



# THÈSE

En vue de l'obtention du titre de  
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ D'AVIGNON ET DES PAYS DE VAUCLUSE

Spécialité **Physiologie**

## Dépistage des altérations précoces de la fonction régionale myocardique par échocardiographie de stress et effet d'une intervention par supplémentation en vitamine D<sub>3</sub> dans le diabète de type 2 : approche translationnelle

Soutenue le **10 décembre 2018**

par **Clothilde PHILOUZE**

*École Doctorale 536 Sciences & Agrosciences*

### Membres du jury

<b>M. François CARRÉ</b>	PU-PH, Université de Rennes	Rapporteur
<b>M. Luc DEMAISON</b>	CR-HDR INRA, Université Clermont-Auvergne	Rapporteur
<b>M<sup>me</sup> Monique BERNARD</b>	DR CNRS, Université Aix-Marseille	Examinatrice
<b>M. Guilhem DU CAILAR</b>	PH-HDR, C.H.U. de Montpellier	Examineur
<b>M. Falah ABOUKHOUDIR</b>	PH, C.H. d'Avignon	Examineur
<b>M. Jean-François LANDRIER</b>	DR INRA, Université Aix-Marseille	Examineur
<b>M. Cyril REBOUL</b>	MCF-HDR, Université d'Avignon	Examineur
<b>M. Philippe OBERT</b>	PU, Université d'Avignon	Directeur de thèse



ORCID  
Supporting Research and Innovation



*À mes Papous*



## Remerciements

**J** e souhaite remercier toutes celles et ceux qui m'ont accompagnée et soutenue dans cette aventure qui s'achève et qui ont fait de ces trois années un moment riche en belles rencontres et en bons souvenirs.

Tout d'abord, merci à **Agnès VINET**

de m'avoir permis de réaliser cette thèse dans son laboratoire.

Merci à **Philippe OBERT**

de m'avoir offert la chance de réaliser cette thèse sous sa direction. Je dois bien avouer que vous m'impressionniez beaucoup au début mais j'ai appris à mieux vous connaître et j'ai apprécié travailler avec vous, pour l'autonomie que vous m'avez laissée, tout en étant toujours là lorsque j'en avais besoin. Votre énergie, votre passion pour la science et votre impressionnante capacité de travail ont été un vrai moteur pour moi. Merci de m'avoir accordé votre confiance pendant ces trois années.

Merci à **François CARRÉ** et **Luc DEMAISON**

d'avoir accepté de rapporter ce travail. Merci d'y avoir apporté votre expertise et vos réflexions constructives.

Merci à **Monique BERNARD**

d'avoir accepté d'être examinatrice, mais également d'avoir participé à l'évolution de ce travail par son expertise lors des comités de thèse.

Merci à **Guilhem DU CAILAR**

d'avoir accepté d'être examinateur.

Merci à **Falah ABOUKHOUDIR**

d'avoir accepté d'examiner ce travail. Mais avant tout, merci pour ces trois années de collaboration étroite et de votre forte implication dans ce projet, qui représente un travail considérable. Merci également d'avoir pris le temps de m'initier à l'échocardiographie, cela m'a permis d'ouvrir mon regard, scientifique, à la réalité de la pratique clinique. Merci de votre patience et de votre gentillesse.

Merci à **Jean-François LANDRIER**

pour son implication forte dans ce projet. Merci de m'avoir accueillie dans ton laboratoire et d'avoir été l'un des moteurs de ce projet. Merci pour ton expertise, ta disponibilité, ta patience et ta bonne humeur. C'est un plaisir de travailler avec toi. Merci d'avoir accepté d'examiner ces travaux.

Merci à **Cyril « Hannouna » REBOUL**

(Désolée il fallait que je la fasse.) Merci avant tout pour ces trois années de blagues douteuses, le bureau est étrangement calme lorsque tu n'es pas là. Nos séances de TP vont me manquer, si j'ai l'occasion de refaire des frottis vaginaux à des rattes, j'aurai une pensée pour toi. Mais comme Rossini, toutes les bonnes choses ont une fin. Plus sérieusement, merci pour ton aide précieuse pendant ces trois années. Même si je ne suis pas ton étudiante, tu as toujours été là pour m'épauler et tu as pris le temps de répondre à mes questions. C'est toujours un plaisir de parler avec un passionné de science comme toi, tes remarques sont intéressantes même si le sujet sort de ta thématique. En même temps quand on lit *Nature* aux toilettes... Merci d'avoir accepté d'être membre de ce jury, pas trop de questions sur la mitochondrie et le NO, s'il-te-plaît.

Merci à l'ensemble des **titulaires du laboratoire**

pour la bonne ambiance qui y règne et cette atmosphère « familiale ». Par ordre alphabétique (pas de jaloux) : merci à **Catherine** « la marseillaise » pour cette collaboration et pour la découverte des belles calanques. Merci **Claire** pour ton énergie débordante et contagieuse, bon courage au petit Léon pour suivre une maman aussi sportive! **Florence**, tout juste arrivée mais déjà parfaitement intégrée à l'équipe, merci pour ta gentillesse, ta bonne humeur et ton ouverture aux autres. Je te souhaite plein de réussite pour les années qui viennent. Merci à **Guillaume**, le hipster du labo, pour sa bonne humeur et ses blagues, vous faites un duo infernal avec Cyril ! Merci à **Greg**, notre ambassadeur Coca Cola et troisième fournisseur officiel de blagues, de m'avoir permis de prendre part au projet de thèse de Gaëtan. Merci à **Sandrine** pour son aide précieuse dans le quotidien du labo et sa disponibilité lorsqu'on a besoin d'aide dans les manip. Merci à **Steph**, aussi à l'aise avec les petits sous-entendus que sur un vélo, pour cette montée du Ventoux en tandem. Je pourrai dire que je l'ai fait ! Enfin, merci à **Pascal** et **Yannick**, on s'est assez peu croisé mais ça a toujours été un plaisir.

Merci à l'ensemble du **pôle sportif**

Et que serait le pôle sportif sans son gardien **Mr Allal Berrag**. Merci d'être toujours là pour rendre service et pour ta patience quand il s'agit de me déloger du bureau le soir. Tu vas enfin pouvoir fermer le bâtiment tranquillement, mais je sais que ça va te manquer que je ne sois plus là pour

tenter de négocier du rab de temps. Merci au quatuor des Wonder Women du rez-de-chaussée, **Jenny, Marielle, Mercedes et Natacha** d'être toujours disponibles pour aider les doctorants en détresse. Merci pour votre gentillesse, votre bienveillance, votre bonne humeur et vos rires qui résonnent à l'autre bout du couloir. Merci à l'ensemble des « **PRAG** », nous n'avons pas l'occasion de travailler ensemble mais votre bonne humeur et vos débats enflammés avec les MCF animent joyeusement les repas du midi.

Merci aux **doctorants** du LaPEC

Sur ces trois années de thèse, je me suis retrouvée au croisement de deux « générations » de doctorants, différentes mais toujours soudées.

Chez les « anciens », merci à « **coach – Yeah bro' ! –** » **Charly**, l'électron libre 100% huile de coco du labo, qui veut tout « faire différemment » parce que c'est la devise du RCT (ou quelque chose comme ça). Merci pour tes idées farfelues de *one man show* pour ta soutenance, à base d'entrée triomphale sur AC/DC, qui donnent des sueurs froides à Steph à l'approche de ta soutenance. Merci pour le rituel de la « petite marche » pour me sortir du bureau pendant la rédaction, suivie bien sûr de la « collation » et de la « séance haut du corps ». Je vais pouvoir porter mon canapé toute seule le jour de mon déménagement. Merci à « **Tonton** » **Chris**, labellisé bio & fairtrade, le grand sage aux convictions aussi fortes que son empathie, qui a plus de vécu qu'un chat à sa neuvième vie. Merci à **Cindy**, notre ancienne « cheffe des doctorants », pure sudiste (de l'accent à la conduite « sportive ») au caractère bien trempé et féministe dans l'âme, toujours prête à répondre aux blagues avec une répartie bien aiguisée. Les fameux débats de 18h, ta foi en ta capacité (un peu rouillée) à détecter les gays et tes discussions sur les poils de bras avec Omar resteront gravés dans ma mémoire. Merci à **Gaëtan**, le corse comme il n'en existe qu'un, toujours à l'ouest et c'est ce qui fait ton charme. Il faut un décodeur pour comprendre ce que tu dis et on se souviendra longtemps de la blague tombée à l'eau de Sigourney Weaver, « mais si, tu sais, l'actrice qui joue dans *Aiyem* » ! On notera également ton amour du sport, mais pas du régime alimentaire qui va avec (mmm, des profiteroles !) et ton léger manque de discernement quant à tes prochains défis sportifs : « Qui est partant pour faire le Cho Oyu avec moi ? C'est à 8000m d'altitude, à 20km de l'Everest, il paraît que c'est facile ». Merci **Julien** pour ton calme olympien en toutes circonstances, ton humour décapant et ton imagination débordante pour inventer des jeux à la noix en pleine rédaction de thèse (le fameux « Chamboulby »). Merci **Laura**, pour ta gentillesse et ton ouverture aux autres. On ne se sera pas côtoyé très longtemps, mais tu m'auras fait découvrir le Picon-bière, qui aura (fortement) contribué à trahir mon rire dès la première soirée. Merci **Omar** pour tes idées de débat, disons, « originales », ton humour et tes connaissances toujours à jour sur les derniers régimes à tester (« low carb, high

fat », « cétonique », « jeûne intermittent » et autres...). Merci à **Saloua**, la « doyenne » des doctorants, fidèle à ses amis et inséparable de Cindy, avec un caractère tout aussi bien trempé. Merci à **Sylvain**, « le félé qui apporte la lumière » pour ton ouverture d'esprit. Au premier abord tu fais plus littéraire que scientifique mais il m'a suffi de t'écouter une fois en journal club pour comprendre que tu maîtrises le sujet.

Aux « petits nouveaux », tout d'abord, **bon courage !** Merci à **Alex**, ma compatriote bretonne, pipelette invétérée, pour son entrain inaltérable, son rire et le partage de souris, bien sûr ! Merci à **Antoine** pour son débit impressionnant de vanes. Je sais que tu l'attends, alors, oui, je remercie l'homme qui nous a fait passer sous la porte du château de Châteauneuf-du-Pape grâce à son incroyable Aygo. À noter que tu es la première personne que je vois conduire en position « allongée », c'est d'ailleurs peut-être pour ça que tu as raté l'entrée du parking. Merci **Cécile**, vraie STAPS dans l'âme, pour ta gentillesse et ta bonne humeur invariables, même quand tu es dans la galère. Garde ton optimisme ! Merci à **Douriette**, la Suisse personnifiée, qui s'entend bien avec tout le monde et mène son petit bout de chemin mine de rien. Merci pour ta gentillesse et tes joues qui virent au rouge en ¼ de seconde, pense quand-même à prendre des cours de yoga, les gobelets de la cafet te remercient d'avance. **Justine**, ta gentillesse, ton empathie et ta capacité à écouter les autres m'impressionnent. Bon courage pour concilier ta thèse avec tes responsabilités à l'hôpital. Couscous **Sydney**, merci pour ton énergie communicative et ton humour. Je ne te félicite pas pour ton assiduité en pass cardio-muscu par contre... Ne te laisse pas faire avec Antoine.

Merci à tous les **stagiaires** du LaPEC

qui nous envahissent tous les 2<sup>nd</sup> semestres. Plus particulièrement, merci à **Elsa**, disciple inséparable de Doria, la gentillesse incarnée tant que tu n'essaies pas de lui marcher sur les pieds (certains s'en souviendront) ! J'attends toujours notre session dégustation de bière aux 3 Brasseurs... Merci **Eugénie**, pour ta bonne humeur communicative, ton sens de l'humour imparable et ta sincérité. Merci pour les goûters-apéros-Coupe du Monde ! Merci **Eva**, Madame Catastrophe, tu nous as bien fais rire mais pense à prendre une bonne mutuelle... Merci pour ton rire longue-portée et ton émotivité surdéveloppée. Un grand merci aux stagiaires que j'ai pu encadrer, **Corentin** (CAP esthétique-mention épilation de souris) et **Pauline**, vous avez assuré, ce fut un plaisir de travailler (de passer des journées enfermés dans le noir à faire des échos) avec vous. Enfin, un grand merci à **Asma**, que je n'ai pas encadrée directement mais qui a fait un travail formidable avec la relecture des échocardiographies des souris.

J'espère que vous trouverez votre voie, je vous souhaite plein de réussite pour la suite !



Merci aux « **marseillais** »

Merci à toute l'équipe du C2VN qui m'a chaleureusement accueillie et encadrée pendant mes manips. Merci à **Charlène** et **Julien** pour leur patience, leur gentillesse et leur disponibilité. C'est un plaisir de travailler avec vous. Merci à **Jean-Charles** de m'avoir accueillie dans son labo et d'avoir pris le temps de m'expliquer les bases de la lipidomique. Merci à **Shéhérazade** de m'avoir encadrée pendant les extractions, comme quoi on peut papoter et être efficace en même temps, et merci à **Ljubica** d'avoir fait les mises au point. Merci à **Catherine** pour les dosages de vitamine D, merci d'avoir eu le courage de rester avec moi jusque 22h30 ! Enfin, merci à **Franck** pour son aide précieuse lors des sacrifices.

Merci aux « **montpelliérains** »

Merci à l'ensemble de l'équipe du BC2M pour son accueil, j'ai passé de bons moments avec vous. Merci **Bernard** pour ta disponibilité et ton humour. Merci à **Laura** de m'avoir formée à l'histo, merci pour ta gentillesse, tes expressions et ton accent de « carcas' ». Un grand merci **Nathalie** pour ton aide précieuse et ton œil expert.

Merci à **mes proches**

Merci à **ma famille** pour son amour et son soutien indéfectible tout au long de ce parcours qui s'achève. Merci pour votre écoute, vos conseils dans mes moments de doute et merci de m'avoir toujours suivi dans mes choix. Vous êtes le socle de ma réussite. Merci à **mes amis**, de Bretagne et d'ailleurs, loin des yeux mais près du cœur, que je retrouve toujours comme si on ne s'était jamais quittés.

Merci à **Thomas**

Mon meilleur ami, mon confident, mon Lexomil, merci de ton soutien sans faille pendant ces trois années, qui n'ont pas été de tout repos. Merci d'être toujours là pour moi, au quotidien, que tu sois ici ou ailleurs. Je ne m'attendais pas à une aussi belle rencontre en arrivant ici.





## Financements & collaborations



Les travaux de cette thèse ont été réalisés au sein du Laboratoire de Pharm-Écologie Cardiovasculaire (LaPEC) EA 4278 de l'Université d'Avignon, en étroite collaboration avec le centre hospitalier Henri Duffaut d'Avignon, le Centre de recherche en CardioVasculaire et Nutrition (C2VN) UMR 1260 INSERM/INRA/AMU de l'Université Aix-Marseille et le laboratoire de Biocommunication en Cardio-Métabolique (BC2M) EA 7288 de l'Université de Montpellier.



La première étude cette thèse a bénéficié d'une bourse « insuffisance cardiaque » de la Société française de Cardiologie, obtenue en 2014.



Le système d'imagerie Vevo 3100™ (Fujifilm VisualSonics, Toronto, Canada) de la plateforme 3A a été financé par le Fond de Développement Régional Européen, le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, la Région Provence-Alpes-Côte d'Azur, le Conseil Départemental du Vaucluse et l'agglomération d'Avignon.



## Table des matières

<i>Liste des abréviations</i> .....	11
<i>Liste des tableaux &amp; figures</i> .....	13
INTRODUCTION GÉNÉRALE .....	17
REVUE DE LA LITTÉRATURE .....	23
I- DIABÈTE & FONCTION CARDIAQUE.....	25
1- Le diabète.....	25
a) Définition générale.....	25
1. Diabète de type 1 (insulinodépendant ou juvénile).....	25
2. Diabète de type 2 (non insulinodépendant ou de l'adulte) .....	25
3. Diabète Gestationnel.....	25
4. Diabètes monogéniques.....	26
<i>Le maturity-onset diabetes of the young</i> .....	26
Le diabète néonatal.....	26
Le diabète mitochondrial .....	26
5. Diabètes consécutifs à d'autres pathologies.....	27
6. Diabètes provoqués par des traitements médicamenteux.....	27
b) Diagnostic.....	27
c) Épidémiologie.....	28
d) Physiopathologie .....	30
1. Facteurs génétiques .....	30
2. Facteurs environnementaux .....	31
3. Facteurs nutritionnels .....	32
Le tissu adipeux .....	32
Le foie .....	36
Le muscle.....	36

Les cellules $\beta$ pancréatiques.....	37
Autres facteurs .....	37
e) Complications associées.....	38
1. Rétinopathie diabétique.....	38
2. Néphropathie diabétique .....	39
3. Neuropathie diabétique .....	39
f) Approches thérapeutiques.....	40
1. Objectif.....	40
2. Stratégies Hygiéno-diététiques .....	42
Mesures diététiques.....	42
Activité physique .....	43
Tabagisme.....	44
3. Stratégies médicamenteuses .....	44
2- La cardiomyopathie diabétique .....	47
a) Définition générale.....	47
b) Physiopathologie .....	48
1. Altérations du muscle cardiaque.....	49
Altération du métabolisme cardiomyocytaire .....	49
Glucotoxicité.....	51
Adiposité cardiaque et lipotoxicité.....	53
Stress oxydant et inflammation .....	55
Altération des protéines sarcomériques.....	57
Autophagie et mort cellulaire .....	58
2. Altérations neurohumorales .....	59
Activation du système rénine-angiotensine.....	59
Activation du système nerveux autonome sympathique.....	60

3. Altérations vasculaires.....	60
4. Altérations du tissu adipeux épicardique .....	61
c) Approches thérapeutiques.....	63
Prévention .....	63
Prise en charge de l'insuffisance cardiaque .....	64
II- DIAGNOSTIC DE LA CARDIOPATHIE DIABÉTIQUE : APPROCHES ACTUELLES ET PERSPECTIVES....	66
1- Approches actuelles .....	66
a) Évaluation du risque cardiovasculaire et dépistage de la cardiomyopathie diabétique ..	66
b) Outils diagnostiques .....	67
c) Critères diagnostiques.....	68
1. Morphologie cardiaque .....	68
Mesure des dimensions linéaires .....	69
Évaluation des volumes.....	69
Calcul de la masse ventriculaire gauche.....	69
Hypertrophie ventriculaire gauche .....	70
2. Fonction diastolique .....	71
3. Fonction systolique.....	74
2- Perspectives.....	75
a) Évaluation de la fonction régionale myocardique par imagerie de déformation .....	75
1. Le muscle cardiaque .....	75
2. Évaluation de la fonction régionale myocardique par échocardiographie .....	77
Le Doppler tissulaire .....	77
Le <i>speckle-tracking imaging</i> .....	79
3. La fonction régionale myocardique dans le diabète de type 2 .....	82
b) L'échocardiographie de stress.....	84
1. Généralités .....	84

2. L'échocardiographie de stress chez le patient diabétique .....	86
III- LA SUPPLÉMENTATION EN CHOLÉCALCIFÉROL : UNE NOUVELLE STRATÉGIE PROPHYLACTIQUE CHEZ LE PATIENT DIABÉTIQUE ?.....	89
1- La vitamine D : notions générales .....	89
a) Généralités .....	89
1. Apports .....	89
2. Synthèse & métabolisme.....	90
3. Mécanismes d'action.....	92
Effets génomiques .....	92
Effets non-génomiques .....	93
b) Cibles & fonction .....	94
c) La supplémentation en vitamine D .....	97
2- Vitamine D, diabète et cœur .....	99
a) La vitamine D chez le patient diabétique .....	99
b) Vitamine D et fonction cardiaque .....	101
1. Vitamine D et cœur .....	101
2. Vitamine D et maladies cardiovasculaires.....	103
Études observationnelles .....	103
Études interventionnelles.....	104
c) Vitamine D et cardiomyopathie diabétique .....	105
MATÉRIELS & MÉTHODES .....	109
I- PROTOCOLES CLINIQUES – Études 1 & 2.....	111
1- Populations.....	111
Critères d'exclusion pour l'ensemble des sujets .....	112
Critères d'exclusion des patients T2DM de l'étude 1.....	112
Critères d'exclusion des patients T2DM de l'étude 2.....	112



2-	Examen clinique, anthropomorphique et biologique préalable .....	114
3-	Bilan échocardiographique.....	115
a)	Échocardiographie conventionnelle au repos du cœur gauche (études 1 & 2).....	115
1.	Dimensions cardiaques.....	115
2.	Indices fonctionnels.....	116
	Fonction systolique.....	116
	Fonction diastolique .....	116
b)	Protocole de stress à la dobutamine.....	116
c)	Enregistrement de boucles pour l'analyse en Speckle-tracking imaging.....	117
d)	Analyse en mode Speckle-Tracking Imaging bidimensionnel .....	117
e)	Mesure du tissu adipeux épicardique .....	118
4-	Supplémentation en vitamine D <sub>3</sub> (étude 2).....	119
II-	PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL – Étude 2.....	120
1-	Modèle animal .....	120
2-	Régime diabétoène et supplémentation en vitamine D <sub>3</sub> .....	121
3-	Suivi longitudinal .....	122
a)	Poids .....	122
b)	Prise alimentaire .....	122
c)	Homéostasie glucidique .....	122
d)	Fonction cardiaque.....	123
1.	Bilan cardiaque de repos.....	124
	Dimensions cardiaques.....	124
	Indices fonctionnels.....	124
	Enregistrement de boucles pour l'analyse du <i>strain</i> .....	125
2.	Protocole de stress à la dobutamine.....	125
3.	Analyse du <i>strain</i> .....	126

