the results or replicating the procedure."

"The data, analytic methods, and study materials will not be made available to other researchers for purposes of reproducing the results or replicating the procedure." A reason for the lack of availability is welcome, but not required.

b. If you agree to make materials available, you must specify where that material will be available, and you will be responsible for maintaining availability. A citation, in the following format, must also be provided as a numbered reference: Creator (PublicationYear). Title. Publisher. Identifier.

5. Within your manuscript's Methods section, please state that IRB approval was obtained, according to the guidelines noted in our Instructions to Authors.

â€¢ Animal studies: Indicate that the procedures followed were in accordance with institutional guidelines.

â€¢ Human studies: Indicate that the study was approved by an institutional review committee and that the subjects gave informed consent.

To submit your revision, please use the following link: [Link Not Available](#)

Please do not submit your manuscript as a new submission. If you cannot locate the revision link, please contact the editorial office at circ@circulationjournal.org.

Our current guidelines allow 90 days for completion of your revision. If you cannot meet this deadline, please contact the editorial office. All revisions not received within 90 days will be handled as de novo submissions.

We look forward to receiving your revision. Thank you very much for allowing us to consider your work.

Sincerely yours,

Sergio Lavadero, PhD
Associate Editor
Circulation

Joseph A. Hill, MD, PhD
Editor-in-Chief
Circulation

Reviewer #1:

This interesting article by Sawaki and colleagues addresses the important issue of myocardial fibrosis in the context of aging, and concludes that inhibition of the osteopontin system by visceral adipose tissue removal or agelastatin A prevents and reverses cardiac senescence. A few issues need to be addressed, detailed below.

Table 1. Echocardiographic assessment indicates that aged OPN^{-/-} mice have eccentric cardiac hypertrophy with elevated end diastolic dimensions. In addition aortic pressure seems significantly elevated compared to WT mice. Was LV mass assessed in these animals? These findings (of eccentric hypertrophy) seems contrary to results in Figure 3 which show lower heart weight to tibial length in aged OPN^{-/-} mice compared to WT aged mice.

Figure 1. Although the differential expression of OPN is greater in EWAT, I would assume that the absolute difference in expression is greater in organs with greater mass such as lung liver etc suggesting that the main source of OPN may not be EWAT.

Figure 2. Assessment of fibrosis should be more detailed and include perivascular and interstitial fibrosis, assessment of collagen types I and III protein levels. Echocardiography shows improved systolic function - please show diastolic function such as LV end diastolic pressure or diastolic pressure volume relationship since diastolic dysfunction is a major pathologic and clinical component of aging.

Figure 4. In addition to beta-gal, authors should assess for multiple markers of aging and anti-senescence markers also. Do the authors have data on whether osteopontin is the senescence factor present in plasma or are there other factors? Experiments using filtering could suggest the molecular weight range of the putative senescence factors. The authors should perform more detailed assessment of collagen production by fibroblasts in response to exposure to aged plasma to derive firm conclusions. Have the authors performed experiments using methods of inhibiting osteopontin action in fibroblasts? What are the signaling pathways involved? Is osteopontin acting via TGF beta pathway, if so experiments with inhibition of TGF beta pathway would be useful to establish the connection between osteopontin and myocardial senescence.

Since the authors show more effect on systolic parameters, do the authors have data on the effect of osteopontin on cardiomyocyte senescence? Reversal of systolic function by agelastatin would indicate effects on cardiomyocyte, either directly or via paracrine action of non-cardiomyocyte cells.

Were dose ranging studies performed with agelastatin? Since agelastatin is a natural product, it may have actions beyond osteopontin inhibition.

Reviewer #2:

This well-written manuscript describes an association between visceral adipose tissue (VAT), aging and heart fibrosis depending on increased levels of circulating osteopontin (OPN).

Even when the relationship of OPN with both obesity and fibrosis have been previously described, this is - to my knowledge - the first paper that links these previous findings with the aging process proposing an intriguing mechanism of cross-talk between fat-tissue and the heart with several potential therapeutic targets.

Query 1. My primary concern regarding the results of the paper is the potential role of TGF beta in the effects observed by the authors. In fact, the relationship between OPN and TGF beta is reciprocal: TGF beta 1 may induce OPN expression (ref. J Biol Chem 1988 Sep 25; 263, 13916-13921), and conversely, OPN can increase TGF beta-1 expression in specific cell types (ref. Oncogene. 2015 Sep 10; 34(37): 4821-4833). Since TGF beta 1 is a well-known player in cardiac fibrosis, obesity, and aging, it seems necessary to me to rule out that the results are attributable to changes in OPN levels -- elicited by EWATectomy or pharmacological modulation of OPN -- and do not depend on the parallel changes in TGF beta 1. The results from the OPN -/- mice experiments further emphasize the importance of TGF beta1 signaling in the model.