4- Sacrifice des animaux et échantillonnage .....	126
5- Analyses biochimiques et biomoléculaires .....	127
a) Analyses sur échantillon cardiaque .....	127
1. Analyse de l'expression génique par RT-qPCR .....	127
Extraction des ARN .....	127
Dosage des ARN totaux et analyse qualitative .....	128
Transcription inverse .....	128
PCR quantitative .....	129
2. Activation de la voie NF- $\kappa$ B.....	130
Extraction des protéines.....	130
Dosage des protéines .....	130
ELISA .....	130
3. Lipidomique et dosage des triglycérides .....	131
Extraction des lipides.....	131
Lipidomique.....	131
Dosage des triglycérides.....	132
b) Dosages plasmatiques .....	133
1. Métabolisme gluco-lipidique.....	133
Dosage des triglycérides.....	133
Dosage des acides gras non-estérifiés.....	133
Dosage du glucose .....	133
Dosage de l'insuline.....	134
2. Vitamine D et calcium .....	134
Vitamine D.....	134
Calcium .....	135
6- Analyses histologiques .....	136

a) Morphologie et fibrose cardiaques .....	136
1. Préparation des coupes.....	136
Déshydratation .....	136
Inclusion .....	136
Coupe.....	136
2. Coloration .....	136
3. Lecture des lames et analyse.....	136
III- ANALYSE STATISTIQUE .....	137
RÉSULTATS.....	139
Étude I.....	141
Étude II.....	153
Vitamin D <sub>3</sub> supplementation alleviates early left ventricular dysfunction in asymptomatic patients with uncomplicated type 2 diabetes: a comprehensive two-dimensional speckle tracking imaging study at rest and under dobutamine stress.....	154
ABSTRACT .....	155
INTRODUCTION .....	157
METHODS .....	159
Study population .....	159
Clinical and biological assessments .....	160
Standard echocardiography .....	160
Dobutamine stress echocardiography .....	161
Vitamin D supplementation protocol.....	162
Statistical analysis.....	163
RESULTS.....	163
Clinical and echocardiographic characteristics .....	163
STE at rest and under DB infusion .....	164
DISCUSSION .....	164

Clinical implication .....	169
Study limitations.....	169
Conclusion .....	170
REFERENCES .....	171
TABLES.....	181
FIGURES.....	185
Vitamin D <sub>3</sub> supplementation alleviates left ventricular dysfunction in a mouse model of diet-induced type 2 diabetes: potential involvement of cardiac lipotoxicity modulation. ....	189
ABSTRACT .....	190
INTRODUCTION .....	192
METHODS .....	194
Animals.....	194
Experimental groups and protocol.....	195
Glucose homeostasis.....	195
Echocardiography.....	196
Animals sacrifice.....	196
Blood analyses.....	197
Cardiac lipid profile.....	197
Fibrosis.....	198
Statistical analysis.....	198
RESULTS.....	199
Vitamin D supplementation does not impede HFS diet-induced metabolic abnormalities and increase in visceral fat mass.....	199
Vitamin D supplementation in DM mice alleviates cardiac remodeling and regional myocardial dysfunction. ....	200
Cholecalciferol supplementation reduces cardiac lipotoxicity in DM mice. ....	201
DISCUSSION .....	202

Conclusion .....	208
REFERENCES .....	209
FIGURES .....	217
DISCUSSION GÉNÉRALE .....	225
CONCLUSIONS & PERSPECTIVES.....	235
<i>Conclusion</i> .....	237
<i>Perspectives</i> .....	238
BIBLIOGRAPHIE.....	241



## Liste des abréviations

**AG** Acides gras

**AGE** Produits de la glycation avancée

**AGNE** Acides gras non-estérifiés

**AMPK** *Adenosine monophosphate-activated protein kinase*

**ATP** adénosine triphosphate

**BSA** Surface corporelle

**CamKII** Kinase calmoduline-dépendante II

**CoA** Coenzyme A

**CRPus** Protéine C-réactive (méthode ultrasensible)

**CS** *Strain* circonférentiel

**CTRL** Contrôle

**DAG** Diacylglycérol

**DB** Dobutamine

**DM** Groupe diabétique

**DMCM** Cardiopathie diabétique

**DM+D** Groupe diabétique supplémenté en vitamine D<sub>3</sub>

**ERK** *Extracellular-signal-regulated kinase*

**F<sub>A</sub>-CoA** *Fatty acyl-coenzyme A*

**FC** Fréquence cardiaque

**FE** Fraction d'éjection

**FGF** *Fibroblast growth factor*

**FoxO** *Forkhead box, class O*

**GLP-1** *Glucagon-like peptide-1*

**GLS** *Strain* longitudinal global

**GLUT** transporteur de glucose

**GPCR** Récepteurs couplés à une protéine G

**HFrEF** Insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée

**HFrEF** Insuffisance cardiaque à fraction d'éjection réduite

**HIF-1 $\alpha$**  *Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$*

**HOMA-IR** *Homeostasis model assessment of insulin resistance*

**HbA1c** Hémoglobine glyquée

**IKK $\beta$**  *Inhibitor of nuclear factor  $\kappa$ B kinase subunit  $\beta$*

**IL-** Interleukine

**IMC** Indice de masse corporelle

**IRS-1/2** *Insulin receptor substrate 1/2*

**JNK** *C-Jun N-terminal kinase*

**LS** *Strain* longitudinal

**LVDd/-s** Diamètre interne du ventricule gauche en télédiastole/-systole

**LVEDV** Volume ventriculaire gauche télédiastolique

**LVESV** Volume ventriculaire gauche télésystolique

**LVM** Masse ventriculaire gauche

**miR** Micro-ARN

**mTOR** *Mechanistic target of rapamycin*

**NF-κB** *Nuclear factor κB*

**PA -S /-D /-M** Pression artérielle  
systolique/diastolique/moyenne

**PGC-1α** *Peroxisome proliferator activated  
receptor gamma coactivator 1α*

**PI3-K/Akt** *Phosphoinositide 3-kinase/protein  
kinase B*

**PKC** Protéine kinase C

**PPARs** *Peroxisome proliferator activated  
receptors*

**PSLAX** Parasternale grand axe

**PSAX** Parasternale petit axe

**PTH** Parathormone

**PW** Paroi postérieure du ventricule gauche

**QPCR** *quantitative polymerase chain reaction*

**RAGE** Récepteur des produits de la glycation  
avancée

**RAS** Système rénine-angiotensine

**ROS** Espèces réactives dérivées de l'oxygène

**RYR** *Ryanodine receptor*

**RWT** Épaisseur pariétale relative

**RXR** *Retinoïd X receptor*

**SERCA** *Sarco-/endoplasmic reticulum calcium  
ATPase*

**STI** *Speckle-tracking imaging*

**TA** Tissu adipeux

**TAE** Tissu adipeux épicardique

**TD** Télédiastol-e-ique

**TDI** Doppler tissulaire

**TG** Triglycérides

**TNF-α** Tumor necrosis factor α

**TS** Télésystol-e-ique

**T1DM** Diabétique de type 1

**T2DM** Diabétique de type 2

**T2DM-N** Diabétique de type 2 « normal » (en  
vitamine D)

**T2DM-I** Diabétique de type 2 « insuffisant » (en  
vitamine D)

**T2DM-D** Diabétique de type 2 « déficient » (en  
vitamine D)

**T2DM-C** Diabétique de type 2 « carencé » (en  
vitamine D)

**VDR** Récepteur à la vitamine D

**VDRE** *Vitamin D response element*

**VG** Ventricule gauche

**VitD** Vitamine D

**Δψ<sub>m</sub>** Potentiel de membrane mitochondrial

**ε** *Strain* dérivé du Doppler tissulaire

**ε<sub>R</sub>** *Strain rate* dérivé du Doppler tissulaire

**1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>** 1,25(OH)<sub>2</sub>Vitamine D<sub>3</sub> (calcitriol)

**25(OH)D<sub>3</sub>** 25(OH)Vitamine D<sub>3</sub> (calcidiol)

**2C** Coupe apicale 2 cavités

**4C** Coupe apicale 4 cavités





## Liste des tableaux & figures

Figure 1. Critères diagnostics du diabète .....	28
Figure 2. Évolution de la prévalence du diabète de 1980 à 2014 dans le monde, selon la catégorie de revenu des pays.....	28
Figure 3. Les 10 principales causes de mortalité dans le monde en 2016 selon l'OMS.....	29
Figure 4. Données de l'International Diabetes Federation sur le diabète en France en 2017 et projection de l'évolution en 2045 .....	30
Figure 5. Remodelage physiologique (A) vs. pathologique (B) du tissu adipeux blanc.....	33
Figure 6. Les différents stades de progression de la néphropathie diabétique.....	39
Figure 7. Zones atteintes par la polyneuropathie périphérique distale.....	40
Figure 8. Ajustement du taux d'HbA1c cible en fonction du profil du patient .....	41
Figure 9. Tableau récapitulatif des différentes classes d'antidiabétiques et de leurs caractéristiques	45
Figure 10. Résumé schématisé de la stratégie thérapeutique dans le diabète de type 2.....	46
Figure 11. Caractéristiques générales de la cardiomyopathie diabétique.....	48
Figure 12. Schéma simplifié des perturbations métaboliques observées dans le cardiomyocyte dans le diabète de type 2.....	51
Figure 13. Observation au microscope électronique d'un myocarde de souris contrôle (A, B) ou <i>ob/ob</i> présentant une stéatose (C, D).....	54
Figure 14. Schéma simplifié des altérations des mouvements calciques impliqués dans la contraction et la relaxation du cardiomyocyte pouvant être induites par le stress oxydant.....	57
Figure 15. Voies de régulation de l'autophagie.....	59
Figure 16. Localisation du tissu adipeux épicaudique, schématisée et sur une coupe de ventricule gauche humain coloré en hématoxyline-éosine .....	61
Figure 17. Recommandations de l' <i>American Society of Echocardiography</i> concernant les techniques d'imageries appropriées à chaque type d'évaluation .....	68
Figure 18. Valeurs de référence des dimensions cardiaques.....	70
Figure 19. Classification de la géométrie cardiaque en fonction de la masse ventriculaire gauche indexée et de l'épaisseur pariétale relative .....	71



Figure 20. Exemple de mesure des pics protodiastoliques E et e' ainsi que du flux de régurgitation tricuspide.....	72
Figure 21. Acquisition et contexte d'utilisation des quatre paramètres préconisés pour identifier une dysfonction diastolique, selon les recommandations de l'ASE et de l'EACVI .....	72
Figure 22. Valeurs seuil et arbre décisionnel pour la classification de la fonction diastolique chez le patient présentant une fraction d'éjection préservée .....	73
Figure 23. Gradation de la dysfonction diastolique .....	73
Figure 24. Classification des profils de remplissage cardiaque, selon le flux mitral et le Doppler tissulaire .....	74
Figure 25. Orientation des fibres cardiaques, du sous-endocarde au sous-épicarde.....	76
Figure 26. Spectre de vitesse obtenu en Doppler pulsé avec pics de vitesse systolique s', protodiastolique e' et diastolique tardif a'.....	78
Figure 27. Analyse des vitesses de déplacement en Doppler tissulaire couleur.....	79
Figure 28. Principe du suivi des marqueurs acoustiques image après image.....	80
Figure 29. A) définition de la région d'intérêt, B) règle de segmentation et C) rendu final en <i>speckle-tracking imaging</i> , sur une coupe apicale .....	80
Figure 30. Nomenclature des segments selon le modèle utilisé.....	81
Figure 31. Schéma représentatif des indices fonctionnels évalués en <i>speckle-tracking imaging</i> .....	81
Figure 32. Utilité du <i>speckle-tracking imaging</i> en clinique : la localisation des segments hypokinétiques aide à localiser la zone ischémisée et indique quelle(s) coronaire(s) peu(ven)t être impliquée(s).....	82
Figure 33. Résumé des données disponibles dans la littérature concernant la fonction régionale myocardique dans le diabète de type 2, comparé à des populations contrôles. ....	84
Figure 34. Protocole de stress à la dobutamine recommandé par l'ASE et l'EACVI.....	86
Figure 35. Résumé des données de la littérature sur le <i>strain</i> longitudinal au repos et pendant un stress pharmacologique, comparé à une population contrôle .....	87
Figure 36. Apports alimentaires nécessaires pour couvrir les besoins en vitamine D.....	89
Figure 37. Principales étapes du métabolisme de la vitamine D .....	91

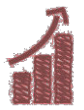


Figure 38. A) Structure et B) mécanisme de régulation de la transcription du récepteur à la vitamine D (VDR).....	93
Figure 39. Schéma récapitulatif des mécanismes d'action de la vitamine D .....	94
Figure 40. Effets immunomodulateurs de la vitamine D sur les macrophages, les cellules dendritiques et les lymphocytes T .....	96
Figure 41. Schéma posologique recommandé par le GRIO en traitement "d'attaque" de la déficience en vitamine D, selon l'importance du déficit .....	99
Figure 42. Les voies de signalisation Wnt canonique et non-canonique .....	102
Figure 43. Organigramme de recrutement des patients de l'étude 1.....	113
Figure 44. Organigramme de recrutement des patients de l'étude 2.....	114
Figure 45. Calcul du SI-DI chez A) un patient contrôle et B) un patient diabétique.....	118
Figure 46. Identification du tissu adipeux épicardique en échocardiographie .....	119
Figure 47. Protocole de supplémentation en cholécalciférol des patients de l'étude 2.....	120
Figure 48. Protocole expérimental de l'étude 2.....	120
Figure 49. Composition des croquettes A04, exprimée en pourcentage des apports énergétiques et composition en lipides, exprimée en pourcentage des lipides mentionnés dans la composition .....	121
Figure 50. Composition de la pâte HF230, exprimée en pourcentage des apports énergétiques et composition en lipides, exprimée en pourcentage des lipides mentionnés dans la composition .....	121
Figure 51. Échocardiographie chez la souris. ....	123
Figure 52. Mesure des dimensions cardiaques en mode temps-mouvement à partir d'une coupe PSLAX.....	124
Figure 53. Mesure des indices fonctionnels cardiaques. A) Flux transmitral B) Flux aortique .....	124
Figure 54. Résultat de l'analyse du strain à partir d'une coupe PSLAX. ....	126
Figure 55. Solution triphasique obtenue après centrifugation de l'homogénat.....	128
Figure 56. Protocole de qPCR en temps-réel adapté au MasterMix Plus for SYBR® Green I No ROX	129
Figure 57. Principe de l'ELISA .....	131
Figure 58. Système de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution hybride quadripôle-Orbitrap™ Q Exactive™ Plus.....	132





# INTRODUCTION

# GÉNÉRALE





Le diabète de type 2 est devenu en quelques décennies un fléau à l'échelle mondiale. D'après l'organisation Mondiale pour la Santé, sa prévalence a doublé depuis 1980, en lien avec le développement du mode de vie dit « occidental » et les facteurs de risque qui y sont associés : le surpoids et l'obésité. Cette pathologie non curable, qui représente 90 à 95% des 422 millions de cas de diabète dans le monde (en 2014), se caractérise par une hyperglycémie chronique, associé à une perte de sensibilité à l'insuline et à une altération progressive des capacités insulino-sécrétoires des cellules  $\beta$  pancréatiques. Si le diabète est aujourd'hui l'une des quatre maladies non transmissibles prioritairement ciblées par les dirigeants mondiaux, c'est en raison de sa forte morbi-mortalité, qui fait peser un poids colossal sur les systèmes de santé dans le monde : le coût annuel du diabète est estimé à 827 milliards de dollars américains (World Health Organization, 2016). En effet, des complications vasculaires et neurologiques sévères y sont associées, comme la rétinopathie, première cause de malvoyance et de cécité au sein de la population active des pays développés, la néphropathie, première cause d'insuffisance rénale en phase terminale, et la neuropathie, première cause non-traumatique d'amputation des membres (Edwards *et al.*, 2008; Heng *et al.*, 2013; Nazar, 2014). Parmi ces complications, la cardiomyopathie diabétique (DMCM) représente la première cause de morbi-mortalité chez les patients diabétiques de type 2, chez qui sa prévalence est estimée à 46% (Bouthoorn *et al.*, 2018). Cette pathologie, qui atteint le muscle, la vascularisation et l'innervation cardiaques, se caractérise classiquement par une dysfonction diastolique globale associée à une hypertrophie concentrique, la fonction systolique globale apparaissant généralement préservée (Seferović & Paulus, 2015). **Les altérations de la fonction cardiaque entamant leur développement dès l'apparition du diabète, un dépistage précoce et une prévention de la progression de cette complication revêtent une importance majeure et sont les deux objectifs ciblés par ces travaux de thèse.**

À l'heure actuelle, le diagnostic de la DMCM repose sur l'évaluation par échocardiographie transthoracique du remodelage ventriculaire gauche et de paramètres fonctionnels systoliques et diastoliques globaux (Lang *et al.*, 2015a; Nagueh *et al.*, 2016). Cependant, les indices utilisés dépendent des conditions de charge et sont peu sensibles à un stade infraclinique de la pathologie, en particulier pour la fonction systolique, évaluée par la fraction d'éjection. Être en capacité d'évaluer les propriétés intrinsèques de contractilité et de relaxation du myocarde permettrait de dépister à un stade plus précoce les altérations de la fonction cardiaque. En réponse à ce besoin, des techniques d'imagerie de déformation, permettant l'évaluation de la fonction régionale myocardique et proposant des indices moins sensibles aux conditions de charge, se sont développées ces dernières années. Le Doppler tissulaire, première technologie à avoir été développée, a ainsi permis



de mettre en évidence la présence d'une dysfonction systolique régionale en présence d'une fraction d'éjection préservée chez le patient diabétique (Fang *et al.*, 2004). Depuis, cette technique a été supplantée par le *speckle-tracking imaging*. Contrairement au Doppler tissulaire, cette deuxième technologie permet en effet de s'affranchir de la dépendance à l'angle d'acquisition et d'évaluer non seulement les déformations longitudinales du myocarde, mais également les déformations circonférentielles, radiales et la mécanique de rotation et de torsion, qui sont des éléments clés de la fonction cardiaque et de sa potentialisation dans des situations de stress comme un effort physique ou une stimulation adrénergique. Cependant, les études menées chez le patient diabétique de type 2, en Doppler tissulaire ou en *speckle-tracking imaging*, n'ont pas unanimement rapporté la présence d'une dysfonction régionale systolique (Govind *et al.*, 2006; Wierzbowska-Drabik *et al.*, 2015). Ces disparités, notamment chez des patients présentant un diabète non-complicé, pourraient témoigner d'un manque de sensibilité de l'évaluation au repos. Une évaluation en conditions de stress pourrait en revanche permettre de révéler les altérations de la fonction cardiaque qui restent discrètes au repos. La petite poignée d'études réalisées n'a cependant pas obtenu de résultats consensuels. A noter que ces études ont majoritairement eu recours au Doppler tissulaire, une technique qui comporte de nombreuses limites, et n'ont ainsi évalué que la fonction longitudinale et pas la mécanique de rotation et de torsion. **Le premier objectif de cette thèse est donc de réaliser une évaluation comprehensive de la fonction régionale myocardique en conditions de stress, afin d'évaluer l'utilité de cette méthode dans le dépistage précoce de la cardiomyopathie diabétique chez le patient asymptomatique présentant un diabète de type 2 non-complicé.**

Parmi les divers processus impliqués dans la physiopathologie de la DMCM, le développement du tissu adipeux épicardique et la lipotoxicité semblent jouer un rôle majeur. Dans le diabète de type 2, la lipotoxicité se développe conséquemment à la saturation de la  $\beta$ -oxydation du cardiomyocyte, qui induit la formation d'espèces lipotoxiques comme le diacylglycérol et les céramides. Ces deux espèces lipidiques sont capables d'exercer de multiples effets délétères, parmi lesquels l'altération de l'homéostasie calcique, la dysfonction mitochondriale et la lipoapoptose, mais également l'altération des cycles de pontage actine-myosine du sarcomère ou de la réponse aux stimuli  $\beta$ -adrénergiques (Pettus *et al.*, 2002; Battiprolu *et al.*, 2010; Drosatos *et al.*, 2010; Simon *et al.*, 2014). Le tissu adipeux épicardique, au contact direct des cardiomyocytes, exerce quant à lui de nombreux effets cardioprotecteurs en conditions physiologiques. En revanche, son expansion et le shift de son profil sécrétoire vers un phénotype délétère pro-inflammatoire dans le diabète de type 2 a été associé au développement de nombreuses perturbations fonctionnelles du cardiomyocyte, telles que l'inhibition de la signalisation insulinique, l'expression de l'angiotensine II ou l'altération de



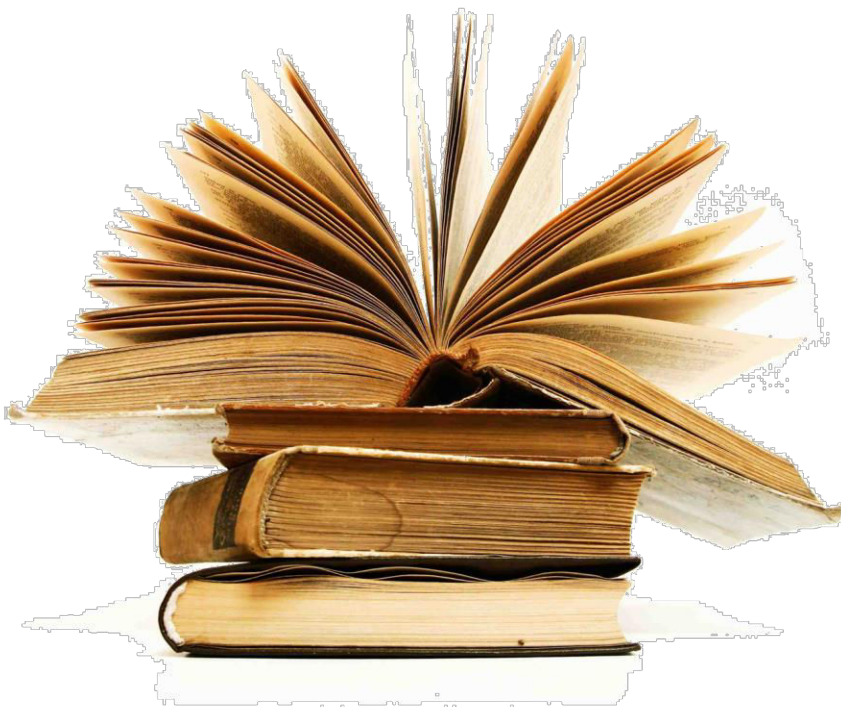


la contractilité, et à la dysfonction diastolique globale ventriculaire gauche chez les patients (Kazlauskaite *et al.*, 2010; Greulich *et al.*, 2012). **Une attention particulière sera donc portée à l'évaluation du tissu adipeux épicaudique et des espèces lipidiques au cours de ces travaux de thèse.**

Actuellement, la stratégie de prévention de la progression de la DMCM repose sur le contrôle de la glycémie associé à une intervention hygiéno-diététique. Cependant, la prévalence de l'hypovitaminose D est élevée chez les patients diabétiques de type 2 (50% à 60% en moyenne) et un taux sérique faible de calcidiol a été associé, d'une part, au risque de diabète et de complications diabétiques et, d'autre part, au risque d'insuffisance cardiaque et de mortalité cardiovasculaire, dans la population générale comme chez le patient diabétique de type 2 (Afzal *et al.*, 2013; Heidari *et al.*, 2015; Zhu *et al.*, 2017). Par ses propriétés de régulation de l'homéostasie calcique, de la prolifération cellulaire, du système rénine-angiotensine, de l'immunité et de l'inflammation, la VitD présente un fort potentiel dans la prévention de la progression de l'hypertrophie, de la fibrose et des altérations de la contractilité et de la relaxation cardiaques. Et effectivement, les études interventionnelles menées dans des populations de patients insuffisants cardiaques ont rapporté l'efficacité de la supplémentation en VitD dans l'amélioration de la fonction cardiaque, du remodelage ventriculaire, mais également de marqueurs de l'inflammation et de l'activation du système rénine-angiotensine (Schleithoff *et al.*, 2006; Schrotten *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2018). Cependant, les études interventionnelles menées chez les patients diabétiques de type 2 ne se sont pas intéressées à la fonction cardiaque comme critère de jugement principal. Seules des études expérimentales, toutefois majoritairement réalisées dans des modèles de T1DM (obtenus par injection de streptozotocine) ont évalué de façon spécifique les effets d'une supplémentation en VitD sur la structure et la fonction cardiaques. Similairement aux études cliniques menées chez les patients insuffisants cardiaques, ces travaux expérimentaux ont rapporté une amélioration de la fonction et du remodelage cardiaques associée à une diminution de la fibrose, du stress oxydant et de l'inflammation (Lee *et al.*, 2014b, 2014a; Wang *et al.*, 2014a; Wei *et al.*, 2017; Qu *et al.*, 2017; Zeng *et al.*, 2017). La VitD pourrait ainsi représenter une stratégie peu onéreuse et efficace dans la prophylaxie du développement de la cardiomyopathie diabétique chez le patient diabétique de type 2. Cependant, à ce jour, très peu de données sont disponibles dans la littérature. **Le deuxième objectif de cette thèse sera donc à la fois d'évaluer les effets d'une supplémentation en cholécalférol sur la fonction cardiaque de patients diabétiques de type 2, mais également d'élucider les mécanismes sous-jacents, avec un intérêt particulier pour la lipotoxicité, dans un modèle de souris soumise à un régime diabétogène.**



# REVUE DE LA LITTÉRATURE







## I- DIABÈTE & FONCTION CARDIAQUE

Le diabète, et notamment le diabète de type 2, est un enjeu majeur de santé publique, de par sa forte prévalence et sa morbi-mortalité. Cette pathologie métabolique chronique, qui impacte de façon majeure les fonctions vasculaires et neurologiques, est associée au développement d'une cardiopathie spécifique, la DMCM.