Query 2. A minor question regarding the human samples. Did the authors stain atrial samples from young subjects?. It would be interesting to check whether the changes in OPN expression in fat observed in mice are similar to those found in epicardial fat in humans.

Reviewer #3:

Figure 4E on inverse relationship between p16 and Acta2 levels is problematic. Do you mean in WT or OPN-/-? According to figure 4E, it seems a linear correlation is evaluated by a crude analysis pooling both groups together. This is a classic pitfall of confounding. By looking at the figure, the inverse relationship in WT is in doubt. Stratified analysis is needed.

[Print Email](#)

Close Window



[Journal Home](#) | [Instructions for Authors](#) | [Editorial Board](#) | [AHA Journals Home](#) | [Feedback](#)
[Clinical Cardiology Council](#) | [About AHA](#) | [AHA Ethics Policy](#) | [AHA Privacy Policy](#) | [Donate to AHA](#)
[Terms of Service](#) | [EJPress Software by eJournalPress](#) | [Licensed under Patent #US 7,620,555B1](#)
©2017 American Heart Association, Inc. All rights reserved. Unauthorized use prohibited.

X. Conclusion

L'obésité est un problème majeur de santé publique en raison de l'augmentation de sa prévalence et de son implication dans de nombreuses pathologies potentiellement graves comme les pathologies cardiovasculaires. Parmi celles-ci, l'athérosclérose est celle dont le lien mécanistique avec l'obésité est le plus connu, et dont les complications sont à l'origine d'une morbi-mortalité importante. L'insuffisance cardiaque est également une pathologie cardiovasculaire à forte morbi-mortalité et elle représente une part importante en matière de dépense de santé. Le lien entre troubles métaboliques et insuffisance cardiaque est incertain en ce qui concerne l'obésité alors qu'il semble plus évident pour le diabète de type 2. Cependant, l'obésité est un facteur de risque majeur de développement de l'insulino-résistance et *in-fine* d'un diabète de type 2. Le tissu adipeux, notamment viscéral, joue un rôle fondamental dans le développement des troubles métaboliques au cours de l'obésité. Il semble également jouer un rôle important dans le développement de pathologies cardiovasculaires comme la fibrose myocardique atriale et la fibrillation atriale.

Cependant, nous avons besoin de modèles précliniques fiables afin de confirmer l'existence de la cardiopathie métabolique et explorer les mécanismes physiopathologiques sous-jacents, et ainsi identifier des potentielles cibles thérapeutiques.

Mon travail de thèse a permis tout d'abord de confirmer l'existence de la cardiopathie métabolique au cours de l'obésité et de mettre en évidence une explication physiopathologique à son développement à partir d'un modèle murin d'obésité induite par régime riche en graisse. Les modifications cardiaques induites par l'obésité associaient remodelage VG et fibrose myocardique interstitielle avec dysfonction systolique précoce. Il est important de préciser que ces modifications cardiaques étaient superposables à celle observées au cours du vieillissement physiologique des souris sauvages, mais survenaient à un âge plus jeune faisant ainsi évoquer un processus de vieillissement cardiaque accéléré lié à l'obésité et à ses conséquences

métaboliques. D'autre part, l'obésité était également à l'origine d'une altération du tissu adipeux, notamment viscéral, associant remodelage et modification de son secrétome. En effet, au cours de ces deux expériences sur les souris obèses, d'une part sur le myocarde et d'autre part sur le tissu adipeux, nous avons retrouvé comme dénominateur commun un taux plasmatique de substances pro-fibrotiques (leptine, TGF β) anormalement élevé. De plus, au cours du vieillissement physiologique, nous avons également retrouvé une augmentation de l'ostéopontine, un marqueur de la sénescence mais également une protéine pro-fibrosante. Or, après analyse par PCR et western-blot, il s'avérait que la principale source de production de ces substances était le tissu adipeux, notamment viscéral. Ces données étaient confirmées par la réduction de la fibrose myocardique et l'amélioration de la fonction cardiaque en cas de suppression de leur source de production (ablation de la graisse viscérale) ou en cas d'inhibition pharmacologique (Agelastatine A) ou génétique (délétion du gène de l'ostéopontine).