### 1- Le diabète

#### a) Définition générale

Le diabète est une pathologie métabolique chronique caractérisée par une altération de l'homéostasie glucidique de l'organisme, se traduisant par une hyperglycémie chronique. Bien que de nombreux types de diabète aient été décrits dans la littérature, 3 types sont majoritairement rencontrés :

#### 1. Diabète de type 1 (insulinodépendant ou juvénile)

Le diabète de type 1 (T1DM) résulte d'un défaut de sécrétion de l'insuline, causé par la destruction auto-immune des cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans du pancréas. L'étiologie de cette pathologie implique un ensemble de facteurs génétiques, immuns et environnementaux. Diagnostiqué en très grande majorité chez l'enfant et l'adolescent, il n'est aujourd'hui pas curable et le traitement symptomatique repose principalement sur l'administration à vie d'insuline exogène (Atkinson *et al.*, 2014; American Diabetes Association, 2017).

#### 2. Diabète de type 2 (non insulinodépendant ou de l'adulte)

Le diabète de type 2 (T2DM) découle d'une altération de la réponse à l'insuline de l'organisme (insulinorésistance), accompagnée d'une altération progressive de la fonction insulino-sécrétoire des cellules pancréatiques  $\beta$ . Si l'étiologie de cette pathologie est complexe et fait intervenir un ensemble de facteurs génétiques et environnementaux, la malnutrition, le surpoids/l'obésité et la sédentarité sont les principaux facteurs de risque (World Health Organization, 2016; American Diabetes Association, 2017).

#### 3. Diabète Gestationnel

Le diabète gestationnel est à différencier du T2DM, qui peut être révélé lors de la grossesse (et qui peut être diagnostiqué dans ce cas dès le 1<sup>er</sup> trimestre). Le diabète gestationnel est caractérisé par la détection d'une hyperglycémie et d'une intolérance au glucose au 2<sup>nd</sup> ou 3<sup>ème</sup> semestres de



grossesse. Si la grossesse est un terrain favorable au développement du diabète (apparition d'une résistance à l'insuline normale au cours de la grossesse, liée à des facteurs hormonaux), des facteurs de risque comme l'obésité sont également impliqués. Il est à noter que le diabète gestationnel est fortement lié au risque de développer un T2DM dans les années futures chez la mère (Hodson *et al.*, 2013; Baz *et al.*, 2016; American Diabetes Association, 2017).

On peut également définir ces autres types de diabète, moins fréquemment rencontrés :

#### 4. Diabètes monogéniques

Ces formes particulières de diabète, qui représentent 1-2% des patients diabétiques, sont le *Maturity-Onset Diabetes of the Young* (MODY), le diabète néonatal et le diabète mitochondrial, également appelé MIDD (*Maternal Inherited Diabetes and Deafness*) (Murphy *et al.*, 2008; Flannick *et al.*, 2016; American Diabetes Association, 2017).

##### Le maturity-onset diabetes of the young

Le *maturity-onset diabetes of the young* est une forme de diabète non insulino-dépendant transmise de façon autosomale dominante et généralement diagnostiquée à l'adolescence ou chez le jeune adulte (<25 ans). Les mutations les plus fréquemment rencontrées sont celles touchant le gène du facteur de transcription hépatique HNF-1 $\alpha$ , suivies par celles touchant les gènes HNA4F et GCK (Murphy *et al.*, 2008; Pihoker *et al.*, 2013; Flannick *et al.*, 2016; American Diabetes Association, 2017).

##### Le diabète néonatal

Le diabète néonatal (diagnostiqué dans les 6 premiers mois de la vie) se présente comme une forme spécifique de T1DM, qui peut être transitoire ou permanente et peut se transmettre de façon autosomale dominante ou récessive. La forme transitoire est principalement causée par une mutation des gènes ZAC/HYMAI (ZAC intervenant dans la régulation du cycle cellulaire), tandis que la forme permanente est dans la plupart des cas causée par une mutation du gène KCNJ11 (codant la protéine Kir6.2 du canal potassique sensible à l'ATP ( $K_{ATP}$ )) (Murphy *et al.*, 2008; Hoffmann & Spengler, 2015; American Diabetes Association, 2017).

##### Le diabète mitochondrial

Le diabète mitochondrial peut se présenter comme un T2DM ou un T1DM, en fonction du degré d'insulinopénie, mais il se caractérise de façon spécifique par une transmission maternelle et par la présence d'une perte d'audition bilatérale chez la plupart des patients atteints. Diagnostiqué chez le



jeune adulte, il est en grande majorité causé par la mutation m.3243A>G (Maassen *et al.*, 2004; Murphy *et al.*, 2008; Flannick *et al.*, 2016).

## 5. Diabète consécutifs à d'autres pathologies

Un diabète insulino-dépendant peut se développer consécutivement à une atteinte pancréatique, provoquée par des pathologies comme la fibrose kystique ou la pancréatite chronique. Des endocrinopathies, comme par exemple le syndrome de Cushing, mais aussi le SIDA, ont également été associées au développement d'un diabète (Thomas & Philipson, 2015; American Diabetes Association, 2017; Xiao *et al.*, 2017).

## 6. Diabète provoqués par des traitements médicamenteux

Certains traitements médicamenteux, comme les glucocorticoïdes, des immunosuppresseurs (prescrits notamment chez les patients transplantés) ou certains neuroleptiques peuvent altérer la sécrétion ou la sensibilité à l'insuline (Craig *et al.*, 2014; Thomas & Philipson, 2015; American Diabetes Association, 2017).

**Dans le cadre de cette thèse, les recherches ont ciblé le cas du T2DM. Seul ce type de diabète sera donc considéré dans la suite de ce manuscrit.**

### *b) Diagnostic*

Les recommandations émises par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), la Fédération Internationale du Diabète (*International Diabetes Federation*, IDF) et l'Association Américaine du Diabète (*American Diabetes Association*, ADA), reprises par l'Association Européenne pour l'Étude du Diabète (*European Association for the Study of Diabetes*, EASD) et la Haute Autorité de Santé (HAS) concernant les méthodes de diagnostic du diabète, reposent sur la mesure de la glycémie plasmatique ou du taux d'hémoglobine glyquée (HbA1c).

La glycémie peut être mesurée ponctuellement à jeun, après un temps de jeûne minimum de 8h, ou de façon aléatoire au cours de la journée. Un test d'Hyperglycémie Provoquée par voie Orale peut également être réalisé afin d'évaluer la tolérance au glucose du patient. Il consiste en la mesure de la glycémie avant et 2h après l'ingestion d'une dose de 75g de glucose à jeun. Le taux d'HbA1c est quant à lui le reflet de la glycémie sur une période de 2-3 mois. Les valeurs seuils associées à ces différents tests de dépistage sont présentées figure 1 ; le diagnostic peut être posé à partir du moment où une de ces valeurs seuils est atteinte ou dépassée (World Health Organization & International Diabetes Federation, 2006; Haute Autorité de Santé, 2013a; Rydén *et al.*, 2013; International Diabetes Federation, 2017a; American Diabetes Association, 2017).

Critère	Valeur seuil
<b>Glycémie à jeun</b> (vérifiée sur 2 mesures)	≥126 mg/dL (7 mM)
<b>Glycémie aléatoire</b>	≥200 mg/dL (11,1 mM)
<b>HGPO</b>	≥200 mg/dL (11,1 mM)
<b>HbA1c</b>	≥6.5% (48 mmol/mol)

Figure 1. Critères diagnostics du diabète (d'après World Health Organization & International Diabetes Federation, 2006; Haute Autorité de Santé, 2013a; Rydén et al., 2013; International Diabetes Federation, 2017a; American Diabetes Association, 2017). HbA1c : hémoglobine glyquée ; HGPO : test d'hyperglycémie provoquée par voie orale.

Selon les résultats de l'étude ENTRED (« Échantillon national témoin représentatif des personnes diabétiques »), menée de 2007 à 2010 en France, le diabète est diagnostiqué à l'occasion d'un dépistage pour 67% des patients, ce dépistage faisant suite à l'apparition de symptômes caractéristiques dans 18% des cas ou d'une complication dans 15% des cas (Haute Autorité de Santé, 2013b).

### c) Épidémiologie

Auparavant l'apanage des pays les plus riches, le diabète voit sa prévalence augmenter de façon constante dans toutes les régions du monde, et plus particulièrement dans les pays à revenus intermédiaires, comme présenté figure 2 (World Health Organization, 2016; NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC), 2016). À l'heure actuelle, on estime à 422-425 millions le nombre de diabétiques dans le monde, dont 90-95% de type 2 (World Health Organization, 2016; International Diabetes Federation, 2017b).

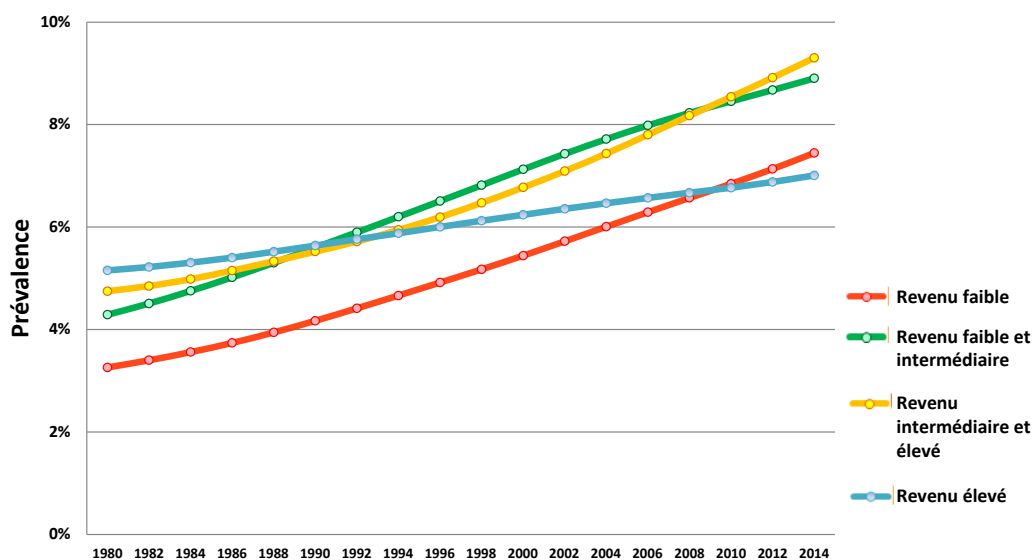
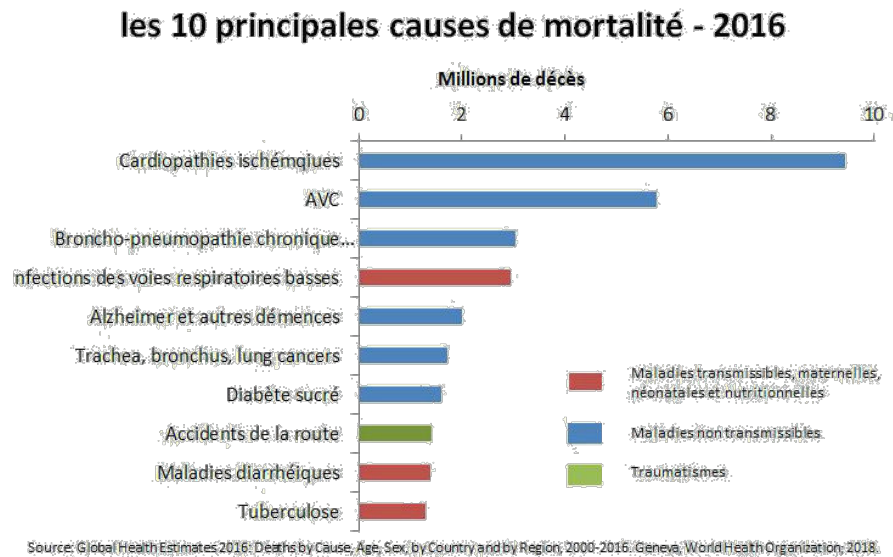


Figure 2. Évolution de la prévalence du diabète de 1980 à 2014 dans le monde, selon la catégorie de revenu des pays (World Health Organization, 2016).





Si en 2000, le diabète se classait au 12<sup>ème</sup> rang des causes de décès dans le monde, toutes causes confondues, avec 0,958 millions de décès ; d'après le dernier rapport publié par l'OMS, le diabète se classe aujourd'hui 7<sup>ème</sup>, à l'origine de 1,586 millions de décès en 2015 (figure 3). À noter que 45% de ces décès interviennent avant l'âge de 70 ans (World Health Organization, 2016).



**Figure 3. Les 10 principales causes de mortalité dans le monde en 2016 selon l'OMS (World Health Organization, 2018).**  
AVC : accident vasculaire cérébral.

En France, le diabète représente 2% des décès, toutes causes confondues, pour une prévalence estimée à 7,3% en 2017 et qui devrait augmenter pour atteindre 7,6% en 2045, d'après les prévisions de la Fédération internationale du Diabète (l'ensemble des prévisions de la Fédération internationale du Diabète pour la France en 2045 est présenté figure 4) (Fagot-Campagna *et al.*, 2010; World Health Organization, 2016; International Diabetes Federation, 2017b). En 2006, l'incidence du diabète, rapportée par l'Institut de Veille Sanitaire comme le taux brut d'admission en affection longue durée pour diabète, était de 289/100 000 habitants, soit 178 000 nouveaux cas (Fagot-Campagna *et al.*, 2010). Cette incidence, plus importante chez les hommes et dans les régions du Nord-Est du pays, augmente avec la tranche d'âge (Fagot-Campagna *et al.*, 2010).



France At a Glance	2017	2045
Diabetes estimates (20-79 years)		
	Confidence intervals in brackets	
Country prevalence, %	7.3 (6.0-8.9)	7.6 (6.3-9.3)
Age-adjusted comparative prevalence, %	4.8 (3.9-6.2)	4.8 (3.9-6.2)
Number of people with diabetes, in 1,000s	3,276.4 (2,725.6-4,004.8)	3,594.4 (2,977.5-4,396.3)
Number of people with undiagnosed diabetes, in 1,000s	1,228.3 (1,021.8-1,501.3)	1,347.5 (1,116.2-1,648.1)
Proportion of undiagnosed cases, %	37.5	37.5
Number of deaths due to diabetes, in 1,000s	18.3 (15.5-21.7)	
Proportion of deaths due to diabetes in people under 60 years, %	37.1	

**Figure 4. Données de l'International Diabetes Federation sur le diabète en France en 2017 et projection de l'évolution en 2045 (adapté de International Diabetes Federation, 2017).**

Selon les résultats de l'étude ENTRED, le profil caractéristique du diabétique en France est un homme (54% des patients), de 65 ans en moyenne et de revenus inférieurs à la moyenne française (Haute Autorité de Santé, 2013b). Toujours en France, 92% des patients diabétiques présentent un T2DM, avec une ancienneté moyenne de 11 ans (Haute Autorité de Santé, 2013b).

#### d) Physiopathologie

La physiopathologie du T2DM est complexe et a été sujette à controverse dans la littérature, notamment concernant la primauté du développement de l'insulinorésistance sur la dysfonction des cellules  $\beta$  pancréatiques. Par ailleurs, si le lien entre l'obésité, et plus particulièrement l'adiposité viscérale, et le développement de l'insulinorésistance et du diabète est décrit depuis de nombreuses années (Bjorntorp, 1991; Kissebah, 1996; Boyko *et al.*, 2000; Miyazaki *et al.*, 2002; Wannamethee *et al.*, 2005; Klötting *et al.*, 2010; Wander *et al.*, 2013), les mécanismes sous-jacents ainsi que leur place dans la chronologie du développement du T2DM restent partiellement élucidés. Plus récemment, les avancées dans les domaines de la génétique et de l'épigénétique sont venues apporter une dimension supplémentaire à la compréhension de la pathogenèse du diabète.

#### 1. Facteurs génétiques

L'importante héritabilité du T2DM (20 à 70% selon les auteurs) impose la prise en considération des facteurs génétiques dans la compréhension de sa physiopathologie (Merino *et al.*, 2017). Au cours de la dernière décennie, le développement des techniques en génomique et notamment des *Genome-Wide Association Studies* (GWAS), a permis d'identifier une centaine de *loci* associés au T2DM, le définissant ainsi comme une pathologie polygénique qui s'inscrirait dans le modèle « common disease/common variant » (postulat selon lequel les variations génétiques avec une fréquence importante dans la population générale, mais une pénétrance relativement faible,



sont les contributeurs majeurs du risque de développer la maladie) (Schork *et al.*, 2009; Kahn *et al.*, 2014; Fuchsberger *et al.*, 2016; Merino *et al.*, 2017). Ces *loci* se situent à 80% dans des régions non-codantes et ont en majorité été associés à la fonction des cellules  $\beta$  pancréatiques (Morris *et al.*, 2012; Kahn *et al.*, 2014; Merino *et al.*, 2017). De façon intéressante, une étude récente a également mis en évidence l'implication de certains *loci* en lien avec une moindre capacité de stockage des tissus adipeux (TA) et le développement de l'insulinorésistance (Lotta *et al.*, 2017). Cependant la fonction précise des *loci* identifiés reste dans la plupart des cas inconnue (Morris *et al.*, 2012; Kahn *et al.*, 2014; Merino *et al.*, 2017), limitant en l'état actuel l'impact de ces travaux dans la compréhension de la physiopathologie du T2DM et soulignant la nécessité de plus amples recherches afin de mieux cerner le rôle de ces différents *loci* dans la pathogenèse de la maladie.

## 2. Facteurs environnementaux

Outre les facteurs génétiques héréditaires, l'environnement doit également être pris en compte comme un élément à part entière de la physiopathologie du T2DM, en considérant son effet sur les modifications d'ordre épigénétique. Ces modifications regroupent tous les phénomènes se rendant responsables de variations dans l'expression du génome sans altération de la séquence de l'ADN, tels que la méthylation de l'ADN, l'acétylation des histones ou bien encore la régulation des micro-ARN (miR), longs ARN non-codants (lnc-RNA) et ARN extincteurs de gènes (siRNA) (Pinney & Simmons, 2012; De Rosa *et al.*, 2018). Ces modifications sont héréditaires mais modifiables et elles répondent aux variations de l'environnement afin de permettre une réponse cellule-spécifique à une condition donnée. Ces modifications, qui peuvent intervenir chez l'adulte mais aussi chez le fœtus en développement, jouent un rôle clé dans la susceptibilité de l'individu à naître de développer un T2DM à l'âge adulte (on parle de « mémoire » cellulaire), comme dans l'évolution de la maladie chez l'adulte (Pinney & Simmons, 2012; Lee, 2015; De Rosa *et al.*, 2018). Ainsi, une prise de poids trop importante chez la mère durant la grossesse a notamment été associée à des modifications de la programmation des circuits hypothalamiques de régulation du métabolisme énergétique chez le fœtus, se traduisant par une résistance à l'insuline et à la leptine (Lee, 2015). Dans le cadre du diabète, l'hyperglycémie est un facteur environnemental majeur induisant des modifications épigénétiques, et ce chez l'adulte comme chez le fœtus exposé *in utero*. Elle a notamment été liée, *via* des processus d'acétylation d'histones, de méthylation de l'ADN, ou d'expression de miR, au développement de complications, notamment cardiovasculaires, en provoquant une altération du métabolisme lipidique, de l'inflammation, une dysfonction endothéliale, la formation de plaques athéromateuses ou encore l'hypertrophie ventriculaire (De Rosa *et al.*, 2018). Parallèlement à l'hyperglycémie, d'autres mécanismes inhérents au diabète sont également capables d'induire des



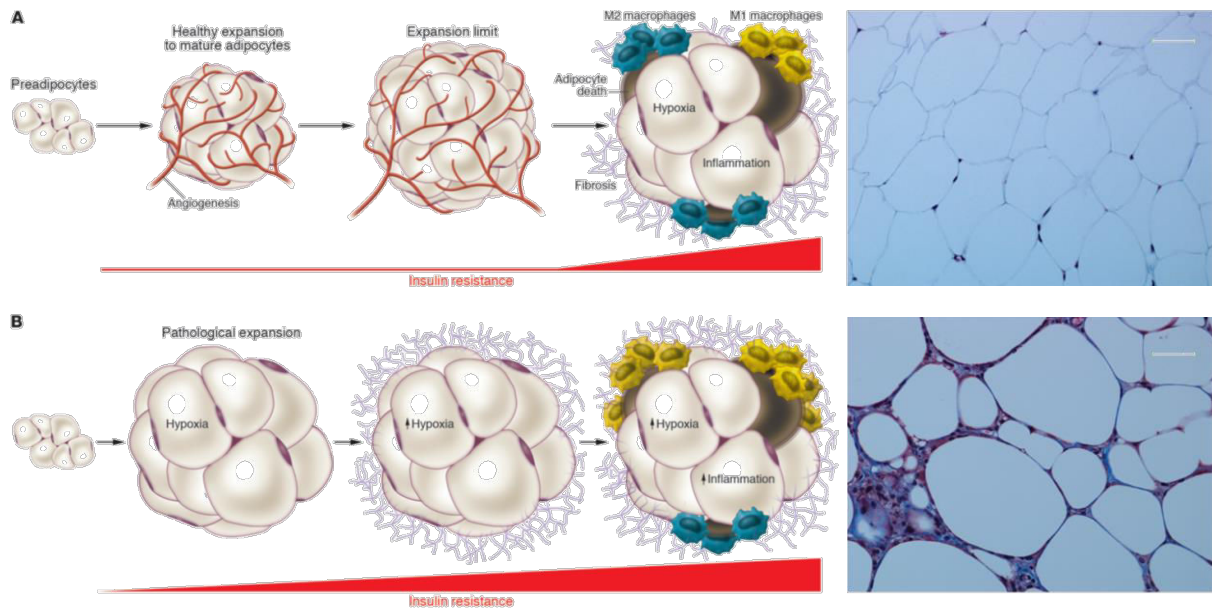
modifications épigénétiques, tels que la production d'espèces réactives dérivées de l'oxygène (ROS) et de produits de la glycation avancée (AGE), ou bien encore l'activation de protéines kinases C (PKCs) (De Rosa *et al.*, 2018).

### 3. Facteurs nutritionnels

Si la génétique et l'épigénétique peuvent moduler les prédispositions individuelles, le développement du T2DM trouve cependant principalement ses origines dans l'excédent d'apports énergétiques au regard des besoins et des dépenses de l'organisme et dans la qualité de ces apports. La dérégulation de la balance énergétique va ainsi provoquer l'altération de la fonction d'organes indispensables à l'homéostasie métabolique de l'organisme, déclenchant divers processus impliqués dans le développement de l'insulinorésistance et de l'hyperglycémie chronique.

#### Le tissu adipeux

La balance énergétique excédentaire sature progressivement les capacités de stockage et d'expansion des TA, engendrant une altération de leurs fonctions (Després & Lemieux, 2006; Klötting *et al.*, 2010; Kusminski *et al.*, 2016). En conditions physiologiques, le stockage des lipides est principalement assuré par le TA sous-cutané, un TA blanc composé de petits adipocytes sensibles à l'insuline et agissant comme un tampon à l'élévation postprandiale de la lipémie par un captage efficace des triglycérides (TG), après hydrolyse par la lipoprotéine lipase, et des acides gras libres non-estérifiés (AGNE) circulants (Ibrahim, 2010). Le pic insulinémique postprandial va également induire chez ce tissu une inhibition de la lipolyse, permettant une diminution du relargage des AGNE (Cersosimo *et al.*, 2000). Dans des conditions de surcharge énergétique, ce TA est capable de s'hypertrophier et de s'hyperplasier par adipogenèse, en recrutant des pré-adipocytes (Ibrahim, 2010; Sun *et al.*, 2011; Kusminski *et al.*, 2016). Cependant, ce phénomène expansif, considéré comme protecteur, est limité et son dépassement conduit à l'accumulation des lipides dans le TA blanc viscéral, qui s'hypertrophie à son tour (Després & Lemieux, 2006; Lessard *et al.*, 2014; Kusminski *et al.*, 2016). Ce TA viscéral diffère du sous-cutané par son activité métabolique (principalement lipolytique) plus importante, et par sa moindre sensibilité à l'insuline, limitant son effet inhibiteur de la lipolyse et donc la régulation de la sécrétion des AGNE (Kahn *et al.*, 2006; Ibrahim, 2010). Le remodelage excessif de ce TA peut conduire à terme au développement d'un phénotype pathologique caractérisé par la fibrose, l'hypoxie, l'inflammation, le stress oxydant et par un shift du profil sécrétoire des adipocytes, comme illustré figure 5 (Després & Lemieux, 2006; Kahn *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2011; Kusminski *et al.*, 2016).



**Figure 5. Remodelage physiologique (A) vs. pathologique (B) du tissu adipeux blanc.** Schéma et photos de coupes de tissus adipeux épидидymaux de souris, colorés au trichrome de Masson (adapté de Sun *et al.*, 2011).

Cet environnement délétère, associé à l'excédent de nutriments, a des conséquences majeures sur la fonction mitochondriale et le métabolisme adipocytaires et va progressivement mener à l'apparition de l'insulinorésistance du tissu.

De nombreux travaux ont ainsi montré que l'un des principaux médiateurs de l'inflammation, le *tumor necrosis factor*  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), est capable à la fois de rompre la cascade de signalisation intracellulaire PI3-K/Akt (*phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B*) médiée par l'insuline en phosphorylant l'*insulin receptor substrate 1* (IRS-1) (Aguirre *et al.*, 2000) et en inhibant sa transcription (Stephens *et al.*, 1997; Ruan *et al.*, 2002), ce qui se traduit notamment par une réduction de la transcription du transporteur de glucose GLUT4, normalement stimulée par l'insuline (Stephens & Pekala, 1991; Hauner *et al.*, 1995; Long & Pekala, 1996; Stephens *et al.*, 1997). Ces effets du TNF- $\alpha$  passeraient par une activation des voies *C-Jun N-terminal kinase* (JNK) et IKK $\beta$ /NF- $\kappa$ B (*inhibitor of nuclear factor  $\kappa$ B kinase subunit  $\beta$ /nuclear factor  $\kappa$ B*), qui peuvent également promouvoir la dégradation de l'IRS et stimuler la sécrétion des facteurs pro-inflammatoires (Aguirre *et al.*, 2000; Ruan *et al.*, 2002; Nguyen *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 2018). En outre, le TNF- $\alpha$  diminuerait l'expression de la périlipine, une protéine modulant l'accès de la lipase hormonosensible aux TG stockés au sein des gouttelettes lipidiques de l'adipocyte, stimulant ainsi la lipolyse (Laurencikiene *et al.*, 2007; Hahn *et al.*, 2014). À noter que d'autres cytokines pro-inflammatoires (interleukine (Il) 1 $\beta$ , Il-6, *monocyte chemoattractant protein 1*...), sont également capables de moduler l'expression de protéines clef de la régulation du métabolisme lipidique des adipocytes (Samuel & Shulman, 2016; Kusminski *et al.*, 2016). Cet état lipolytique et insulinorésistant du TA conduit non seulement à une diminution de



l'absorption de glucose, mais également à une augmentation de la sécrétion des NEFA, qui peuvent à leur tour directement activer la voie JNK, amplifiant le phénomène d'insulinorésistance et induisant la sécrétion du TNF- $\alpha$  par l'adipocyte (Nguyen *et al.*, 2005). C'est ainsi un véritable cercle vicieux délétère qui s'installe au sein des adipocytes, mais également dans leur environnement.

Au sein du TA, l'excès de nutriments ainsi que l'état inflammatoire vont également engendrer une majoration de la production d'espèces réactives dérivées de l'oxygène ou de l'azote (*reactive oxygen/nitrogen species*, ROS/RNS), générant un stress oxydant conduisant à la perturbation de l'homéostasie cellulaire et au développement de l'insulinorésistance (Gao *et al.*, 2010; Kusminski & Scherer, 2012; Hahn *et al.*, 2014; Newsholme *et al.*, 2016). Si les sources de ROS sont nombreuses, dont la *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate hydrogen* (NADPH) oxydase, entre autres, la principale source est la mitochondrie (Ahmad *et al.*, 2017). De nombreux facteurs, dont l'excès de nutriments et les cytokines pro-inflammatoires telles que l'Il-6, l'Il-1 $\beta$  ou encore le TNF- $\alpha$ , peuvent amplifier la production de ROS par la mitochondrie, en perturbant ses fonctions (Gao *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2010; Hahn *et al.*, 2014). Des études *in vitro* sur des adipocytes 3T3-L1 ont ainsi décelé, entre autres, une altération du potentiel de membrane mitochondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) associé à une fuite de protons, une baisse de la production d'adénosine triphosphate (ATP) ou bien encore une fragmentation des mitochondries associée à une diminution de l'expression de leurs facteurs de biogenèse, dont le *peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1 $\alpha$*  (PGC-1 $\alpha$ ) notamment (Gao *et al.*, 2010; Hahn *et al.*, 2014; Wang Chih-Hao *et al.*, 2015). Les ROS ainsi produits vont avoir un impact direct sur la voie de signalisation de l'insuline. Des études suggèrent qu'un milieu cellulaire modérément oxydatif permettrait une potentialisation de la réponse à l'insuline de l'IRS (Goldstein *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 2018). Cet effet serait dû à l'inhibition par les ROS des enzymes de la famille des *protein tyrosine phosphatases*, dont la *phosphatase and tensin homologue* (PTEN). Ce dernier exerce en effet une activité antagoniste de PI3-K, en déphosphorylant PIP3, le messenger secondaire généré en réponse à la stimulation de l'IRS par l'insuline (Ma *et al.*, 2018). En revanche, un stress oxydant trop important active les voies JNK et IKK $\beta$ /NF- $\kappa$ B, qui vont promouvoir la dégradation de l'IRS tout en inhibant l'activité des facteurs de transcription *Forkhead box, class O* (FoxO), altérant ainsi la transcription de facteurs antioxydants tels que la *Mn-superoxide dismutase* (Newsholme *et al.*, 2016; Ma *et al.*, 2018). Les ROS produits vont également exercer des effets délétères par l'oxydation des lipides, des protéines et de l'ADN (Newsholme *et al.*, 2016). Les dommages aux protéines ont ainsi été associés à une lipolyse accrue, mais également à une perturbation de l'import des sous-unités des complexes mitochondriaux à codage nucléaire, induisant une altération de leur assemblage et de leur stabilité (Kusminski & Scherer, 2012; Gómez-



Serrano *et al.*, 2016). Le stress oxydant, associé à la fuite de  $\text{Ca}^{2+}$  et à la déplétion en ATP liées à la dysfonction mitochondriale, va également initier le phénomène de stress du réticulum endoplasmique, qui va à son tour entretenir l'altération de la fonction mitochondriale et de l'homéostasie calcique, mais aussi directement activer les voies JNK et IKK $\beta$  (Wellen & Hotamisligil, 2005; Gao *et al.*, 2010; Leem & Koh, 2012; Wang Chih-Hao *et al.*, 2015). Enfin, l'hypoxie du TA jouerait également un rôle dans la dysfonction mitochondriale par l'induction du facteur *hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$*  (HIF-1 $\alpha$ ), responsable d'une diminution de l'expression du PGC-1 $\alpha$  et d'une altération de la  $\beta$ -oxydation (Krishnan *et al.*, 2012).

L'insulinorésistance du TA, et plus particulièrement la diminution de l'expression membranaire des GLUT4, semble jouer un rôle central dans le développement de l'insulinorésistance des autres organes. Une étude réalisée par Abel et coll. en 2001 a ainsi démontré qu'une délétion ciblée de GLUT4 dans le TA induit l'apparition d'une insulinorésistance secondaire musculaire et hépatique (Abel *et al.*, 2001). De plus, le profil lipolytique du TA conduit à une augmentation des AGNE circulants, qui ont également été identifiés comme étant un élément à l'origine du développement de l'insulinorésistance systémique (Roden *et al.*, 1996; Cersosimo *et al.*, 2000; Kahn *et al.*, 2006). En effet, d'une augmentation de l'apport en AGNE peut résulter une accumulation de métabolites tels que le diacylglycérol (DAG), le *fatty acyl-coenzyme A* (FA-CoA), ou les céramides, capables de moduler l'activité des IRS-1 et 2 en stimulant leur phosphorylation (Kahn *et al.*, 2006).

Un autre élément majeur appuyant le rôle central du TA dans la progression de l'insulinorésistance des autres organes est le shift du profil sécrétoire des adipocytes. Outre l'élévation de la sécrétion des facteurs pro-inflammatoires (TNA- $\alpha$ , Il-6, *monocyte chemoattractant protein 1*,...) aux dépens des facteurs anti-inflammatoires (Il-10), une sécrétion accrue de la leptine et de la résistine associée à une diminution de la sécrétion d'adiponectine est observée (Kusminski *et al.*, 2016). La diminution de la sécrétion d'adiponectine serait due à la dysfonction mitochondriale et pourrait provoquer la baisse systémique de la sensibilité à l'insuline (Galic *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2013). Un autre rôle important de l'adiponectine dans l'homéostasie glucidique systémique est son inhibition par voie *adenosine monophosphate-activated protein kinase* (AMPK)-dépendante de la production de glucose hépatique (Combs *et al.*, 2001). Par ailleurs, l'adiponectine aurait des effets bénéfiques sur les phénomènes de lipotoxicité dans les cellules cardiaques, hépatiques et  $\beta$ -pancréatiques en induisant la déplétion en céramides (Holland *et al.*, 2011). *A contrario*, l'élévation de la sécrétion de la leptine ne s'accompagne pas de ses effets anorexigènes (satiété et stimulation de la dépense énergétique), car des mécanismes de résistance se mettent en place (Galic *et al.*, 2010). En revanche, la sécrétion de résistine a été associée au développement de l'insulinorésistance,



ainsi que de l'hypertension, de l'athérosclérose et de l'insuffisance cardiaque (Battiprolu *et al.*, 2010; Turer *et al.*, 2012).

Enfin, le dépassement des capacités de stockage et de remodelage des TA va entraîner l'apparition de dépôts adipeux ectopiques, notamment dans les muscles et le foie, qui vont perturber le métabolisme de ces organes et conduire au développement de leur insulino-résistance (Samuel & Shulman, 2016).

#### Le foie

Le foie est un acteur central dans la pathogenèse du diabète, en tant que principal producteur de glucose (Cersosimo *et al.*, 2000; Samuel & Shulman, 2016). L'un des principaux stimulants de la néoglucogenèse hépatique est l'élévation du taux d'AGNE circulants par la lipolyse du TA (Cersosimo *et al.*, 2000; Samuel & Shulman, 2016). En conditions physiologiques, l'inhibition de la néoglucogenèse hépatique par le pic insulinique postprandial est principalement le résultat de l'inhibition de cette lipolyse par l'insuline (Cersosimo *et al.*, 2000; Samuel & Shulman, 2016). Dans le T2DM, l'insulino-résistance du TA et le taux élevé en AGNE circulants se traduisent ainsi par la stimulation de la production de glucose, *via* une augmentation de l'activité des enzymes limitantes, la phosphoénolpyruvate carboxykinase et la glucose-6-phosphatase (Cersosimo *et al.*, 2000; Gastaldelli *et al.*, 2002, 2007). Par ailleurs, des études ont impliqué le développement de la stéatose hépatique dans la progression de l'insulino-résistance du foie et dans la persistance de sa production de glucose, qu'il provienne de la néoglucogenèse ou de la glycogénolyse (Ryysy *et al.*, 2000; Gastaldelli *et al.*, 2007; Jin *et al.*, 2015). Ces effets seraient le résultat de l'activation de la PKC $\epsilon$  par le DAG, l'un des intermédiaires lipidiques dont la formation est majorée par l'augmentation de l'apport et de l'oxydation des lipides (Samuel & Shulman, 2016). D'autre part, il est à rappeler que ces intermédiaires lipidiques sont capables d'inhiber l'activité des IRS-1 et 2 en stimulant leur phosphorylation et donc de contribuer au processus d'insulino-résistance (Kahn *et al.*, 2006). L'insulino-résistance du TA et du foie va ainsi contribuer au développement du T2DM par l'altération des mécanismes de régulation de la production de glucose hépatique.

#### Le muscle

En conditions physiologiques, le muscle est le principal capteur du glucose circulant en réponse au pic insulinique postprandial, en absorbant en moyenne 45% du glucose ingéré (Cersosimo *et al.*, 2000; DeFronzo & Tripathy, 2009; Samuel & Shulman, 2016). Le glucose absorbé en période postprandiale va permettre au muscle de synthétiser ses stocks de glycogène et l'altération de cette voie de synthèse, par la diminution de l'expression de la glycogène synthase, est l'un des premiers





mécanismes observés dans le développement de la résistance à l'insuline (Cersosimo *et al.*, 2000). À l'instar du TA et du foie, la voie de signalisation de l'insuline est fortement altérée par l'augmentation du taux d'AGNE circulants, qui entraîne la production d'intermédiaires lipidiques par la saturation du métabolisme mitochondrial (Koves *et al.*, 2008; Samuel & Shulman, 2016).

#### Les cellules $\beta$ pancréatiques

Si l'altération des mécanismes de régulation de la production de glucose hépatique et la diminution du captage musculaire du glucose associées à l'insulinorésistance sont des contributeurs majeurs au développement de l'intolérance au glucose, l'évolution du diabète repose sur la perte progressive de la capacité des cellules  $\beta$ -pancréatiques à compenser la perte de sensibilité à l'insuline de ces tissus par une sécrétion accrue de l'hormone (Kahn *et al.*, 2014; Halban *et al.*, 2014; Eguchi & Nagai, 2017). Différents mécanismes, menant dans un premier temps à la dysfonction de la cellule  $\beta$ , puis à son apoptose, ont été identifiés. Certains mécanismes, liés au stress métabolique, sont identiques à ceux qui peuvent être retrouvés dans d'autres types cellulaires : stress du réticulum endoplasmique, stress oxydant, lipo-/glucotoxicité et inflammation, notamment (Kahn *et al.*, 2014; Halban *et al.*, 2014; Eguchi & Nagai, 2017). En revanche, d'autres mécanismes sont plus spécifiques à ce type cellulaire. Un dépôt de plaques amyloïdes est ainsi caractéristiquement observé au niveau des îlots de Langerhans dans le T2DM et la synthèse du polypeptide amyloïde peut, au-delà d'un certain seuil, conduire à la formation d'oligomères pro-apoptotiques pouvant majorer l'inflammation locale par le recrutement de macrophages (Kahn *et al.*, 2014; Halban *et al.*, 2014). En outre, une désorganisation des îlots ainsi qu'une perte de leur intégrité sont observées et pourraient être à l'origine de perturbations dans la sécrétion de l'insuline, mais également du glucagon (Halban *et al.*, 2014). En effet, outre la dysfonction des cellules  $\beta$ , une altération des cellules  $\alpha$ , qui se manifeste par une sécrétion postprandiale accrue de glucagon, a également été rapportée (Kahn *et al.*, 2014). À terme, l'ensemble des altérations observées au niveau des îlots se traduit par l'apoptose des cellules  $\beta$  et donc par une perte de masse irréversible de ces cellules, qui ne se renouvellent plus passé l'âge de 30 ans, ce qui ne permet plus la sécrétion suffisante d'insuline (Kahn *et al.*, 2014; Halban *et al.*, 2014).

#### Autres facteurs

Si les principaux acteurs du développement du T2DM ont été décrits, d'autres organes jouent un rôle qui ne doit pas être négligé. L'intestin et le cerveau sont ainsi capables d'influer sur la fonction pancréatique. En effet, l'intestin produit le *glucagon-like peptide-1* (GLP-1), une incrétine permettant de stimuler la sécrétion d'insuline tout en inhibant la sécrétion de glucagon (Kahn *et al.*,



2014). Par ailleurs, le microbiote intestinal pourrait également jouer un rôle important, faisant de lui une cible prometteuse pour de nouvelles thérapies, bien que la recherche dans ce domaine n'en soit encore qu'à ses débuts (Brunkwall & Orho-Melander, 2017). Il a par exemple été montré que les effets de la metformine pourraient être médiés par le microbiote intestinal (Brunkwall & Orho-Melander, 2017). Enfin, le système nerveux est capable de réguler la production de glucose hépatique ainsi que la sécrétion des hormones pancréatiques, notamment *via* le nerf vague et l'hypothalamus (Kahn *et al.*, 2014).

### *e) Complications associées*

La complication majeure du diabète et la première cause de mortalité chez les patients T2DM est la cardiomyopathie diabétique (DMCM) (Rydén *et al.*, 2013). Cette cardiopathie spécifique, sujet central de ces travaux de thèse, sera plus amplement décrite dans la partie de cette revue de littérature lui étant consacrée.

Les altérations systémiques liées au diabète touchent tout particulièrement les systèmes neurologiques et vasculaires. La rétinopathie, la néphropathie et la neuropathie périphérique sont ainsi des complications classiquement retrouvées chez les patients T2DM.

#### 1. Rétinopathie diabétique

La rétinopathie diabétique touche environ 29% des patients diabétiques et représente ainsi la première cause de malvoyance et de cécité au sein de la population active des pays développés (Zhang *et al.*, 2010; Heng *et al.*, 2013; American Diabetes Association, 2017). Cette pathologie, qui reflète la durée du diabète et le niveau de contrôle de la glycémie et de la pression artérielle (PA), se caractérise par une altération progressive de la microvasculature rétinienne. L'évolution de la dégénérescence est ainsi classée en 5 stades (Wilkinson *et al.*, 2003):

- Absence de rétinopathie
- Rétinopathie non-proliférative légère : micro-anévrismes
- Rétinopathie non-proliférative modérée : micro-anévrismes / quelques hémorragies intra-rétiniennes / ischémie rétinienne modérée
- Rétinopathie non-proliférative sévère : micro-anévrismes / >20 hémorragies intra-rétiniennes / ischémie rétinienne sévère sans néovascularisation
- Rétinopathie proliférative : néovascularisation / hémorragies pré-rétiniennes et intra-vitréennes



En parallèle, un œdème maculaire peut également apparaître. Cette complication est la première cause de perte de vision chez les patients atteints de rétinopathie diabétique (Heng *et al.*, 2013; Hendrick *et al.*, 2015).

La gestion de la rétinopathie diabétique repose principalement sur le contrôle de la glycémie et de la PA. En cas d'atteinte au stade prolifératif ou d'œdème maculaire, une thérapie au laser est employée dans la plupart des cas. Plus rarement, des composés anti-vascular endothelial growth factor (VEGF, un facteur pro-angiogénique) peuvent être prescrits (Heng *et al.*, 2013; Hendrick *et al.*, 2015; American Diabetes Association, 2017).