On peut donc formuler l'hypothèse que la physiopathologie de la cardiopathie métabolique est liée à un probable processus de sénescence prématurée dont le principal acteur est le tissu adipeux viscéral. D'un point de vue clinique, la cardiopathie métabolique s'apparente à de l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée qui se caractérise également par un remodelage du VG et de la fibrose myocardique. Cette pathologie est de plus en plus fréquente et pose de réels problèmes de prise en charge thérapeutique car seuls les diurétiques sont efficaces mais uniquement sur les symptômes. La piste du tissu adipeux viscéral et de son implication dans un processus de sénescence doit donc être confirmée dans des cohortes de patients obèses pour que les potentielles cibles thérapeutiques identifiées chez l'animal soient un jour transposables à l'homme.

XI. Bibliographie

1. Neeland IJ, Turer AT, Ayers CR, Berry JD, Rohatgi A, Das SR, et al. Body fat distribution and incident cardiovascular disease in obese adults. *J Am Coll Cardiol.* May 19;65(19):2150-1.
2. Neeland IJ, Ayers CR, Rohatgi AK, Turer AT, Berry JD, Das SR, et al. Associations of visceral and abdominal subcutaneous adipose tissue with markers of cardiac and metabolic risk in obese adults. *Obesity (Silver Spring).* Sep;21(9):E439-47.
3. Dudele A, Fischer CW, Elfving B, Wegener G, Wang T, Lund S. Chronic exposure to low doses of lipopolysaccharide and high-fat feeding increases body mass without affecting glucose tolerance in female rats. *Physiol Rep.* Nov;3(11).
4. Ng M, Fleming T, Robinson M, Thomson B, Graetz N, Margono C, et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet.* Aug 30;384(9945):766-81.
5. Flegal KM, Kruszon-Moran D, Carroll MD, Fryar CD, Ogden CL. Trends in Obesity Among Adults in the United States, 2005 to 2014. *JAMA.* Jun 07;315(21):2284-91.
6. Yumuk V, Tsigos C, Fried M, Schindler K, Busetto L, Micic D, et al. European Guidelines for Obesity Management in Adults. *Obes Facts.* 8(6):402-24.
7. Lau WB, Ohashi K, Wang Y, Ogawa H, Murohara T, Ma XL, et al. Role of Adipokines in Cardiovascular Disease. *Circ J.* Jun 23;81(7):920-8.
8. Kenchaiah S, Evans JC, Levy D, Wilson PW, Benjamin EJ, Larson MG, et al. Obesity and the risk of heart failure. *N Engl J Med.* 2002 Aug 01;347(5):305-13.
9. Zheng Y, Manson JE, Yuan C, Liang MH, Grodstein F, Stampfer MJ, et al. Associations of Weight Gain From Early to Middle Adulthood With Major Health Outcomes Later in Life. *JAMA.* Jul 18;318(3):255-69.
10. Lavie CJ, Milani RV, Ventura HO. Obesity and cardiovascular disease: risk factor, paradox, and impact of weight loss. *J Am Coll Cardiol.* 2009 May 26;53(21):1925-32.
11. Alpert MA. Obesity cardiomyopathy: pathophysiology and evolution of the clinical syndrome. *Am J Med Sci.* 2001 Apr;321(4):225-36.
12. Powell BD, Redfield MM, Bybee KA, Freeman WK, Rihal CS. Association of obesity with left ventricular remodeling and diastolic dysfunction in patients without coronary artery disease. *Am J Cardiol.* 2006 Jul 01;98(1):116-20.
13. Kannel WB, McGee DL. Diabetes and cardiovascular disease. The Framingham study. *JAMA.* 1979 May 11;241(19):2035-8.
14. Palmieri V, Bella JN, Arnett DK, Liu JE, Oberman A, Schuck MY, et al. Effect of type 2 diabetes mellitus on left ventricular geometry and systolic function in hypertensive subjects: Hypertension Genetic Epidemiology Network (HyperGEN) study. *Circulation.* 2001 Jan 02;103(1):102-7.
15. Selvin E, Lazo M, Chen Y, Shen L, Rubin J, McEvoy JW, et al. Diabetes mellitus, prediabetes, and incidence of subclinical myocardial damage. *Circulation.* Oct 14;130(16):1374-82.
16. Nakai H, Takeuchi M, Nishikage T, Lang RM, Otsuji Y. Subclinical left ventricular dysfunction in asymptomatic diabetic patients assessed by two-dimensional speckle tracking echocardiography: correlation with diabetic duration. *Eur J Echocardiogr.* 2009 Dec;10(8):926-32.
17. Ernande L, Bergerot C, Girerd N, Thibault H, Davidsen ES, Gautier Pignon-Blanc P, et al. Longitudinal myocardial strain alteration is associated with left ventricular remodeling in asymptomatic patients with type 2 diabetes mellitus. *J Am Soc Echocardiogr.* May;27(5):479-88.

18. Ernande L, Thibault H, Bergerot C, Moulin P, Wen H, Derumeaux G, et al. Systolic myocardial dysfunction in patients with type 2 diabetes mellitus: identification at MR imaging with cine displacement encoding with stimulated echoes. *Radiology*. Nov;265(2):402-9.
19. Roos CJ, Scholte AJ, Kharagjitsingh AV, Bax JJ, Delgado V. Changes in multidirectional LV strain in asymptomatic patients with type 2 diabetes mellitus: a 2-year follow-up study. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*. Jan;15(1):41-7.
20. Liu JH, Chen Y, Yuen M, Zhen Z, Chan CW, Lam KS, et al. Incremental prognostic value of global longitudinal strain in patients with type 2 diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol*. Feb 03;15:22.
21. Kishi S, Gidding SS, Reis JP, Colangelo LA, Venkatesh BA, Armstrong AC, et al. Association of Insulin Resistance and Glycemic Metabolic Abnormalities With LV Structure and Function in Middle Age: The CARDIA Study. *JACC Cardiovasc Imaging*. Feb;10(2):105-14.
22. Kivimaki M, Kuosma E, Ferrie JE, Luukkonen R, Nyberg ST, Alfredsson L, et al. Overweight, obesity, and risk of cardiometabolic multimorbidity: pooled analysis of individual-level data for 120 813 adults from 16 cohort studies from the USA and Europe. *Lancet Public Health*. Jun;2(6):e277-e85.
23. Caleyachetty R, Thomas GN, Toulis KA, Mohammed N, Gokhale KM, Balachandran K, et al. Metabolically Healthy Obese and Incident Cardiovascular Disease Events Among 3.5 Million Men and Women. *J Am Coll Cardiol*. Sep 19;70(12):1429-37.
24. Ernande L, Audureau E, Jellis CL, Bergerot C, Henegar C, Sawaki D, et al. Clinical Implications of Echocardiographic Phenotypes of Patients With Diabetes Mellitus. *J Am Coll Cardiol*. Oct 03;70(14):1704-16.
25. Greulich S, Maxhera B, Vandenplas G, de Wiza DH, Smiris K, Mueller H, et al. Secretory products from epicardial adipose tissue of patients with type 2 diabetes mellitus induce cardiomyocyte dysfunction. *Circulation*. Nov 06;126(19):2324-34.
26. Despres JP. Intra-abdominal obesity: an untreated risk factor for Type 2 diabetes and cardiovascular disease. *J Endocrinol Invest*. 2006;29(3 Suppl):77-82.
27. Virtue S, Vidal-Puig A. Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome--an allostatic perspective. *Biochim Biophys Acta*. Mar;1801(3):338-49.
28. Mazurek T, Zhang L, Zalewski A, Mannion JD, Diehl JT, Arafat H, et al. Human epicardial adipose tissue is a source of inflammatory mediators. *Circulation*. 2003 Nov 18;108(20):2460-6.
29. Keophiphath M, Achard V, Henegar C, Rouault C, Clement K, Lacasa D. Macrophage-secreted factors promote a profibrotic phenotype in human preadipocytes. *Mol Endocrinol*. 2009 Jan;23(1):11-24.
30. Ouwens DM, Sell H, Greulich S, Eckel J. The role of epicardial and perivascular adipose tissue in the pathophysiology of cardiovascular disease. *J Cell Mol Med*. Sep;14(9):2223-34.
31. Venteclef N, Guglielmi V, Balse E, Gaborit B, Cotillard A, Atassi F, et al. Human epicardial adipose tissue induces fibrosis of the atrial myocardium through the secretion of adipo-fibrokinases. *Eur Heart J*. Apr 01;36(13):795-805a.
32. Haemers P, Hamdi H, Guedj K, Suffee N, Farahmand P, Popovic N, et al. Atrial fibrillation is associated with the fibrotic remodelling of adipose tissue in the subepicardium of human and sheep atria. *Eur Heart J*. Jan 01;38(1):53-61.
33. Shah RV, Anderson A, Ding J, Budoff M, Rider O, Petersen SE, et al. Pericardial, But Not Hepatic, Fat by CT Is Associated With CV Outcomes and Structure: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *JACC Cardiovasc Imaging*. Sep;10(9):1016-27.
34. Mahajan R, Lau DH, Brooks AG, Shipp NJ, Manavis J, Wood JP, et al. Electrophysiological, Electroanatomical, and Structural Remodeling of the Atria as Consequences of Sustained Obesity. *J Am Coll Cardiol*. Jul 07;66(1):1-11.