## 2. Néphropathie diabétique

La néphropathie diabétique est la première cause d'insuffisance rénale en phase terminale (Zelmanovitz *et al.*, 2009; Haneda *et al.*, 2014; Nazar, 2014; Satirapoj & Adler, 2015; American Diabetes Association, 2017). Cette pathologie se développe en réponse aux altérations métaboliques et hémodynamiques secondaires au diabète, dont notamment l'activation du système rénine-angiotensine (RAS), et se caractérise dans un premier temps par une augmentation de la filtration glomérulaire, qui s'altère par la suite, ainsi que par une augmentation progressive de l'excrétion d'albumine et de la PA (Zelmanovitz *et al.*, 2009; Haneda *et al.*, 2014; Satirapoj & Adler, 2015). Les différents stades de progression de la néphropathie diabétique sont décrits figure 6.

	Designation	Characteristics	GFR	AER	BP
Stage 1	Hyperfunction	Glomerular hyperfiltration	Increased	May be increased	Normal
Stage 2	Silent stage	Thickened basement membrane Mesangium expansion	Normal	<30 mg/24 h or g/mg creatinine	Normal
Stage 3	Incipient	Microalbuminuria	GFR begins to fall	30–300 mg/24 h or g/mg creatinine	High
Stage 4	Overt DN	Macroalbuminuria	<60 ml/min/1.73 m <sup>2</sup>	>300 mg/24 h or g/mg creatinine	High
Stage 5	Advanced nephropathy	ESRD	0–15 ml/min/1.73 m <sup>2</sup>	Decreasing	High

**Figure 6. Les différents stades de progression de la néphropathie diabétique.** GFR: glomerular filtration rate; AER: albumin excretion rate; BP: blood pressure (Satirapoj & Adler, 2015).

La prévention, tout comme le traitement de cette complication, reposent sur le contrôle de la glycémie, de la PA et de la lipémie (Zelmanovitz *et al.*, 2009; Satirapoj & Adler, 2015; American Diabetes Association, 2017).

## 3. Neuropathie diabétique

La neuropathie diabétique affecte plus de 50% des patients diabétiques et peut se manifester de façons diverses par des douleurs, des altérations fonctionnelles de certains organes, une réduction de la mobilité et peut conduire à l'amputation (Edwards *et al.*, 2008; Russell & Zilliox, 2014; Schreiber *et al.*, 2015; American Diabetes Association, 2017). Les mécanismes sous-jacents à la



dégradation des fibres nerveuses somatiques et autonomes sont encore aujourd'hui assez méconnus, cependant l'hyperglycémie et les altérations microvasculaires sont clairement mis en cause (Edwards *et al.*, 2008; Schreiber *et al.*, 2015). Forme la plus fréquente de neuropathie diabétique (50% des patients diabétiques en sont touchés), la polyneuropathie symétrique distale se caractérise par une perte progressive des sensations au niveau des extrémités (pieds, mains, comme illustré figure 7), pouvant s'accompagner de douleurs (Edwards *et al.*, 2008; Russell & Zilliox, 2014; American Diabetes Association, 2017). Moins répandue, la neuropathie diabétique autonome est une pathologie diffuse responsable de divers troubles gastro-intestinaux, cardiovasculaires, génitaux, pupillaires et de la sudation (Edwards *et al.*, 2008; Russell & Zilliox, 2014; American Diabetes Association, 2017). Enfin, les neuropathies focales (mononeuropathies et neuropathie crâniale) ou asymétriques proximales sont des formes plus rares de neuropathie diabétique (Edwards *et al.*, 2008; Russell & Zilliox, 2014).

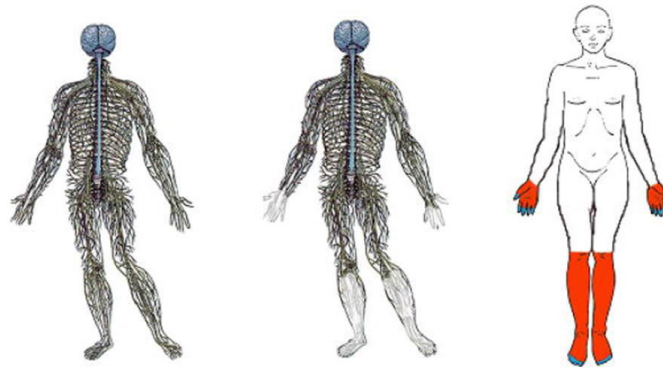


Figure 7. Zones atteintes par la polyneuropathie périphérique distale (Bansal *et al.*, 2006).

Le contrôle strict de la glycémie reste à ce jour le seul traitement étiologique de la neuropathie diabétique. En cas de douleurs, il peut être associé à des traitements symptomatiques (antidépresseurs notamment) (Edwards *et al.*, 2008; Russell & Zilliox, 2014; Schreiber *et al.*, 2015; American Diabetes Association, 2017).

## *f) Approches thérapeutiques*

### 1. Objectif

Les différentes thérapies actuellement utilisées dans le cadre du T2DM ne sont pas curatives. L'objectif principal recherché chez les patients T2DM est le contrôle de la glycémie, clé de voûte de la maîtrise du développement des complications responsables de la morbi-mortalité dans cette population (Rydén *et al.*, 2013; American Diabetes Association, 2017). Ce contrôle de la glycémie est reflété par le taux d'HbA1c, qui doit être dosé trimestriellement (Haute Autorité de Santé, 2013a;

American Diabetes Association, 2017; Darmon *et al.*, 2017). L'objectif généralement conseillé par les sociétés savantes est de stabiliser un taux d'HbA1c <7%, synonyme d'un contrôle satisfaisant de la glycémie chez les patients T2DM (Haute Autorité de Santé, 2013a; Rydén *et al.*, 2013; Inzucchi *et al.*, 2015; International Diabetes Federation, 2017a; American Diabetes Association, 2017; Darmon *et al.*, 2017). Cependant, cet objectif doit être individualisé en fonction du profil de chaque patient (figure 8). Chez un patient nouvellement diagnostiqué et ayant une longue espérance de vie un objectif plus restrictif,  $\leq 6,5\%$ , pourra être envisagé ; alors que chez un patient avec une espérance de vie plus limitée, un diabète avancé ou des comorbidités, une cible  $\leq 8\%$ , voire <9% pour une personne âgée souffrant de polyopathie chronique, sera préconisée (Haute Autorité de Santé, 2013a; Rydén *et al.*, 2013; Inzucchi *et al.*, 2015; American Diabetes Association, 2017; Darmon *et al.*, 2017).

## Objectifs du taux d'hémoglobine glyquée selon le profil du patient

Le dosage de l'hémoglobine glyquée (HbA1c) doit être réalisé 4 fois par an.

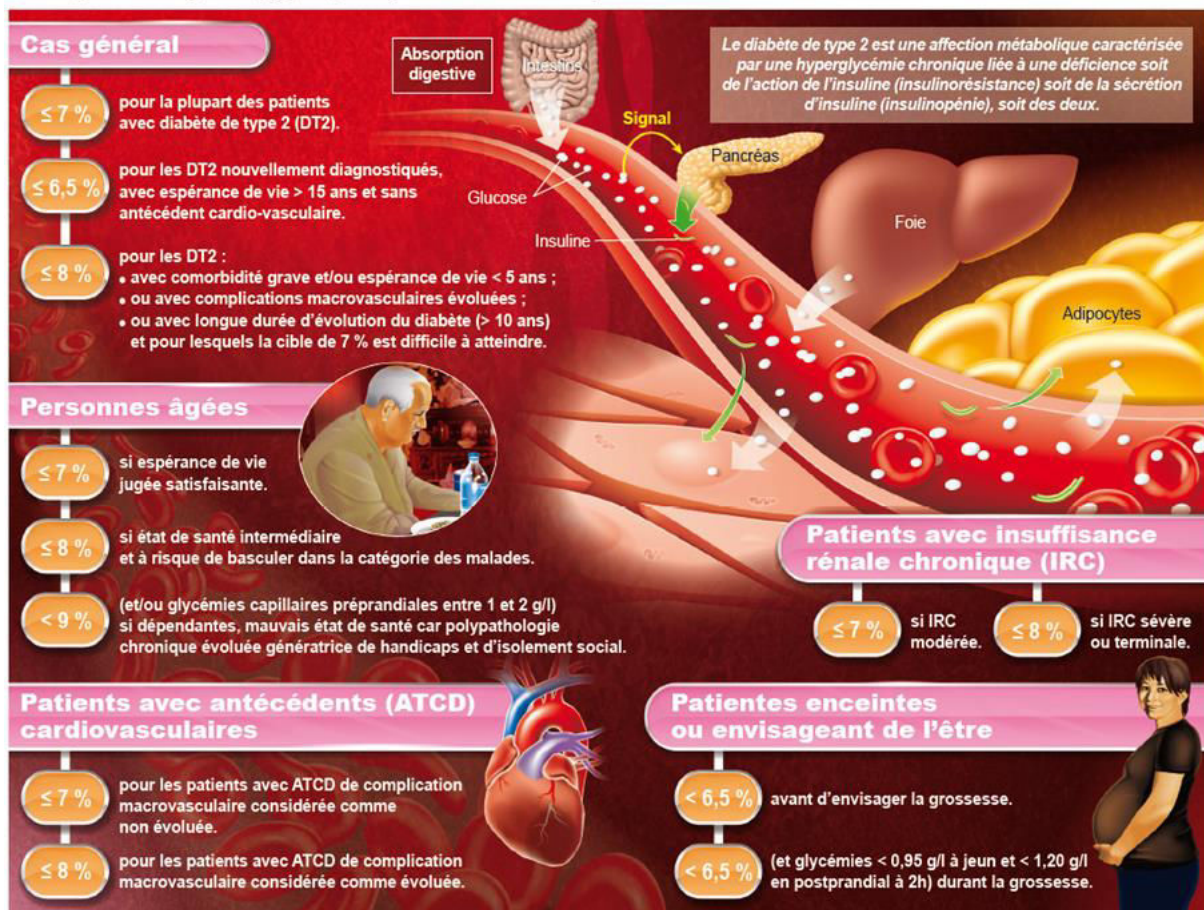


Figure 8. Ajustement du taux d'HbA1c cible en fonction du profil du patient (Haute Autorité de Santé, 2013).

Afin d'atteindre le taux d'HbA1c ciblé, différentes stratégies, hygiéno-diététiques et médicamenteuses, sont utilisées.



## 2. Stratégies Hygiéno-diététiques

Les stratégies hygiéno-diététiques visent à la modification du style de vie du patient : exercice physique, alimentation équilibrée et arrêt du tabagisme sont les trois piliers sur lesquels elles reposent. Avec l'éducation thérapeutique, ces mesures sont le préalable nécessaire à toute intervention médicamenteuse dans la prévention et la gestion du T2DM (Haute Autorité de Santé, 2013a; American Diabetes Association, 2017; Darmon *et al.*, 2017). Chez le patient nouvellement diagnostiqué, la Société Francophone du Diabète recommande ainsi la mise en place d'un programme thérapeutique de modification du mode de vie pendant 3 à 6 mois avant toute prescription médicamenteuse, sauf en cas de déséquilibre glycémique important (HbA1c >9%) (Darmon *et al.*, 2017).

La majorité des patients T2DM présentant un surpoids ou une obésité (selon l'étude ENTRED, l'indice de masse corporelle (IMC) moyen du diabétique en France est de 29,5kg/m<sup>2</sup> (Haute Autorité de Santé, 2013b)), un des objectifs majeurs de l'intervention hygiéno-diététique est donc la perte de poids. Il a en effet été montré qu'une perte de poids de ≥5% permet un meilleur contrôle glycémique et la réduction des besoins en médicaments antidiabétiques, une perte de poids ≥7% étant optimale (American Diabetes Association, 2017). Cette perte de poids va également avoir des effets bénéfiques sur la lipémie, la PA et les autres facteurs de risque cardiovasculaire (Rydén *et al.*, 2013; American Diabetes Association, 2017).

### Mesures diététiques

Différents types de régime peuvent être adaptés en fonction du profil du patient. Quel que soit le type de régime mis en place, l'*American Diabetes Association* recommande qu'il apporte entre 1 200 et 1 500 kcal/jour pour une femme et entre 1 500 et 1 800 kcal/jour pour un homme, selon le poids initial du patient (American Diabetes Association, 2017). Des recommandations ont également été émises par l'*American Diabetes Association* et l'*European Society of Cardiology* (ESC), en collaboration avec l'*European Association For The Study Of Diabetes*, concernant les apports en macronutriments (Rydén *et al.*, 2013; American Diabetes Association, 2017):

- **Glucides** : les apports conseillés en glucides sont de 45% à 60% des apports énergétiques. Les sources de glucides et leur consommation doivent favoriser au maximum le contrôle de la glycémie, les aliments à faible index glycémique et riches en fibres étant à privilégier, un apport en fibres >40g/jour étant conseillé. Le régime alimentaire doit donc être enrichi en céréales complètes, fruits et légumes, au détriment des produits ultra-transformés, riches en sucres ajoutés.



- **Lipides** : l'apport en lipides totaux ne doit pas dépasser 35% des apports énergétiques, un apport <30% étant conseillé pour la perte de poids. Veiller à la qualité des apports en lipides revêt également son importance : les acides gras (AG) mono-insaturés doivent représenter la première source de lipides, contrairement aux AG *trans*, qui doivent être évités et représenter au maximum 1% des apports. Les AG saturés et polyinsaturés peuvent représenter <10% des apports énergétiques chacun. Enfin, les apports en cholestérol doivent être inférieurs à 300mg/jour.
- **Protéines** : les apports protéiques recommandés chez les patients T2DM sont les mêmes que dans la population générale, soit 10% à 20% des apports énergétiques (1-1,5g/kg pc/jour). En cas de néphropathie, les apports pourront être réduits.

Ces mêmes agences ont également émis des recommandations concernant certaines habitudes alimentaires (Rydén *et al.*, 2013; American Diabetes Association, 2017) :

- **Sodium** : la consommation de sodium ne doit pas excéder 2 300mg/jour. Ce seuil pourra être revu à la baisse dans certains cas, notamment chez un patient hypertendu ;
- **Micronutriments** : la supplémentation en vitamines et autres micronutriments n'est à ce jour pas conseillée en l'absence de carence, les données issues des études scientifiques étant insuffisantes ou peu concluantes ;
- **Alcool** : la consommation modérée d'alcool, ne dépassant pas 2 verres/jour (20g) chez l'homme ou 1 verre/jour (10g) chez la femme, n'est pas délétère chez le patient T2DM et serait même associée à une diminution du risque cardiovasculaire.

#### Activité physique

Les bienfaits de l'activité physique chez le patient diabétique sont largement reconnus. Différentes études ont montré, entre autres, une amélioration du contrôle glycémique (baisse moyenne de 0,6% de l'HbA1c), de la lipémie, une baisse de la PA et du risque cardiovasculaire, mais également une meilleure préservation de la mobilité chez les T2DM obèses consécutivement à un programme d'activités physiques (Rydén *et al.*, 2013; American Diabetes Association, 2017). Ces effets peuvent être obtenus aussi bien avec des entraînements reposant sur des exercices de résistance (musclature au poids du corps ou avec des charges) ou aérobies, un programme proposant une combinaison des deux types étant conseillé. Actuellement, il est ainsi recommandé aux patients de pratiquer au moins 150 min d'activité physique modérée à intense par semaine, réparties sur 3 jours minimum, sans laisser plus de 2 jours consécutifs sans activité et comprenant 2



sessions d'entraînement en résistance (Rydén *et al.*, 2013; American Diabetes Association, 2017). Le programme d'entraînement sera cependant adapté en fonction du profil du patient. De plus, il est fortement conseillé de rompre les périodes de sédentarité toutes les 30 min par une activité brève et peu intense (American Diabetes Association, 2017).

### Tabagisme

Les effets délétères du tabagisme sur la santé sont largement décrits. Dans le cadre du diabète, il a été montré une association entre le tabagisme et le risque de développer du T2DM, mais également des complications microvasculaires (Rydén *et al.*, 2013; American Diabetes Association, 2017). L'arrêt du tabac (ainsi que de la cigarette électronique) doit donc faire partie intégrante du programme thérapeutique chez le patient diabétique (Rydén *et al.*, 2013; American Diabetes Association, 2017).

### 3. Stratégies médicamenteuses

En cas d'échec ou d'insuffisance des mesures hygiéno-diététiques ou de déséquilibre glycémique important, un traitement médicamenteux est mis en place. Ce traitement a pour objectif d'améliorer le contrôle glycémique du patient par la modulation de la production hépatique ou de l'absorption du glucose, la stimulation de la sécrétion d'insuline ou de la sensibilité à l'insuline ou bien encore la régulation de la sécrétion de glucagon (Inzucchi *et al.*, 2015; American Diabetes Association, 2017).

Sauf contre-indications, la molécule préconisée en monothérapie en première intention est la metformine, un biguanide permettant de diminuer la production de glucose hépatique et d'améliorer la sensibilité à l'insuline (Haute Autorité de Santé, 2013a; Inzucchi *et al.*, 2015; American Diabetes Association, 2017; Darmon *et al.*, 2017). Ce traitement présente plusieurs avantages : il est sûr, peu coûteux, ne provoque pas de prise de poids et permettrait de diminuer le risque cardiovasculaire (Inzucchi *et al.*, 2015; American Diabetes Association, 2017; Darmon *et al.*, 2017). Ce traitement est ainsi le plus couramment utilisé chez les patients T2DM en France : en 2010, 26,46% des patients suivaient cette médication selon la base de données *Longitudinal Patient Data - Cegedim Strategic Data* (Haute Autorité de Santé, 2013b). Si le déséquilibre glycémique est important (HbA1c >9%) ou majeur (HbA1c >10%), une bithérapie ou une insulinothérapie, respectivement, pourront être immédiatement mises en œuvre (Haute Autorité de Santé, 2013a; Darmon *et al.*, 2017).

En cas d'échec d'atteinte du taux d'HbA1c cible sous 3 mois en monothérapie à la dose maximale de metformine, une bithérapie est mise en place (Haute Autorité de Santé, 2013a;



American Diabetes Association, 2017; Darmon *et al.*, 2017). Différentes classes de molécules peuvent alors être associées à la metformine, notamment les sulfamides, cette bithérapie étant la plus couramment prescrite en 2010 (11% des patients) (Haute Autorité de Santé, 2013a, 2013b; American Diabetes Association, 2017; Darmon *et al.*, 2017). Cependant, en raison du risque d'hypoglycémie et de la prise de poids associés à la prise de sulfamides, la Société Francophone du Diabète (SFD) recommande aujourd'hui l'association metformine + inhibiteur de la dipeptidyl peptidase 4 (iDPP-4) en première intention (Darmon *et al.*, 2017). Néanmoins, différentes combinaisons peuvent être envisagées en fonction du profil du patient et du coût du traitement. À titre d'exemple, chez un patient présentant un IMC  $\geq 30\text{kg/m}^2$ , une combinaison metformine + analogue des récepteurs GLP-1 peut être privilégiée pour ses effets positifs sur la perte de poids, malgré le coût élevé des analogues GLP-1 (Haute Autorité de Santé, 2013a; Darmon *et al.*, 2017).









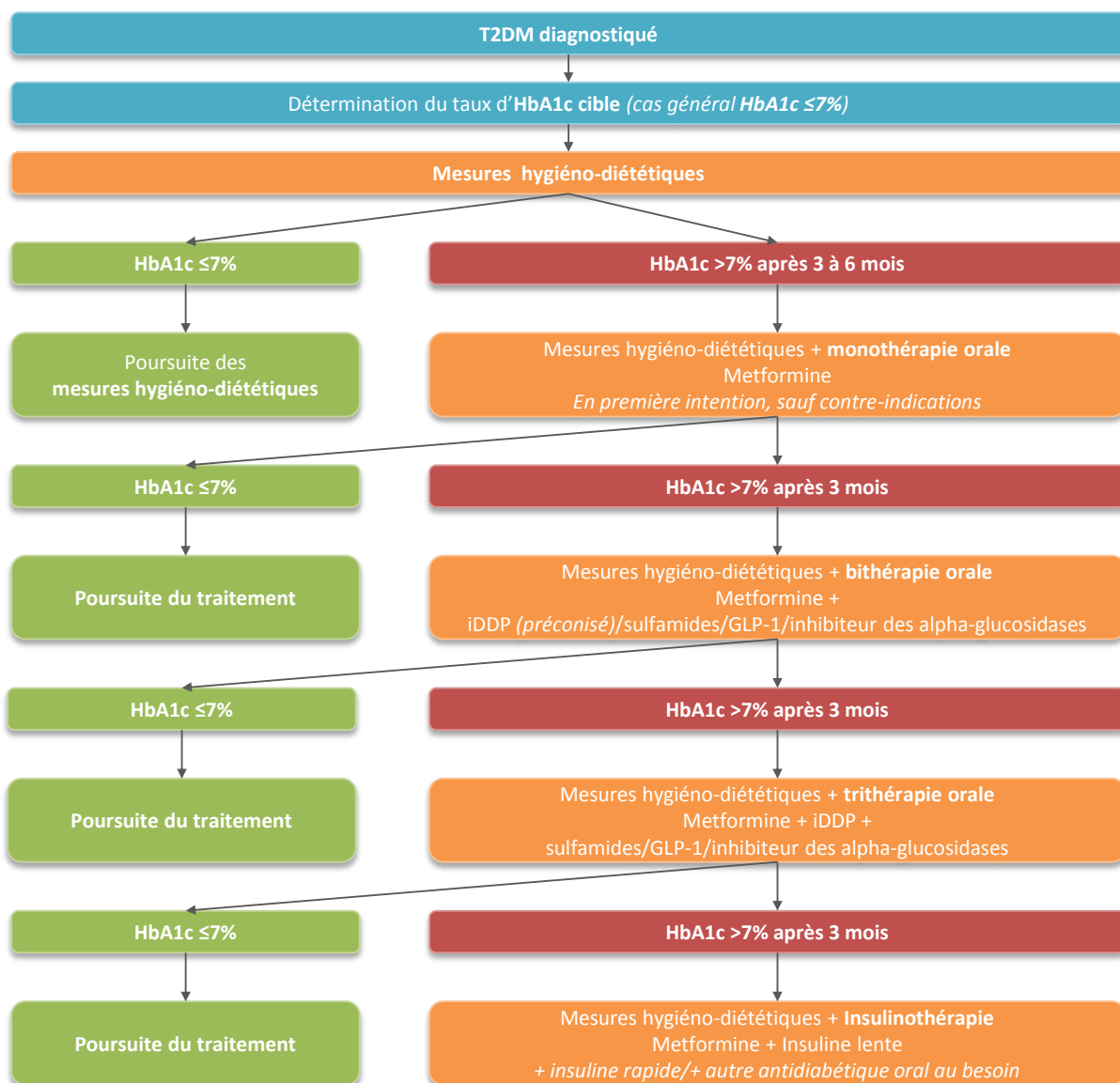
	 Efficacité sur la baisse de la glycémie	 Effet sur le poids	 Risque d'hypoglycémie	 Modalité d'administration	 Auto-surveillance glycémique	 Effets secondaires	 Bénéfices cardio-vasculaires (CV) mortalité patients en prévention CV secondaire	 Recul
<b>Metformine</b>	☆☆	↔ (ou ↓ modeste)	Non	2 à 3 prises/jour	Pas indispensable	Digestifs	Sécurité démontrée	50 ans
<b>Sulfamides et glinides</b>	☆☆	↑	Oui +	1 à 4 prises/jour	Pour dépister les hypoglycémies	Hypoglycémies, prise de poids	Sécurité non démontrée (absence d'études)	20 à 50 ans
<b>Inhibiteurs des alpha-glucosidases</b>	☆	↔	Non	3 à 4 prises/jour	Pas indispensable	Digestifs	Étude en cours	+ 20 ans
<b>Gliptines inhibiteurs de DPP-4</b>	☆☆	↔	Non	1 à 2 prises/jour	Pas indispensable	-	Sécurité démontrée (particulièrement pour la sitagliptine)	+ 10 ans
<b>Agonistes du récepteur du GLP1</b>	☆☆☆	↓↓	Non	1/jour à 1/semaine	Pas indispensable	Digestifs	Bénéfices démontrés pour le liraglutide	3 à 10 ans
<b>Analogues lents de l'insuline</b>	☆☆☆☆	↑↑	Oui ++	1/jour	1 à 2/jour	Hypoglycémies, prise de poids	Sécurité démontrée pour la glargine	4 à 17 ans

Figure 9. Tableau récapitulatif des différentes classes d'antidiabétiques et de leurs caractéristiques (Darmon *et al.*, 2017).  
DPP-4 : dipeptidyl peptidase-4 ; GLP-1 : glucagon-like peptide-1.