35. Gabriely I, Ma XH, Yang XM, Atzmon G, Rajala MW, Berg AH, et al. Removal of visceral fat prevents insulin resistance and glucose intolerance of aging: an adipokine-mediated process? *Diabetes*. 2002 Oct;51(10):2951-8.
36. Klein S, Fontana L, Young VL, Coggan AR, Kilo C, Patterson BW, et al. Absence of an effect of liposuction on insulin action and risk factors for coronary heart disease. *N Engl J Med*. 2004 Jun 17;350(25):2549-57.
37. Thorne A, Lonnqvist F, Apelman J, Hellers G, Arner P. A pilot study of long-term effects of a novel obesity treatment: omentectomy in connection with adjustable gastric banding. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2002 Feb;26(2):193-9.
38. Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*. 1998 Oct 22;395(6704):763-70.
39. Winzell MS, Ahren B. The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Diabetes*. 2004 Dec;53 Suppl 3:S215-9.
40. Calligaris SD, Lecanda M, Solis F, Ezquer M, Gutierrez J, Brandan E, et al. Mice long-term high-fat diet feeding recapitulates human cardiovascular alterations: an animal model to study the early phases of diabetic cardiomyopathy. *PLoS One*. 8(4):e60931.
41. Carbone S, Mauro AG, Mezzaroma E, Kraskauskas D, Marchetti C, Buzzetti R, et al. A high-sugar and high-fat diet impairs cardiac systolic and diastolic function in mice. *Int J Cardiol*. Nov 01;198:66-9.
42. Abdesselam I, Pepino P, Troalen T, Macia M, Ancel P, Masi B, et al. Time course of cardiometabolic alterations in a high fat high sucrose diet mice model and improvement after GLP-1 analog treatment using multimodal cardiovascular magnetic resonance. *J Cardiovasc Magn Reson*. Nov 06;17:95.
43. Ternacle J, Wan F, Sawaki D, Surenaud M, Pini M, Mercedes R, et al. Short-term high-fat diet compromises myocardial function: a radial strain rate imaging study. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*. Nov 01;18(11):1283-91.
44. Thibault H, Gomez L, Bergerot C, Augeul L, Scherrer-Crosbie M, Ovize M, et al. Strain-rate imaging predicts the attenuation of left ventricular remodeling induced by ischemic postconditioning after myocardial infarction in mice. *Circ Cardiovasc Imaging*. Sep;4(5):550-7.
45. Derumeaux G, Mulder P, Richard V, Chagraoui A, Nafeh C, Bauer F, et al. Tissue Doppler imaging differentiates physiological from pathological pressure-overload left ventricular hypertrophy in rats. *Circulation*. 2002 Apr 02;105(13):1602-8.
46. Derumeaux G, Ichinose F, Raheer MJ, Morgan JG, Coman T, Lee C, et al. Myocardial alterations in senescent mice and effect of exercise training: a strain rate imaging study. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2008 Nov;1(3):227-34.
47. Raheer MJ, Thibault HB, Buys ES, Kuruppu D, Shimizu N, Brownell AL, et al. A short duration of high-fat diet induces insulin resistance and predisposes to adverse left ventricular remodeling after pressure overload. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008 Dec;295(6):H2495-502.
48. Tchkonja T, Morbeck DE, Von Zglinicki T, Van Deursen J, Lustgarten J, Scrbale H, et al. Fat tissue, aging, and cellular senescence. *Aging Cell*. Oct;9(5):667-84.
49. Stritzke J, Markus MR, Duderstadt S, Lieb W, Luchner A, Doring A, et al. The aging process of the heart: obesity is the main risk factor for left atrial enlargement during aging the MONICA/KORA (monitoring of trends and determinations in cardiovascular disease/cooperative research in the region of Augsburg) study. *J Am Coll Cardiol*. 2009 Nov 17;54(21):1982-9.
50. Schafer MJ, White TA, Evans G, Tonne JM, Verzosa GC, Stout MB, et al. Exercise Prevents Diet-Induced Cellular Senescence in Adipose Tissue. *Diabetes*. Jun;65(6):1606-15.

51. Bayod S, Del Valle J, Lalanza JF, Sanchez-Roige S, de Luxan-Delgado B, Coto-Montes A, et al. Long-term physical exercise induces changes in sirtuin 1 pathway and oxidative parameters in adult rat tissues. *Exp Gerontol.* Dec;47(12):925-35.
52. Oldberg A, Franzen A, Heinegard D. Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell-binding sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986 Dec;83(23):8819-23.
53. Patarca R, Freeman GJ, Singh RP, Wei FY, Durfee T, Blattner F, et al. Structural and functional studies of the early T lymphocyte activation 1 (Eta-1) gene. Definition of a novel T cell-dependent response associated with genetic resistance to bacterial infection. *J Exp Med.* 1989 Jul 01;170(1):145-61.
54. Denhardt DT, Lopez CA, Rollo EE, Hwang SM, An XR, Walther SE. Osteopontin-induced modifications of cellular functions. *Ann N Y Acad Sci.* 1995 Apr 21;760:127-42.
55. Fisher LW, Fedarko NS. Six genes expressed in bones and teeth encode the current members of the SIBLING family of proteins. *Connect Tissue Res.* 2003;44 Suppl 1:33-40.
56. Denhardt DT, Giachelli CM, Rittling SR. Role of osteopontin in cellular signaling and toxicant injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2001;41:723-49.
57. Sodek J, Ganss B, McKee MD. Osteopontin. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2000;11(3):279-303.
58. Takahashi F, Takahashi K, Maeda K, Tominaga S, Fukuchi Y. Osteopontin is induced by nitric oxide in RAW 264.7 cells. *IUBMB Life.* 2000 Mar;49(3):217-21.
59. Ashkar S, Weber GF, Panoutsakopoulou V, Sanchirico ME, Jansson M, Zawaideh S, et al. Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity. *Science.* 2000 Feb 04;287(5454):860-4.
60. Yu XQ, Fan JM, Nikolic-Paterson DJ, Yang N, Mu W, Pichler R, et al. IL-1 up-regulates osteopontin expression in experimental crescentic glomerulonephritis in the rat. *Am J Pathol.* 1999 Mar;154(3):833-41.
61. Denhardt DT, Noda M. Osteopontin expression and function: role in bone remodeling. *J Cell Biochem Suppl.* 1998;30-31:92-102.
62. Xuan JW, Hota C, Chambers AF. Recombinant GST-human osteopontin fusion protein is functional in RGD-dependent cell adhesion. *J Cell Biochem.* 1994 Feb;54(2):247-55.
63. Wai PY, Kuo PC. The role of Osteopontin in tumor metastasis. *J Surg Res.* 2004 Oct;121(2):228-41.
64. Christensen B, Kazanekki CC, Petersen TE, Rittling SR, Denhardt DT, Sorensen ES. Cell type-specific post-translational modifications of mouse osteopontin are associated with different adhesive properties. *J Biol Chem.* 2007 Jul 06;282(27):19463-72.
65. Beninati S, Senger DR, Cordella-Miele E, Mukherjee AB, Chackalaparampil I, Shanmugam V, et al. Osteopontin: its transglutaminase-catalyzed posttranslational modifications and cross-linking to fibronectin. *J Biochem.* 1994 Apr;115(4):675-82.
66. Kaartinen MT, Pirhonen A, Linnala-Kankkunen A, Maenpaa PH. Cross-linking of osteopontin by tissue transglutaminase increases its collagen binding properties. *J Biol Chem.* 1999 Jan 15;274(3):1729-35.
67. Prince CW, Dickie D, Krumdieck CL. Osteopontin, a substrate for transglutaminase and factor XIII activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991 Jun 28;177(3):1205-10.
68. Agnihotri R, Crawford HC, Haro H, Matrisian LM, Havrda MC, Liaw L. Osteopontin, a novel substrate for matrix metalloproteinase-3 (stromelysin-1) and matrix metalloproteinase-7 (matrilysin). *J Biol Chem.* 2001 Jul 27;276(30):28261-7.
69. Weber GF, Ashkar S, Glimcher MJ, Cantor H. Receptor-ligand interaction between CD44 and osteopontin (Eta-1). *Science.* 1996 Jan 26;271(5248):509-12.