Enfin, en cas d'échec de la bithérapie, une troisième classe d'antidiabétique pourra être introduite dans le traitement (Haute Autorité de Santé, 2013a; American Diabetes Association, 2017; Darmon *et al.*, 2017). Si cette trithérapie n'est pas suffisante, l'insulinothérapie basale sera envisagée, en co-décision avec le patient, qui devra alors suivre une éducation thérapeutique et

procéder à l'auto-surveillance de sa glycémie au quotidien (Haute Autorité de Santé, 2013a; American Diabetes Association, 2017; Darmon *et al.*, 2017). Un analogue lent de l'insuline sera prescrit dans un premier temps, complété au besoin d'un analogue rapide au moment des repas (Haute Autorité de Santé, 2013a; Inzucchi *et al.*, 2015; Darmon *et al.*, 2017). À la mise en place de l'insulinothérapie, il est recommandé de conserver le traitement à la metformine seul (Haute Autorité de Santé, 2013a; Inzucchi *et al.*, 2015; Darmon *et al.*, 2017). Au besoin, les autres antidiabétiques pourront être réintroduits par la suite (Haute Autorité de Santé, 2013a; Inzucchi *et al.*, 2015; Darmon *et al.*, 2017).



**Figure 10. Résumé schématique de la stratégie thérapeutique dans le diabète de type 2 (d'après les recommandations de Haute Autorité de Santé, 2013a; American Diabetes Association, 2017; Darmon *et al.*, 2017).** GLP-1 : analogues du glucagon-like peptide-1 ; HbA1c : hémoglobine glyquée ; iDPP-4 : inhibiteurs de la dipeptidyl peptidase-4 ; T2DM : diabète de type 2.



## 2- La cardiomyopathie diabétique

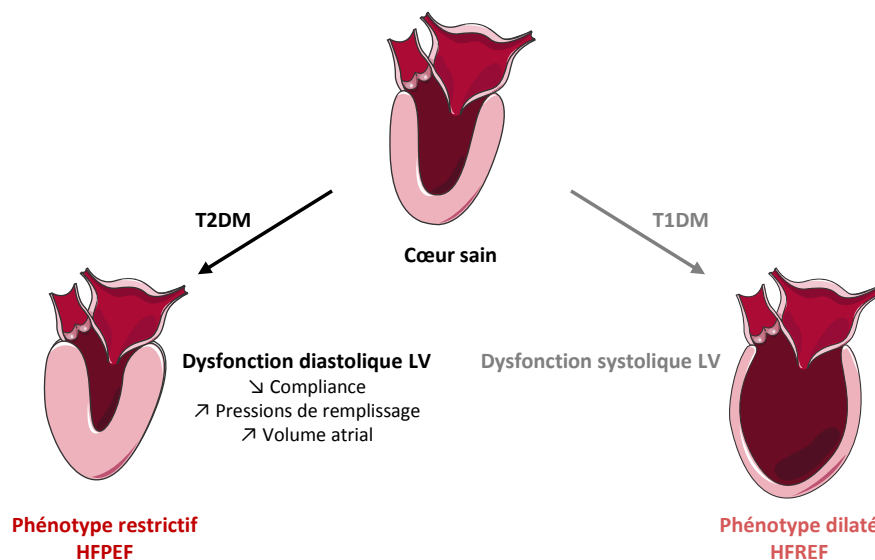
### a) Définition générale

Le lien étroit entre T2DM et risque cardiovasculaire a été établi par de nombreuses études. La Framingham Heart Study a ainsi mis en évidence dès 1974 une multiplication par 2 du risque relatif d'insuffisance cardiaque chez l'homme et par 5 chez la femme présentant un T2DM (Kannel *et al.*, 1974). Globalement, les études menées ont rapporté une prévalence de l'insuffisance cardiaque entre 10% et 30% chez le patient T2DM (Seferović *et al.*, 2018). Par ailleurs, une augmentation de l'HbA1c de 1% est associée à une augmentation de 8% du risque d'insuffisance cardiaque, quand à l'inverse une diminution de l'HbA1c de 1% est associée à une diminution de ce risque de 16% (Stratton *et al.*, 2000; Iribarren *et al.*, 2001). Le concept de l'existence d'une cardiomyopathie (selon la définition de l'*European Society Of Cardiology*, Elliott *et al.*, 2008) spécifique au diabète, a pour la première fois été évoqué en 1972 par Rubler *et coll.*, à partir d'examen post-mortem pratiqués chez 27 patients diabétiques décédés d'une insuffisance cardiaque, dont 4 présentaient, en l'absence de complications (hypertension, coronaropathie), une cardiomégalie ainsi qu'une insuffisance cardiaque idiopathiques (Rubler *et al.*, 1972). Depuis, de nombreuses études ont permis de caractériser cette pathologie et de préciser son diagnostic.

La DMCM est ainsi aujourd'hui définie par le développement, indépendamment de l'existence d'une hypertension, d'une coronaropathie, d'une valvulopathie ou d'une cardiopathie congénitale, d'altérations structurelles et fonctionnelles du muscle, de l'innervation et de la vascularisation cardiaques chez le sujet diabétique. Deux phénotypes cliniques, résultant de mécanismes pathophysiologiques distincts, peuvent être décrits (figure 11) (Seferović & Paulus, 2015). Le premier phénotype, majoritairement rencontré chez les T1DM âgés, évolue vers une cardiomyopathie dilatée avec insuffisance cardiaque à fraction d'éjection (FE) réduite (HF<sub>r</sub>EF) (FE<40%) (Elliott *et al.*, 2008; Seferović & Paulus, 2015; Ponikowski *et al.*, 2016). Dans ce premier cas, l'auto-immunité semble jouer un rôle majeur, outre le dépôt d'AGE et la raréfaction capillaire qui interviennent également dans la physiopathologie du deuxième phénotype (plus amplement décrite paragraphe I-2-b) (Rydén *et al.*, 2013; Seferović & Paulus, 2015). Ce dernier, plus typique des patients T2DM chez qui il présente une prévalence d'environ 50%, évolue vers une cardiomyopathie restrictive avec insuffisance cardiaque à FE préservée (HF<sub>p</sub>EF) (FE>54% chez la femme et FE>52% chez l'homme) (Elliott *et al.*, 2008; Rydén *et al.*, 2013; Lang *et al.*, 2015a; Seferović & Paulus, 2015; Seferović *et al.*, 2018). Le myocarde présente une hypertrophie de type concentrique, associée à une augmentation de sa rigidité et à une compliance réduite (Rydén *et al.*, 2013; Seferović & Paulus,



2015). Du point de vue fonctionnel, la dysfonction diastolique globale est la caractéristique prépondérante de la DMCM (Rydén *et al.*, 2013; Seferović & Paulus, 2015). La prévalence évoquée de cette dysfonction est cependant très variable selon les études, notamment en raison des populations considérées et des différents critères de diagnostic utilisés. Une récente méta-analyse a ainsi rapporté une prévalence globale de 46%, avec une étendue des prévalences rapportées allant de 20% à 81% dans les études sélectionnées (Chillo *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2014; Bouthoorn *et al.*, 2018). La progression de la dysfonction diastolique est associée à l'augmentation des pressions de remplissage du ventricule gauche (VG) et à une importance accrue du remplissage actif atrial, provoquant la dilatation de l'oreillette gauche (*Left Atrium*, LA) (Rydén *et al.*, 2013; Seferović & Paulus, 2015; Jia *et al.*, 2016). Les critères diagnostics de la DMCM seront plus amplement décrits dans la section II de cette revue.



**Figure 11. Caractéristiques générales de la cardiomyopathie diabétique.** HFpEF : insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée ; HFrEF : insuffisance cardiaque à fraction d'éjection réduite ; T1DM : diabète de type 1 ; T2DM : diabète de type 2.

### b) Physiopathologie

La physiopathologie de la DMCM est complexe et multifactorielle et se met en place dès l'apparition du T2DM. Elle fait intervenir des altérations structurelles et fonctionnelles progressives de trois composantes majeures : le muscle, la vascularisation et le système neurohumoral cardiaques. Si de nombreux mécanismes ont été identifiés, la chronologie de leur apparition et leurs liens de causalité restent à clarifier. Par ailleurs, de nouveaux acteurs, comme les miR, suscitent un intérêt grandissant de par leur potentiel en tant que marqueurs et cibles thérapeutiques. Si leur rôle et leurs mécanismes d'action demandent encore à être précisés, une poignée d'entre eux ont d'ores



et déjà été associés à des processus du développement de la DMCM (Westermeier *et al.*, 2016; Chistiakov *et al.*, 2016; Blumensatt *et al.*, 2017). Enfin, des altérations du TA épiqueardique (TAE) vont également venir s'immiscer dans les processus développementaux de la DMCM, ce TA étant au contact direct des myocytes et des coronaires.

## 1. Altérations du muscle cardiaque

### Altération du métabolisme cardiomyocytaire

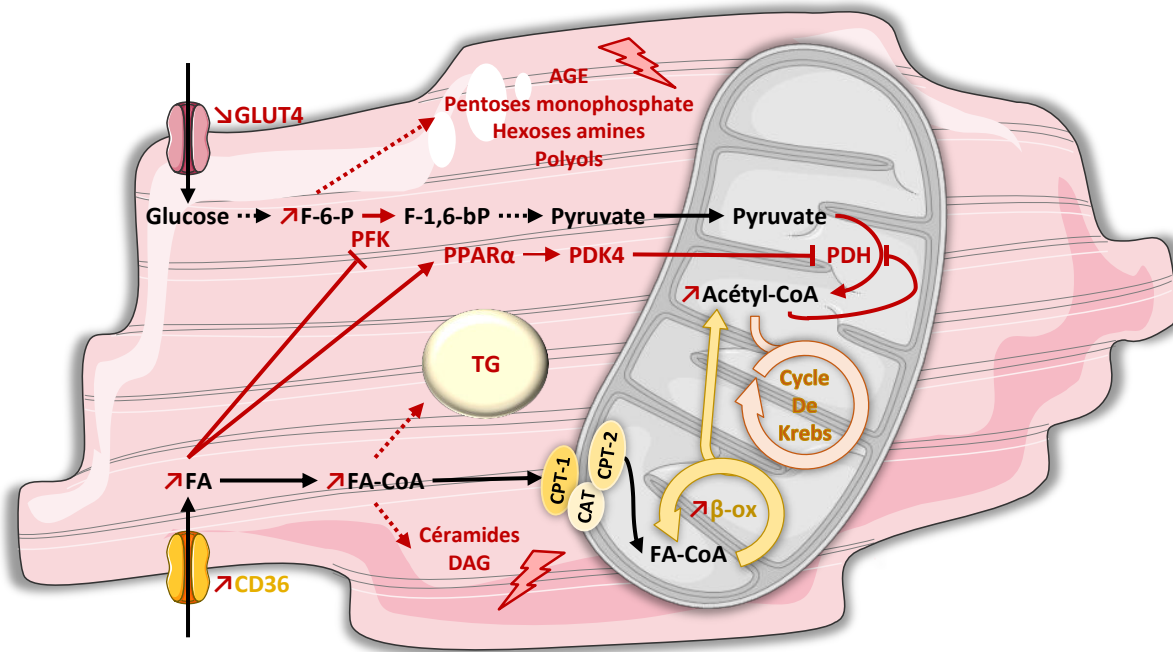
Le métabolisme cardiaque a pour principale caractéristique sa grande flexibilité dans l'utilisation des substrats. Si 60% à 90% des 6kg d'ATP produits quotidiennement par le cœur humain adulte sont issus de l'oxydation des AG à longue chaîne, le reste étant synthétisé à partir du glucose, du lactate, des corps cétoniques voire des acides aminés, le cœur a la capacité de faire fortement varier ce pourcentage en fonction de la disponibilité de ces différents substrats et des conditions patho-/physiologiques (Augustus *et al.*, 2003; Kolwicz *et al.*, 2013; Pascual & Coleman, 2016). On notera ainsi par exemple une utilisation accrue des lactates à l'exercice, des corps cétoniques hépatiques en conditions de jeûne, des acides aminés en cas de dénutrition majeure et du glucose (réversion vers le phénotype fœtal) dans diverses conditions pathologiques (ischémie, hypertension, insuffisance cardiaque...) (Kolwicz *et al.*, 2013; Pascual & Coleman, 2016). En conditions physiologiques, l'utilisation du glucose sera privilégiée en conditions d'hyperglycémie et d'hyperinsulinémie postprandiales (Pascual & Coleman, 2016). Ces capacités d'adaptation font intervenir des mécanismes de régulation post-traductionnelle et transcriptionnelle des différents acteurs des voies métaboliques mitochondriales. Le coactivateur PGC-1 $\alpha$  et son antagoniste le corépresseur *nuclear receptor corepressor 1* (NCoR1) en sont les coordinateurs majeurs, *via* leur action régulatrice de multiples facteurs de transcription nucléaires et mitochondriaux, dont les *peroxisome proliferator activated receptors* (PPARs), le *cAMP-activated transcription factor* et les *estrogen-related receptors* (ERRs) (Patten & Arany, 2012; Pérez-Schindler *et al.*, 2012; Kolwicz *et al.*, 2013; Fan & Evans, 2015; Lima *et al.*, 2018). En conditions de stress, comme dans le cas d'une hypoxie ou d'une ischémie, d'autres facteurs, comme HIF-1 $\alpha$ , peuvent intervenir (Kolwicz *et al.*, 2013). Les substrats énergétiques eux-mêmes peuvent orienter le métabolisme : les AG ont ainsi une action inhibitrice sur l'oxydation des glucides et plus particulièrement sur deux enzymes limitantes de cette voie métabolique : la phosphofructokinase, qui convertit le fructose-6-phosphate en fructose-1,6-bisphosphate, et la pyruvate déshydrogénase, qui catalyse la conversion du pyruvate en acétyl-CoA (Kosmala *et al.*, 2017; Singh *et al.*, 2017). Le glucose pourrait quant à lui réguler le métabolisme des AG par une augmentation des niveaux intracellulaires en malonyl-CoA (Singh *et al.*, 2017).



Les AG importés par le cardiomyocyte ont deux origines : en conditions de jeûne, la cellule capte les AG relargués par les tissus adipeux et liés à l'albumine, en conditions post-/interprandiales en revanche, c'est la lyse des chylomicrons et lipoprotéines de très faible densité par la lipoprotéine lipase des capillaires sanguins qui fournit la majeure partie du substrat lipidique (Augustus *et al.*, 2003; Pascual & Coleman, 2016). L'entrée des lipides dans le cardiomyocyte puis leur transport intracellulaire se fait *via* des transporteurs spécifiques (on notera toutefois qu'environ 20% des lipides sont absorbés par diffusion libre à travers la membrane sarcolemmale) (Mandavia *et al.*, 2013). Quatre types ont à ce jour été identifiés : la translocase CD36 et la protéine de liaison FABPpm, les deux transporteurs de la membrane plasmique, et les deux protéines de transport FATP1 et FATP6 (Pascual & Coleman, 2016). Au niveau mitochondrial, la carnitine palmitoyl transférase (CPT-1) est l'enzyme limitante de l'import et de l'oxydation des AG (Kolwicz *et al.*, 2013; Pascual & Coleman, 2016). Le glucose est quant à lui importé par GLUT1 et GLUT4. Lors du pic insulinique postprandial, CD36 et GLUT4 sont transloqués au sarcolemme afin d'augmenter les capacités d'import des substrats énergétiques (Jia *et al.*, 2016; Pascual & Coleman, 2016). De même, la contraction de la cellule cardiaque est capable d'induire une translocation de ces transporteurs par voie AMPK-dépendante (Jia *et al.*, 2016; Pascual & Coleman, 2016).

Chez le patient T2DM, le développement de l'insulinorésistance cardiaque induit une translocation différentielle de GLUT4 et CD36 : CD36 est transloqué à la membrane sarcolemmale, quand GLUT4 est internalisé (Battiprolu *et al.*, 2013; Mandavia *et al.*, 2013; Bugger & Abel, 2014; Jia *et al.*, 2016). Il en résulte un import et une utilisation des AG supérieure à la normale par le cardiomyocyte ; ce processus étant amplifié, d'une part, par la forte disponibilité en AGNE et TG circulants, sécrétés par le foie et les adipocytes, et, d'autre part, par l'activation accrue de PPAR $\alpha$  qui favorise l'expression des transporteurs des lipides, dont notamment la carnitine palmitoyl transférase et CD36 (Lewis *et al.*, 2002; Mandavia *et al.*, 2013; Bugger & Abel, 2014; Seferović & Paulus, 2015; Jia *et al.*, 2016; Mishra *et al.*, 2017; Singh *et al.*, 2017; Joubert *et al.*, 2018). Ce phénomène sature les capacités oxydatives de la cellule et va mener à la dysfonction mitochondriale, à l'accumulation de TG intracellulaires, à la gluco-/lipotoxicité, à la production de ROS, à la dysfonction du cardiomyocyte et ultimement à sa mort (Battiprolu *et al.*, 2010; Seferović & Paulus, 2015; Jia *et al.*, 2016). Enfin, l'inflexibilité métabolique en défaveur du glucose, moins gourmand que les lipides en oxygène par mole d'ATP produite, réduit l'efficacité cardiaque, qui est le ratio entre le travail cardiaque et sa consommation en oxygène (Taegtmeyer *et al.*, 2002; Young *et al.*, 2002; Battiprolu *et al.*, 2010; Bugger & Abel, 2014). Cette baisse d'efficacité cardiaque serait également accentuée par le découplage mitochondrial médié par la production de ROS consécutive à la

saturation en AG (Bugger & Abel, 2014). Un schéma récapitulatif des perturbations métaboliques observées dans le cardiomyocyte dans le T2DM est proposé figure 12.



**Figure 12.** Schéma simplifié des perturbations métaboliques observées dans le cardiomyocyte dans le diabète de type 2.  $\beta$ -ox :  $\beta$ -oxydation ; CAT : carnitine translocase ; CoA : coenzyme A ; CPT : carnitine palmitoyl transférase ; DAG : diacylglycérol ; F-1,6-bP : fructose-1,6-bisphosphate ; AG : acides gras ; F-6-P : fructose-6-phosphate ; GLUT4 : transporteur du glucose 4 ; PDH : pyruvate déshydrogénase ; PDK4 : pyruvate déshydrogénase kinase 4 ; PFK : phosphofructokinase ; PPAR $\alpha$  : peroxisome proliferator activated receptor  $\alpha$  ; TG : triglycérides.

### Glucotoxicité

L'accumulation de lipides intracellulaires participe à l'altération de l'absorption de glucose médiée par l'insuline, par la phosphorylation inhibitrice d'IRS et Akt *via* l'activation des kinases PKC- $\theta$  et IKK (Battiprolu *et al.*, 2010; Rydén *et al.*, 2013; Pappachan *et al.*, 2013). En outre, cette accumulation perturbe le métabolisme glucidique par l'inhibition des enzymes limitantes que sont la pyruvate déshydrogénase et la phosphofructokinase. La première va être inhibée *via* l'activation de la pyruvate déshydrogénase kinase 4 par la surexpression de PPAR $\alpha$  et par la production d'acétyl-CoA et de nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) lors de l'oxydation des AG (Mandavia *et al.*, 2013; Aon *et al.*, 2015; Mishra *et al.*, 2017; Joubert *et al.*, 2018). L'inhibition de la deuxième par les AG conduit à l'accumulation de fructose-6-phosphate dans la cellule, ce dernier étant le substrat de 4 voies métaboliques alternatives centrales dans les phénomènes de glucotoxicité : la voie des hexosamines, des polyols, des hexoses monophosphate et des AGE (figure 12) (Battiprolu *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2017). Ces voies secondaires sont également favorisées par l'inhibition de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) par la *poly (ADP-ribose) polymerase-1* (PARP-



1), activée par le stress oxydant (Battiprolu *et al.*, 2010; Jia *et al.*, 2016; Mishra *et al.*, 2017; Kain & Halade, 2017).

Les AGE sont des acteurs principaux du développement de la DMCM. En effet, ils promeuvent la sécrétion et l'accumulation de fibres de collagène par réticulation irréversible dans le myocarde, l'installation de cette fibrose conduisant à une compliance réduite du muscle et conséquemment à l'altération de la fonction diastolique (Rydén *et al.*, 2013; Seferović & Paulus, 2015; Jia *et al.*, 2016). Les AGE sont également responsables d'altérations de la contractilité et de la relaxation cardiaques par leur action inhibitrice des pompes calciques *ryanodine receptor* (RYR) et *sarco-/endoplasmic reticulum calcium ATPase* (SERCA) (Battiprolu *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2017; Joubert *et al.*, 2018). Enfin, l'activation de leur récepteur (RAGE), entraîne la production de ROS par l'activation de NF- $\kappa$ B, quand la glycation excessive entraîne en parallèle une diminution de l'activité des principales enzymes antioxydantes superoxide dismutase, glutathion peroxydase et catalase (Pappachan *et al.*, 2013; Kayama *et al.*, 2015; Joubert *et al.*, 2018).

La voie des hexosamines produit quant à elle la  $\beta$ -N-actétylglucosamine. Si la  $\beta$ -N-actétylglucosamination des protéines est une voie de signalisation physiologique au sein de la cellule, elle est également impliquée dans les phénomènes glucotoxiques dans le T2DM. Elle interviendrait notamment dans l'altération de l'homéostasie calcique et donc de la contractilité et de la relaxation du cardiomyocyte en provoquant, d'une part, la libération spontanée de  $Ca^{2+}$  par les RYR du réticulum sarcoplasmique (SR), *via* la  $\beta$ -N-actétylglucosamination de la kinase calmoduline-dépendante II (CaMKII) et, d'autre part, en perturbant les fonctions de la pompe SERCA, par la  $\beta$ -N-actétylglucosamination du phospholamban, son régulateur (Pappachan *et al.*, 2013; Bugger & Abel, 2014; Daniels *et al.*, 2015; Joubert *et al.*, 2018). La  $\beta$ -N-actétylglucosamination interviendrait également au niveau des différents complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale, altérant leur activité et entraînant donc la production de ROS (Frati *et al.*, 2017; Joubert *et al.*, 2018). Enfin, la  $\beta$ -N-actétylglucosamination activerait la voie du facteur de transcription *nuclear factor of activated T cells* (NFAT), impliquée dans le développement de l'hypertrophie pathologique (Joubert *et al.*, 2018).

L'accumulation de glucose-6-phosphate, l'intermédiaire précédent le fructose-6-phosphate, conduit également à des phénomènes de glucotoxicité. En empruntant la voie des pentoses phosphate, ce glucide est transformé en NADPH, substrat de la NADPH oxydase, productrice majeure de ROS au sein de la cellule (Varga *et al.*, 2015; Joubert *et al.*, 2018).



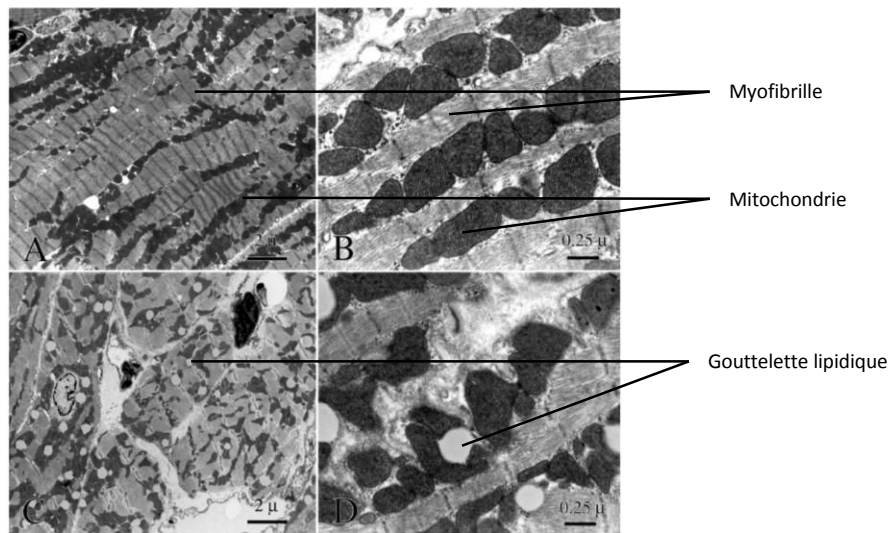


### Adiposité cardiaque et lipotoxicité

La saturation de l'oxydation des AG mène à l'accumulation de FA-CoA dans le cytosol. Si certains sont estérifiés pour former des gouttelettes lipidiques cytosoliques, ce qui représente une forme de protection contre la lipotoxicité, d'autres servent à la formation d'intermédiaires lipidiques tels que les céramides et le DAG, des espèces toxiques capables d'affecter les fonctions du cardiomyocyte et de déclencher son apoptose (« lipoapoptose ») (figure 12) (Young *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2008; Battiprolu *et al.*, 2010; Kolwicz *et al.*, 2013; Pappachan *et al.*, 2013; Bugger & Abel, 2014; Aon *et al.*, 2015; Amaral & Okonko, 2015).

L'accumulation de TG, sous forme de gouttelettes intra-myocardiques, a été observée dans des modèles expérimentaux de diabète comme chez l'Homme, par des études nécropsiques ou par imagerie par résonance magnétique (figure 13) (Ouwens *et al.*, 2007; Utz *et al.*, 2011; Aurich *et al.*, 2013; Nakanishi & Kato, 2014; Levelt *et al.*, 2016). Chez l'Homme comme chez l'animal, cette observation a été associée à la dysfonction cardiaque et à l'insulinorésistance (Ouwens *et al.*, 2005, 2007; van der Meer *et al.*, 2008; Hammer *et al.*, 2008). Cependant, des études expérimentales ont montré que l'accumulation de gouttelettes en elle-même ne serait pas délétère pour la fonction myocardique et serait au contraire un mécanisme protecteur permettant de diminuer le contenu cytosolique en espèces lipotoxiques, ces dernières étant capables de perturber la signalisation insulinique et la fonction cardiomyocytaire (Listenberger *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2009). Cet effet protecteur ne serait toutefois effectif que jusqu'à un certain seuil, comme suggéré par des travaux menés par Hankiewicz et coll. en 2010 (Hankiewicz *et al.*, 2010). Dans cette étude en spectroscopie par résonance magnétique, les auteurs ont évalué le contenu lipidique ainsi que la fonction myocardique régionale, puis ont dosé les TG cardiaques, dans deux groupes différents de souris : des souris témoins et des souris sous-exprimant PPAR $\alpha$ , qui présentent un stockage intracellulaire des lipides accru en conditions basales. Après avoir soumis ces souris à un régime gras, les auteurs ont observé une augmentation du contenu lipidique dans les deux groupes, mais largement supérieure dans le groupe sous-exprimant PPAR $\alpha$ . Cependant, dans ce dernier, les TG n'étaient pas augmentés par rapport aux conditions basales, suggérant la présence accrue d'autres espèces lipidiques. Par ailleurs, seul ce groupe présentait une altération de la fonction cardiaque (Hankiewicz *et al.*, 2010). Cette étude suggère donc que la dysfonction myocardique liée à l'adiposité n'interviendrait que passé un certain seuil de stéatose, au-delà duquel les TG n'augmentent plus, contrairement à d'autres espèces potentiellement lipotoxiques. *A contrario*, une étude conduite par Glenn et coll. en 2011 chez des souris surexprimant la diacylglycérol acyl-transférase 1, responsable de la synthèse de TG à partir de DAG et de FA-CoA, a montré que l'accumulation de TG menait au développement

d'une cardiomyopathie. Ces résultats en apparence contradiction avec ceux obtenus par Hankiewicz et coll. ou par Liu et coll. en 2009 sur un modèle similaire de souris surexprimant la diacylglycérol acyl-transférase 1, pourraient s'expliquer par la longueur du protocole appliqué : 1 an pour Glenn et coll., contre 3 mois pour Liu et coll. et 2 semaines de régime (souris âgées de 5 mois) pour Hankiewicz et coll. (Liu *et al.*, 2009; Hankiewicz *et al.*, 2010; Glenn *et al.*, 2011). La formation de gouttelettes lipidiques protégerait donc le cœur face à la lipotoxicité de manière aigue et jusqu'à un certain seuil.



**Figure 13. Observation au microscope électronique d'un myocarde de souris contrôle (A, B) ou *ob/ob* présentant une stéatose (C, D) (adapté de Rame *et al.*, 2011).**

Les acteurs principaux de la lipotoxicité sont les céramides et le DAG. Ces deux espèces ont en commun leur capacité d'activer les PKCs, des kinases pouvant exercer divers effets délétères pour la fonction cardiaque. Tout d'abord, l'activation des PKC $\alpha$ , - $\beta_1$ , - $\beta_2$ , - $\delta$  ou - $\theta$  et IKK par le DAG et de PKC $\zeta$  ou de la protéine phosphatase 2A par les céramides, serait responsable de la perturbation de la signalisation insulinaire (Chavez *et al.*, 2003; Battiprolu *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011; Chaurasia & Summers, 2015). L'activation de ces PKCs, de la protéine phosphatase 2A et la déphosphorylation d'Akt vont également avoir des effets pro-apoptotiques (Park & Goldberg, 2012). Les céramides provoqueraient en effet des phénomènes de lipoapoptose et de nécrose en engendrant la fuite de Ca<sup>2+</sup> du SR, augmentant ainsi sa concentration cytosolique, et en faisant chuter le  $\Delta\psi_m$ , perturbant la fonction mitochondriale et induisant la déplétion en ATP, le relargage de cytochrome c, l'activation des caspases 3 et 9 et des calpaïnes, la fission mitochondriale et ultimement la mort de la cellule (Pinton *et al.*, 2001; Pettus *et al.*, 2002; Parra *et al.*, 2013; Hodson *et al.*, 2015). La dysfonction



mitochondriale et la production de ROS qui en découle, vont également induire des phénomènes de peroxydation lipidique, capables de déstabiliser les membranes cellulaires (Pappachan *et al.*, 2013). Par ailleurs, les phénomènes de fission favorisent les modifications de l'ADN mitochondrial et peuvent ainsi provoquer des dysfonctions métaboliques et de la polarisation membranaire (Aon *et al.*, 2015; Galloway & Yoon, 2015). Autre effet délétère majeur pour la fonction cardiomyocytaire, l'activation de PKC $\epsilon$  par les céramides entraînerait une diminution de la contractilité par la phosphorylation de la troponine I cardiaque et de la *myosin binding protein C* cardiaque (Simon *et al.*, 2014). La phosphorylation de la cTnI réduirait en effet la sensibilité au Ca<sup>2+</sup> du myofilament et la vitesse des cycles de pontage actine-myosine (Waddingham *et al.*, 2015). Ces altérations de la contractilité seraient également renforcées par la perturbation de l'homéostasie calcique de la cellule par l'accumulation de FA-CoA, qui peut provoquer l'ouverture des canaux potassiques sensibles à l'ATP, induisant une hyperpolarisation de la membrane, amoindrissant les stocks en Ca<sup>2+</sup> du réticulum sarcoplasmique et impactant donc la contractilité (Liu *et al.*, 2001; Tammaro & Ashcroft, 2006; Battiprolu *et al.*, 2010). Enfin, l'activation de PKC $\alpha$  et  $\delta$ , par les céramides et le DAG, provoquerait quant à elle la phosphorylation et l'internalisation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques, altérant ainsi la réponse cardiaque aux stimuli adrénérgiques (Drosatos *et al.*, 2010).

#### Stress oxydant et inflammation

Le stress oxydant produit par les phénomènes de gluco- et lipotoxicité impacte l'ensemble des fonctions cellulaires. Le premier producteur, mais également première cible des ROS est la mitochondrie. Les altérations métaboliques conduisant à la perte d'efficacité et au découplage mitochondrial, ainsi que la diminution de l'expression des gènes des différents complexes de la chaîne respiratoire favorisent sa dysfonction, provoquant la fuite d'électrons et la production subséquente de ROS au niveau de la chaîne respiratoire (Battiprolu *et al.*, 2010; Aon *et al.*, 2015).

Outre les fonctions mitochondriales, le stress oxydant impacte de façon notoire la fonction contractile du cardiomyocyte. Il peut ainsi diminuer l'activité des canaux calciques voltage-dépendants de type L (ICa,L), indispensables à l'initiation du phénomène de *calcium-induced calcium release* à l'origine de la contraction du cardiomyocyte (Hafstad *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2017). Lors de la dépolarisation de la cellule, ces canaux permettent un léger afflux de Ca<sup>2+</sup>, qui déclenche la libération massive de Ca<sup>2+</sup> du SR dans le cytoplasme par les canaux RYR, eux-mêmes étant la cible des ROS (Hafstad *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2017). De même, la sensibilité des myofilament au Ca<sup>2+</sup> est diminuée par le stress oxydant (Hafstad *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2017). Suite à la contraction, le recaptage du calcium dans le réticulum sarcoplasmique est amoindri par l'inhibition de la pompe SERCA par les ROS (Hafstad *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2017). À noter que cette inhibition est amplifiée

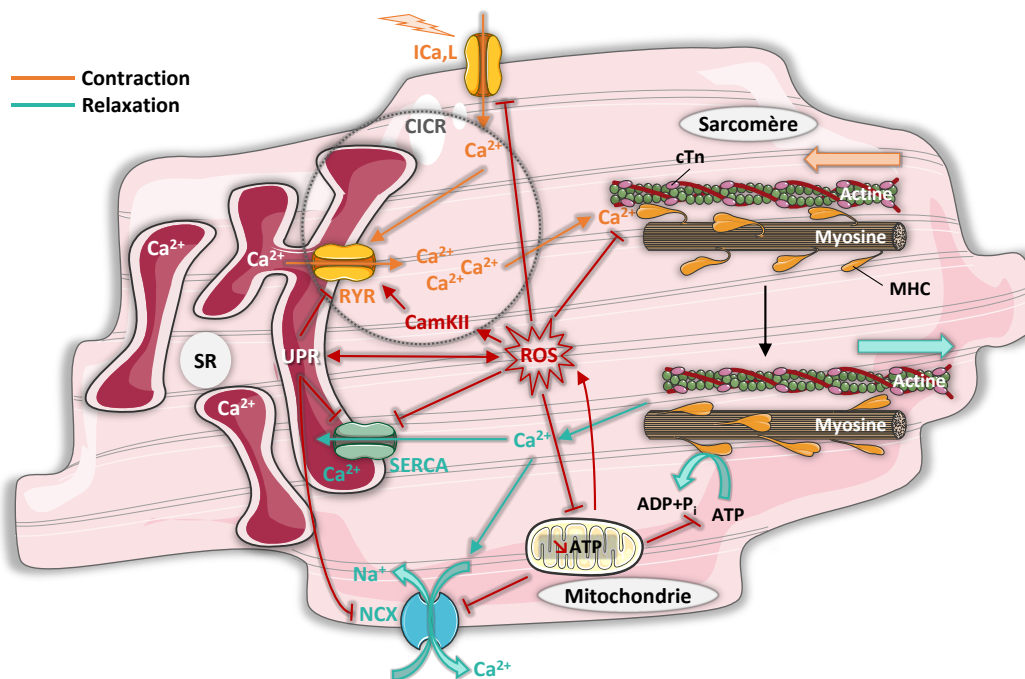


par la diminution de la synthèse d'ATP, qui va également inhiber l'échangeur sodium-calcium (NCX), responsable de l'évacuation extracellulaire du  $\text{Ca}_{2+}$  (Aon *et al.*, 2015). Outre l'homéostasie calcique, le stress oxydant pourrait directement impacter la contractilité de la cellule en altérant les interactions actine-myosine par le biais des Rho kinases (Waddingham *et al.*, 2015). Les fonctions systolique aussi bien que diastolique sont ainsi globalement atteintes par le stress oxydant, qui peut également provoquer des perturbations du rythme cardiaque. En effet, l'environnement oxydatif peut induire des fuites de calcium par l'activation de CamKII et la nitrosylation de RYR (Hafstad *et al.*, 2013; Varga *et al.*, 2015; Daniels *et al.*, 2015). Par ailleurs, selon leur concentration, les ROS peuvent activer diverses voies hypertrophiques, dont *extracellular-signal-regulated kinase* (ERK) et NF- $\kappa$ B, mais aussi des voies pro-apoptotiques, principalement *via* JNK et CamKII (Hafstad *et al.*, 2013; Kayama *et al.*, 2015; Daniels *et al.*, 2015). Un schéma simplifié de ces perturbations est proposé figure 14.

Le stress oxydant va également provoquer le stress du réticulum sarcoplasmique en perturbant ses fonctions de modification post-traductionnelle des protéines, notamment le repliement (Mandavia *et al.*, 2013; Jia *et al.*, 2016). Le réticulum va répondre en activant le mécanisme *unfolded protein response*, qui se traduit par un adressage accru au protéasome des protéines mal conformées, majorant lui-même en retour le stress oxydant (Mandavia *et al.*, 2013; Jia *et al.*, 2016). L'*unfolded protein response*, associé au stress oxydant, peut induire des perturbations de l'homéostasie calcique et donc de la fonction contractile et de relaxation (Mandavia *et al.*, 2013; Jia *et al.*, 2016). Ces perturbations se caractérisent par une fuite calcique du SR, associée à une diminution de l'expression de RYR, ainsi que par la diminution de l'activité de SERCA et du NCX (figure 14). La dysfonction mitochondriale se caractérise également par une baisse du captage du calcium et conduira à terme à la mort cellulaire par ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale (Mandavia *et al.*, 2013).

Les phénomènes de gluco-/lipotoxicité et la production de ROS, conduisent au développement de processus inflammatoires au sein du myocarde. Différents mécanismes sont alors mis en jeu, mais l'effecteur central est NF- $\kappa$ B (Frati *et al.*, 2017). Les différentes cytokines dont il promeut la sécrétion, comme le TNF- $\alpha$ , l'IL-6 ou encore la *monocyte chemoattractant protein 1*, vont stimuler l'infiltration des cellules immunitaires, mais également activer diverses voies de signalisation intracellulaires impliquées dans le développement de l'hypertrophie, la mort cellulaire, les perturbations métaboliques et de la contractilité (Pappachan *et al.*, 2013; Frati *et al.*, 2017). À titre d'exemple, l'inflammation augmente la production des céramides, par le biais du TNF- $\alpha$  et du *toll-like receptor 4* (Chaurasia & Summers, 2015). À cet état pro-inflammatoire local, vient s'ajouter

l'inflammation systémique, qui majore la diminution de la sensibilité à l'insuline par phosphorylation de l'IRS-1, via l'activation de kinases comme la *mechanistic target of rapamycin complex 1* (mTORC1)/S6 kinase 1 (S6K1) ou ERK (Mandavia *et al.*, 2013).



**Figure 14. Schéma simplifié des altérations des mouvements calciques impliqués dans la contraction et la relaxation du cardiomyocyte pouvant être induites par le stress oxydant.** CamKII : kinase calmoduline-dépendante II ; CICR : calcium-induced calcium release ; cTn : troponine cardiaque ; ICa,L : canal calcique voltage-dépendant ; MHC : chaîne lourde de la myosine ; NCX : échangeur sodium-calcium ; ROS : espèces réactives dérivées de l'oxygène ; RyR : récepteur à la ryanodine ; SR : réticulum sarcoplasmique ; UPR : unfolded protein response.

#### Altération des protéines sarcomériques

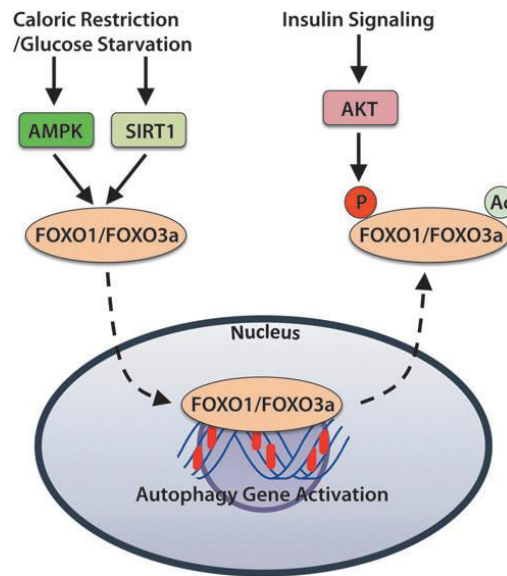
La dysfonction cardiaque dans la DMCM peut provenir directement de l'altération de l'expression et de la fonction des protéines du sarcomère. Un changement des proportions entre les isoformes de la chaîne lourde de la myosine et une baisse de son activité ATPasique ont ainsi été depuis longtemps décrits dans le cœur diabétique (Dillmann, 1980; Malhotra *et al.*, 1981). La chaîne lourde de la myosine peut être de type  $\alpha$ , un isoforme rapide, ou  $\beta$ , un isoforme plus lent et plus économe sur le plan énergétique. La diminution du ratio entre les isoformes  $\alpha$  et  $\beta$  observée dans la DMCM (qui pourrait être un processus adaptatif à la baisse d'efficacité mitochondriale) et la baisse d'activité ATPasique associée, ont pour conséquence un ralentissement de la cinétique de pontage entre l'actine et la myosine qui se traduit par une altération de la contractilité (Waddingham *et al.*, 2015). La surexpression de l'isoforme  $\beta$  de la chaîne lourde de la myosine dans le T2DM pourrait être attribuée à l'activation de FoxO1 et du RAS (Machackova *et al.*, 2004; Qi *et al.*, 2014). Outre la myosine, le filament d'actine pourrait également être impliqué. Comme précédemment mentionné,



l'activation des PKC pourrait en effet phosphoryler la troponine I cardiaque, réduisant la sensibilité au  $Ca^{2+}$  et la vitesse des cycles de pontage (Waddingham *et al.*, 2015).

#### Autophagie et mort cellulaire

Le développement de la DMCM se caractérise également par des altérations de l'autophagie, un processus de recyclage des éléments cellulaires défectueux, notamment la mitochondrie, indispensable au bon fonctionnement de la cellule et à sa survie en conditions de stress (Battiprolu *et al.*, 2013; Bugger & Abel, 2014; Varga *et al.*, 2015; Kobayashi & Liang, 2015; Kubli & Gustafsson, 2015; Delbridge *et al.*, 2017). En conditions physiologiques, l'autophagie est inhibée par la voie PI3K-Akt/mTORC1 insulino-dépendante ; en conditions de stress énergétique en revanche, la voie AMPK/FoxO l'active (figure 15) (Bugger & Abel, 2014; Kobayashi & Liang, 2015; Kubli & Gustafsson, 2015; Delbridge *et al.*, 2017). De façon intéressante, l'autophagie pourrait également être régulée positivement par miR-22, un miR cardiaque qui a par ailleurs été impliqué dans les phénomènes de remodelage hypertrophique (Huang & Wang, 2014; Gupta *et al.*, 2016). Un autre miR, le miR-451, régulerait, à l'inverse, l'autophagie à la baisse et serait sous-exprimé dans le cœur hypertrophique (Cheng *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2014). Si les altérations de ce processus sont largement rapportées dans la DMCM, aucun consensus n'a cependant été atteint concernant leur caractérisation, certaines études décrivant une diminution de l'autophagie quand d'autres rapportent une augmentation (Kubli & Gustafsson, 2015; Delbridge *et al.*, 2017). Si dans le cas d'un stress énergétique aigu, le rôle cardioprotecteur de l'autophagie est démontré, les études n'ont pas permis à l'heure actuelle de définir clairement le caractère délétère ou cardioprotecteur de ce mécanisme dans le cadre du T2DM (Bugger & Abel, 2014; Delbridge *et al.*, 2017). Cette distinction pourrait reposer sur un « juste milieu » de son activation (Bugger & Abel, 2014; Delbridge *et al.*, 2017).