70. O'Regan AW, Hayden JM, Berman JS. Osteopontin augments CD3-mediated interferon-gamma and CD40 ligand expression by T cells, which results in IL-12 production from peripheral blood mononuclear cells. *J Leukoc Biol.* 2000 Oct;68(4):495-502.
71. Morimoto I, Sasaki Y, Ishida S, Imai K, Tokino T. Identification of the osteopontin gene as a direct target of TP53. *Genes Chromosomes Cancer.* 2002 Mar;33(3):270-8.
72. Pazolli E, Luo X, Brehm S, Carbery K, Chung JJ, Prior JL, et al. Senescent stromal-derived osteopontin promotes preneoplastic cell growth. *Cancer Res.* 2009 Feb 01;69(3):1230-9.
73. Paliwal P, Pishesha N, Wijaya D, Conboy IM. Age dependent increase in the levels of osteopontin inhibits skeletal muscle regeneration. *Aging (Albany NY).* Aug;4(8):553-66.
74. Saker M, Lipskaia L, Marcos E, Abid S, Parpaleix A, Houssaini A, et al. Osteopontin, a Key Mediator Expressed by Senescent Pulmonary Vascular Cells in Pulmonary Hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* Sep;36(9):1879-90.
75. Koh A, da Silva AP, Bansal AK, Bansal M, Sun C, Lee H, et al. Role of osteopontin in neutrophil function. *Immunology.* 2007 Dec;122(4):466-75.
76. Subramanian V, Krishnamurthy P, Singh K, Singh M. Lack of osteopontin improves cardiac function in streptozotocin-induced diabetic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007 Jan;292(1):H673-83.
77. Krum H, Elsik M, Schneider HG, Ptaszynska A, Black M, Carson PE, et al. Relation of peripheral collagen markers to death and hospitalization in patients with heart failure and preserved ejection fraction: results of the I-PRESERVE collagen substudy. *Circ Heart Fail.* Sep;4(5):561-8.
78. Abdalrhim AD, Marroush TS, Austin EE, Gersh BJ, Solak N, Rizvi SA, et al. Plasma Osteopontin Levels and Adverse Cardiovascular Outcomes in the PEACE Trial. *PLoS One.*11(6):e0156965.
79. Kramer F, Sandner P, Klein M, Krahn T. Plasma concentrations of matrix metalloproteinase-2, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and osteopontin reflect severity of heart failure in DOCA-salt hypertensive rat. *Biomarkers.* 2008 May;13(3):270-81.
80. Bapat SP, Myoung Suh J, Fang S, Liu S, Zhang Y, Cheng A, et al. Depletion of fat-resident Treg cells prevents age-associated insulin resistance. *Nature.* Dec 03;528(7580):137-41.
81. Zhu F, Li Y, Zhang J, Piao C, Liu T, Li HH, et al. Senescent cardiac fibroblast is critical for cardiac fibrosis after myocardial infarction. *PLoS One.*8(9):e74535.

TERNACLE Julien

Cardiopathie métabolique : un modèle de sénescence prématurée ?

Diplôme de Doctorat. Université Paris-Est Créteil Val de Marne. Soutenu le 14 décembre 2017

RESUME

Contexte : Le lien entre insuffisance cardiaque et obésité n'est pas clairement établi, et les mécanismes mis en jeu le sont encore moins.

Objectif : Confirmer l'existence de la cardiopathie métabolique et explorer ses mécanismes physiopathologiques par mise au point de modèles de souris associés à des techniques de modulations.

Méthode : Etablissement d'un modèle de souris sauvages (WT, C57/BL6J, mâle) soumises à un régime riche en graisse (60% de graisse, HFD), associé à des techniques de modulation comme l'exercice (natation) et l'ablation de la graisse viscérale. Utilisation de souris déficientes pour le gène de l'ostéopontine (voie de la sénescence). Analyse des effets du régime HFD sur le tissu adipeux et ses fonctions métaboliques, et sur le myocarde et sa contractilité. Analyse en parallèle des effets du vieillissement physiologique chez les souris WT et déficientes sur ces mêmes paramètres. Recherche d'un lien entre dysfonction du tissu adipeux et dysfonction cardiaque au travers de l'exploration des voies de la sénescence, notamment celle de l'ostéopontine.

Résultats : Nous avons tout d'abord confirmé l'existence d'une cardiopathie métabolique induite par le régime HFD. Cette cardiopathie se manifestait par un remodelage avec fibrose myocardique associé à une dysfonction systolique visible uniquement en strain rate (FEVG normale) et en hémodynamique invasive. Chez ces souris obèses, nous avons retrouvé une augmentation du taux plasmatique de marqueurs pro-fibrotiques (TGF, leptine) et une baisse des marqueurs protecteurs (adiponectine), le tout secondaire à une dysfonction du tissu adipeux qui prédominait au niveau viscéral. En parallèle, nous avons observé une fibrose myocardique avec dysfonction systolique au cours du vieillissement physiologique, elle-même associée à une augmentation de la production d'ostéopontine par le tissu adipeux viscéral. D'ailleurs, les souris déficientes pour le gène de l'ostéopontine étaient protégées de la sénescence cardiaque. L'ablation de la graisse viscérale et l'utilisation de drogues inhibant l'ostéopontine chez les souris WT protégeaient également de la sénescence cardiaque ce qui confirmait le rôle du tissu adipeux dans ce processus via la production d'ostéopontine. Enfin, des résultats préliminaires chez les souris HFD montraient également un effet protecteur de l'ablation de la graisse viscérale vis-à-vis de la dysfonction cardiaque.

Conclusion : La cardiopathie métabolique secondaire à l'obésité est donc une entité bien réelle. Nous avons établi la preuve de concept du rôle de la sénescence du tissu adipeux viscéral dans les altérations cardiaques qui sont assimilables à un vieillissement cardiaque prématuré. L'ostéopontine est une cible thérapeutique potentielle à explorer.

MOTS CLES

Obésité • Diabète • Insuffisance cardiaque • Sénescence • Cardiopathie

JURY

Pr Derumeaux, Directrice

Pr Cohen, Rapporteur

Pr Bernard, Rapporteur

Pr Boczkowski

Pr Dubois-Rande

Pr Hatem

Pr Thibault

TERNACLE Julien

Metabolic cardiomyopathy: a premature aging model?

Diplôme de Doctorat. Université Paris-Est Créteil Val de Marne. Soutenue le 14 décembre 2017

RESUME

Background: The link between heart failure and obesity is not clear, and the mechanisms are unknown.

Objectives: To validate the existence of metabolic cardiomyopathy and to explore the underlying mechanisms using mice models and rescue technics.

Method: Establish a wild type mice model (WT, C57/BL6J, male) fed with a high fat diet (60% of fat, HFD), associated with rescue technics such as exercise (swimming) or visceral fat ablation. Use of a transgenic mice model with a deletion for the Osteopontin gene (OPN, senescence pathway). Analysis of HFD consequences on the adipose tissue histology and function, on the myocardial histology and function. In addition, analysis of the effects of physiological aging on the same parameters in WT and OPN mice. Finally, explore the link between adipose tissue dysfunction and cardiac dysfunction through the senescence pathway analysis, especially the OPN pathway.

Results: First, we confirmed the development of a metabolic cardiomyopathy in HFD mice, which was characterized by left ventricular remodeling with myocardial fibrosis associated with a systolic dysfunction detected only by strain rate (normal LVEF) and in-vivo hemodynamic technics. In addition, we observed in the plasma of HFD mice an increase in pro-fibrotic markers (TGF, leptin) and a decrease in protective markers (adiponectine), which was related to a visceral adipose tissue dysfunction. We also observed a myocardial fibrosis with systolic dysfunction during physiological aging associated with an increased release of osteopontin from the visceral adipose tissue. Moreover, OPN ko mice were protected from cardiac senescence. The surgical removal of the visceral adipose tissue and the use of OPN inhibitors in WT mice also protected from cardiac senescence, which corroborated the role of the adipose tissue and its OPN production in the aging process. Finally, preliminary results on HFD mice showed a cardiac protection from visceral adipose tissue removal.

Conclusion: The metabolic cardiomyopathy is a real entity, in which our data establish the proof-of – concept that adipose tissue senescence plays a key role in cardiac alteration that may be considered as premature cardiac aging. OPN may constitute a promising therapeutic target.

MOTS CLES

Obesity • Diabetes • Heart failure • Senescence • Cardiomyopathy

JURY

Pr Derumeaux, Directrice

Pr Cohen, Rapporteur

Pr Bernard, Rapporteur

Pr Boczkowski

Pr Dubois-Rande

Pr Hatem

Pr Thibault