**Figure 15. Voies de régulation de l'autophagie (Kubli & Gustafsson, 2015).** Akt: *protein kinase B*; AMPK: *adenosine monophosphate-activated protein kinase*; FOXO: *forkhead box, class O*; SIRT1: *sirtuine 1*.

Une étude, réalisée en 2000 par Frustaci et coll. à partir de biopsies endomyocardiques de patients T2DM, a révélé une forte augmentation des phénomènes de nécrose et surtout d'apoptose dans ces tissus. Ainsi, pour les cardiomyocytes, la nécrose est multipliée par 4 et l'apoptose multipliée par 85 au sein de ces échantillons (Frustaci *et al.*, 2000). Dans le cadre pathologique de la DMCM, de nombreux facteurs peuvent être à l'origine de la mort cellulaire, comme le stress oxydant, l'inflammation, la dysfonction mitochondriale, le stress du SR, l'activation du RAS... L'activation de *poly (ADP-ribose) polymerase-1*, par le stress oxydant ou des dommages à l'ADN, peut également induire un autre type de mort, nommée parthanatos, médiée par la libération d'*apoptosis-inducing factor* par la mitochondrie (David *et al.*, 2009; Bugger & Abel, 2014).

## 2. Altérations neurohumorales

### Activation du système rénine-angiotensine

La dysfonction rénale associée au diabète conduit à l'activation du système RAS qui va stimuler la production d'angiotensine II par les cardiomyocytes et les fibroblastes cardiaques (Mandavia *et al.*, 2013; Kayama *et al.*, 2015; Waddingham *et al.*, 2015). On retrouve ainsi de fortes concentrations de cette hormone dans le cœur, environ 3 fois plus que chez une personne saine (Frustaci *et al.*, 2000). L'angiotensine II est un promoteur de la résistance à l'insuline cardiaque, par la phosphorylation de l'IRS-1, mais également du stress oxydant, par l'activation de la NADPH oxydase (Mandavia *et al.*, 2013). L'angiotensine II pourrait également affecter la  $\beta$ -oxydation et stimuler le développement de l'hypertrophie en induisant la surexpression de miR-208a par le cardiomyocyte



(Callis *et al.*, 2009; Blumensatt *et al.*, 2017). De plus, le RAS jouerait un rôle dans le remodelage (par l'activation de CamKII) et la fibrose cardiaques, son inhibition permettant d'améliorer ces paramètres ainsi que la fonction cardiaque (Machackova *et al.*, 2004; Dong *et al.*, 2012; Shimizu & Minamino, 2016). L'aldostérone, dont la sécrétion est stimulée par l'angiotensine II, se lie quant à elle au récepteur des minéralocorticoïdes cardiaque et stimule l'expression de gènes pro-inflammatoires et pro-fibrotiques (Mandavia *et al.*, 2013).

#### Activation du système nerveux autonome sympathique

L'activation du système autonome sympathique se traduit par une augmentation de la stimulation  $\beta$ -adrénergique, qui entraîne une perturbation du contrôle du rythme cardiaque, ainsi que par une diminution de l'élasticité vasculaire, associée à une augmentation des résistances périphériques (Pappachan *et al.*, 2013; Jia *et al.*, 2016). Ces altérations seraient responsables d'une perte de réserve de perfusion myocardique (Pappachan *et al.*, 2013). Par ailleurs, la signalisation adrénergique active CamKII et peut donc stimuler le développement de l'hypertrophie (Shimizu & Minamino, 2016).

### 3. Altérations vasculaires

La saturation de l'oxydation des AG impacte également le système vasculaire adjacent, en perturbant les voies de signalisation liées au monoxyde d'azote (NO) produit par la NO synthase endothéliale (eNOS), responsable de la vasorelaxation (Battiprolu *et al.*, 2010; Rydén *et al.*, 2013; Pappachan *et al.*, 2013; Varga *et al.*, 2015; Seferović & Paulus, 2015). De plus, le découplage de la eNOS induit la production d'anion superoxyde, qui peut réagir avec le NO pour former du peroxyde d'azote, un autre puissant agent oxydant (Varga *et al.*, 2015).

Par ailleurs, des changements structuraux de ce système vasculaire sont observés. On note ainsi des modifications hyalines des artérioles, un épaississement de l'intima-média et une baisse de la densité capillaire (Rydén *et al.*, 2013; Pappachan *et al.*, 2013). Ces perturbations à l'échelle de la microcirculation vont amplifier la détérioration du système vasculaire cardiaque en affectant le réseau du *vasa vasorum* (Pappachan *et al.*, 2013). La création d'un environnement hypoxique va exacerber l'altération de la fonction cardiaque en favorisant le développement de la fibrose et la dysfonction du cardiomyocyte (Pappachan *et al.*, 2013). L'activation du RAS et la forte concentration en angiotensine II dans le cœur vont par ailleurs stimuler la vasoconstriction des vaisseaux et donc réduire la perfusion coronaire (Waddingham *et al.*, 2015). Il est à noter qu'une insuffisance de l'angiogenèse en regard du développement de l'hypertrophie est un facteur central du caractère



pathologique du remodelage et un élément majeur de la progression vers l'insuffisance cardiaque (Shiojima *et al.*, 2005; Shimizu & Minamino, 2016).

#### 4. Altérations du tissu adipeux épïcardique

Le TAE est un tissu adipeux situé sous le péricarde, au contact direct des cardiomyocytes (figure 16). Contrairement au TA péricardique, qui se situe en-dehors du péricarde, il est perfusé par les coronaires. S'il se localise principalement dans les sillons atrio-ventriculaires et interventriculaires, il peut s'étendre sur l'ensemble du myocarde en conditions physiopathologiques, comme chez l'obèse ou le diabétique (Iacobellis, 2015; Salazar *et al.*, 2016). Chez l'Homme, l'étude nécropsique menée par Da Silva et De Mello chez 40 sujets adultes (femmes et hommes, âgés de 35 à 96 ans et présentant divers antécédents) a rapporté la présence de TAE sur le VG chez 92,5% des individus, pour une épaisseur moyenne pouvant varier de 0,5mm à 7mm, cette épaisseur étant proportionnelle à l'adiposité abdominale (da Silva & de Mello, 2017). Le TAE représenterait ainsi environ 15%-20% de la masse cardiaque chez un individu sain (Sacks & Fain, 2007; Salazar *et al.*, 2016; Aldiss *et al.*, 2017). Chez le rongeur, le TAE est en revanche très discret voire réputé absent, ce qui limite son étude par des modèles expérimentaux (Yamaguchi *et al.*, 2015; Iacobellis, 2015). Ce tissu est considéré comme issu du mésoderme splanchnique, cependant, Yamaguchi et coll. ont récemment mis en évidence qu'il pourrait également provenir d'une différenciation mésenchymateuse de l'épicarde *via* l'activation de PPAR $\gamma$  (Yamaguchi *et al.*, 2015; Iacobellis, 2015; Matloch *et al.*, 2016; Aldiss *et al.*, 2017).

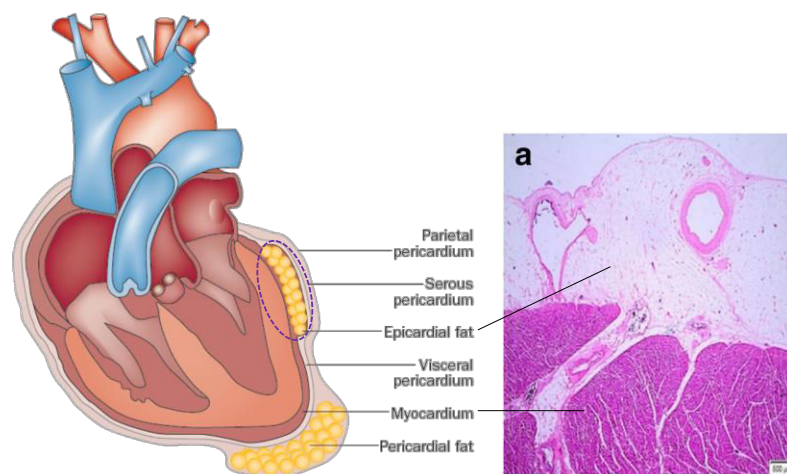


Figure 16. Localisation du tissu adipeux épïcardique, schématisée et sur une coupe de ventricule gauche humain coloré en hématoxyline-éosine (adapté de Iacobellis *et al.*, 2015 et Da Silva & De Mello, 2017).

Le TAE est décrit comme un TA blanc, cependant, il possède certaines propriétés intrinsèques au TA beige et brun, comme l'expression de la protéine découplante 1 (UCP1), du *brown adipocyte*



*differentiation transcription factors PR-domain-missing 16* (PRDM16), du marqueur adipocytaire beige CD137 ou bien encore de PGC1- $\alpha$  (Sacks *et al.*, 2009, 2013; Iacobellis, 2015; Salazar *et al.*, 2016; Aldiss *et al.*, 2017). Ce tissu remplit plusieurs rôles indispensables au bon fonctionnement cardiaque. D'une part, sa richesse en AG et son métabolisme particulièrement élevé en font un réservoir énergétique pour le cœur, qu'il alimente *via* la circulation coronaire (Iacobellis, 2015; Matloch *et al.*, 2016). D'autre part, le TAE pourrait assurer la protection thermique du cœur grâce à l'expression de gènes de la thermogenèse, dont la protéine découplante 1 (Sacks *et al.*, 2009; Iacobellis, 2015; Salazar *et al.*, 2016). Ses propriétés mécaniques assureraient également la protection des coronaires contre la torsion, due à la contraction cardiaque, qu'elles pourraient subir (Iacobellis, 2015; Matloch *et al.*, 2016). Enfin, le TAE est un organe sécréteur notoire : il peut libérer des facteurs pro- comme anti-inflammatoires, des cytokines vasoactives (qui lui permettraient de faciliter l'apport en AG au myocarde) et des facteurs de croissance (Iacobellis, 2015). Il va notamment pouvoir sécréter des facteurs antioxydants, antiathérogènes et anti-inflammatoires comme l'adiponectine, l'adrénomédulline ou l'omentine, cette dernière étant de tout premier intérêt car elle stimulerait la sensibilité à l'insuline (Watanabe *et al.*, 2011; Iacobellis, 2015; Gaborit *et al.*, 2015; Salazar *et al.*, 2016; Matloch *et al.*, 2018). Dans le T2DM, l'altération de ce profil sécrétoire vers un phénotype délétère va pouvoir directement impacter la fonction cardiaque. Le TAE libère alors des facteurs tels que la *monocyte chemoattractant protein 1*, le TNF- $\alpha$ , l'IL-6, la résistine ou l'Activine A, tout en diminuant sa sécrétion de facteurs antioxydants, antiathérogènes et anti-inflammatoires (Iacobellis, 2015; Salazar *et al.*, 2016; Rietdorf & MacQueen, 2017; Matloch *et al.*, 2018). Des études s'étant intéressées à l'effet du sécrétome du TAE de patients T2DM sur des cardiomyocytes en culture, ont ainsi mis en évidence une altération de la contractilité des cellules associée à une altération de l'homéostasie calcique, une inhibition de la phosphorylation insulino-dépendante d'Akt, l'activation du RAS, reflétée par l'augmentation de la sécrétion d'angiotensine II, et une dysfonction mitochondriale due à une altération de la  $\beta$ -oxydation *via* l'induction de miR-208a associée à l'inhibition de la carnitine palmitoyl transférase (Greulich *et al.*, 2012; Blumensatt *et al.*, 2017). Ces effets délétères seraient médiés, entre autres, par l'Activine A et l'angiopoïétine-2 (Greulich *et al.*, 2012). Par ailleurs, cette même adipokine, l'Activine A, présenterait des propriétés pro-fibrotiques (Venteclef *et al.*, 2015). Si, à notre connaissance, il n'existe pas d'étude clinique ayant évalué le lien entre TAE et fonction régionale myocardique chez le patient T2DM, une étude précédemment réalisée au sein de notre laboratoire chez des patients syndromes métaboliques a établi un lien entre la fonction régionale myocardique systolique (*strain* longitudinal) et l'épaisseur du TAE (Serrano-Ferrer *et al.*, 2016). En revanche, l'étude menée par Kazlauskaitė et coll. a mis en évidence le lien entre dysfonction diastolique globale et épaisseur du TAE chez des patient T2DM (Kazlauskaitė *et al.*,



2010). De plus, certaines études ont observé un lien entre l'épaisseur du TAE et la masse ventriculaire gauche, mesurés en échocardiographie ou dans le cadre d'une autopsie (Iacobellis *et al.*, 2004; Corradi *et al.*, 2004). Enfin, un épaissement du TAE a également été associé à une réduction de la réserve de perfusion coronaire et à un épaissement de l'intima-média (Sade *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2017). Le TAE pourrait ainsi participer au développement de la DMCM par la sécrétion de facteurs pouvant altérer à la fois la vascularisation et le muscle cardiaques. Cependant, la littérature est encore à ce jour sporadique sur le sujet et de plus amples recherches restent nécessaires afin de comprendre la portée de l'implication du TAE dans la physiopathologie de la DMCM.

### c) *Approches thérapeutiques*

#### Prévention

Considérant le risque élevé de développement de complications cardiaques chez le patient T2DM, la mise en place d'un programme de prévention s'impose (Rydén *et al.*, 2013; Fox *et al.*, 2015; Marwick *et al.*, 2018).

À l'instar des autres complications du diabète, comme des autres pathologies cardiovasculaires, la prévention de la DMCM repose avant tout aujourd'hui sur les stratégies hygiéno-diététiques (Fox *et al.*, 2015; Jia *et al.*, 2016; Piepoli *et al.*, 2016; Marwick *et al.*, 2018). Différentes études ont ainsi montré l'intérêt global de ce type d'intervention sur le risque cardiovasculaire et l'incidence des événements cardiovasculaires, mais également plus précisément sur la fonction cardiaque du diabétique (Brassard *et al.*, 2007; Hammer *et al.*, 2008; Artinian *et al.*, 2010; Edelman *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2015). L'étude « Look AHEAD (Action for HEALTH in Diabetes) » a notamment montré que l'amplitude de la perte de poids était l'élément clé dans la réduction des facteurs de risque cardiovasculaires, ainsi que dans la réduction de l'incidence des événements cardiovasculaires chez les patients T2DM (The Look AHEAD Research Group, 2007, 2010; Wing *et al.*, 2011; Gregg *et al.*, 2016). Cependant, concernant la fonction cardiaque, des études ayant évalué les effets de programmes d'exercice à moyen terme (1-3 ans) n'ont pas mis en évidence d'effets bénéfiques (Hordern *et al.*, 2009; Hare *et al.*, 2011). Ceci pourrait s'expliquer, du moins en partie, par la difficulté de faire adhérer les patients aux programmes sur de telles périodes (Hare *et al.*, 2011). En effet, les études rapportant les effets positifs de l'exercice sur la fonction cardiaque ont proposé des programmes bien plus courts (3 mois) aux patients (Brassard *et al.*, 2007; Edelman *et al.*, 2011; Schrauwen-Hinderling *et al.*, 2011). La prévention des complications cardiaques par une



stratégie hygiéno-diététique peut donc être efficace mais demande une bonne adhésion au long terme du patient, ce qui peut s'avérer compliqué dans la pratique clinique (Artinian *et al.*, 2010).

Le contrôle de la glycémie est également un élément important dans la prévention du développement des complications cardiaques (Rydén *et al.*, 2013; Fox *et al.*, 2015; Marwick *et al.*, 2018). En effet, comme précédemment mentionné, une augmentation de l'HbA1c de 1% est associée à une augmentation de 8% du risque d'insuffisance cardiaque quand, à l'inverse, une diminution de l'HbA1c de 1% est associée à une diminution de ce risque de 16% (Stratton *et al.*, 2000; Iribarren *et al.*, 2001). Les différentes stratégies de contrôle de la glycémie ayant précédemment été décrites, elles ne seront pas développées ici. Il est cependant à noter qu'une nouvelle classe d'antidiabétiques oraux, les inhibiteurs du co-transporteur sodium-glucose 2 (SGLT2), pourrait être à privilégier afin de réduire les complications cardiaques, une étude ayant notamment relevé une diminution des hospitalisations pour insuffisance cardiaque de 35% avec ce traitement (Piepoli *et al.*, 2016; Marwick *et al.*, 2018). Il convient de préciser que ces spécialités n'ont pas obtenu à ce jour d'autorisation de mise sur le marché en France, en raison d'importants effets secondaires. Au besoin, un traitement pharmacologique des autres comorbidités (dyslipidémie, hypertension, obésité...) sera également mis en place (Rydén *et al.*, 2013; Fox *et al.*, 2015; Piepoli *et al.*, 2016).

Si actuellement des thérapies ciblant spécifiquement les mécanismes de la progression de la DMCM ne font pas partie des recommandations des sociétés savantes, leur développement pourrait permettre de limiter l'évolution de la maladie. Parmi les traitements existants, les inhibiteurs du RAS pourraient ainsi être utilisés pour prévenir le développement de la DMCM (Marwick *et al.*, 2018; Sivasankar *et al.*, 2018). D'autres molécules, comme la trimétazidine, pourraient permettre de moduler le métabolisme cardiaque en réduisant l'utilisation des lipides en faveur des glucides par l'inhibition de la  $\beta$ -oxydation (Jia *et al.*, 2016; Sivasankar *et al.*, 2018). Si de nombreuses études expérimentales ont également proposé de nouvelles thérapies, ciblant par exemple la pyruvate déshydrogénase kinase 4, la PKC ou le NCX, ces traitements restent à évaluer à l'échelle clinique (Voulgari *et al.*, 2010; Jia *et al.*, 2016; Sivasankar *et al.*, 2018).

#### Prise en charge de l'insuffisance cardiaque

En cas d'évolution vers l'insuffisance cardiaque, la prise en charge préconisée par l'*European Society Of Cardiology*, en accord avec l'*European Association For The Study Of Diabetes*, ainsi que par l'*Heart Failure Association*, sera celle classiquement recommandée dans ce cas (Rydén *et al.*, 2013; Seferović *et al.*, 2018).



La première approche pharmacologique cible le RAS. Des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE-I) et des récepteurs de l'angiotensine (ARB) sont classiquement utilisés, en association avec un  $\beta$ -bloquant si la FE est  $\leq 40\%$ . Si cette approche n'est pas suffisante et en cas d'EF  $\leq 35\%$ , un antagoniste des récepteurs aux minéralocorticoïdes est alors indiqué. Enfin, des diurétiques sont utilisés pour limiter les œdèmes et soulager la dyspnée (Rydén *et al.*, 2013; Seferović *et al.*, 2018).

En cas de besoin, une thérapie de resynchronisation ou la pose d'un défibrillateur automatique implantable peuvent être prescrites. Au stade terminal, la transplantation cardiaque peut être envisagée, bien que le diabète soit un facteur de risque pour la survie suite à cette opération (Rydén *et al.*, 2013; Seferović *et al.*, 2018).

## I- DIABETE & FONCTION CARDIAQUE

- Le diabète de type II est la septième cause de décès dans le monde et sa prévalence est en constante augmentation, en lien avec le développement du mode de vie « occidental ».
- Il se caractérise par une hyperglycémie chronique consécutive à une perte de sensibilité à l'insuline, associée à une altération progressive de la fonction des cellules  $\beta$ -pancréatiques.
- La première cause de mortalité chez le patient diabétique est la cardiomyopathie diabétique, qui se développe dès l'apparition des altérations métaboliques et se caractérise par une hypertrophie concentrique associée à une dysfonction diastolique globale.

**Le dépistage et la prévention de la progression de cette complication au stade le plus précoce revêtent donc une importance majeure, ils sont les deux objectifs ciblés par ces travaux de thèse.**



## II- DIAGNOSTIC DE LA CARDIOPATHIE DIABÉTIQUE : APPROCHES ACTUELLES ET PERSPECTIVES

Considérant l'importance de la DMCM dans la morbi-mortalité du patient diabétique, le dépistage de cette pathologie le plus précocement possible est de première importance. Actuellement, les recommandations reposent principalement sur l'évaluation de paramètres échocardiographiques morphologiques et fonctionnels globaux, mesurés au repos. Cependant, l'utilité d'une évaluation de la fonction régionale myocardique par imagerie de déformation émerge des études récentes menées sur le sujet. Par ailleurs, l'imagerie en conditions de stress pourrait s'avérer plus efficace que l'imagerie de repos dans le dépistage des altérations les plus précoces, notamment de la fonction systolique et en particulier dans le T2DM non compliqué.

### 1- Approches actuelles

#### a) *Évaluation du risque cardiovasculaire et dépistage de la cardiomyopathie diabétique*

Considérant le lien fort entre T2DM et développement de complications cardiovasculaires, il paraît important d'effectuer un dépistage et un suivi précoces du patient diabétique. Afin d'évaluer le risque cardiovasculaire du patient, des tables d'évaluation ont été mises au point (par exemple SCORE ou ADVANCE). Cependant, des études ont montré que cette évaluation du risque était peu pratiquée en routine, par crainte de surestimation du risque ou de surmédication (Perk *et al.*, 2012). D'après les recommandations jointes de l'*European Society Of Cardiology* et de sociétés savantes de prévention du risque cardiovasculaire, le patient T2DM doit cependant être considéré d'office comme étant à « haut risque » et en cas d'existence d'une complication diabétique et/ou d'un autre facteur de risque cardiovasculaire, il devra être catégorisé à « très haut risque » d'emblée (Perk *et al.*, 2012). Malgré cela, un grand nombre de patients T2DM restent non diagnostiqués pour la DMCM. L'étude menée par Boonman-de Winter et coll. aux Pays-Bas chez 581 patients T2DM âgés d'en moyenne 71 ans a ainsi montré que 27,7% d'entre eux étaient atteints d'une insuffisance cardiaque non diagnostiquée, dont 4,8% avec réduction de la FE (Boonman-de Winter *et al.*, 2012). L'étude danoise « Thousand & 2 Study », menée sur 1 030 patients T2DM âgés d'en moyenne 65 ans, a quant à elle détecté 21% d'hypertrophies, 12,5% d'EF réduites et 19,4% de dysfonctions diastoliques précédemment non dépistées (Jørgensen *et al.*, 2016). Enfin, dans une cohorte de 100 patients diabétiques suisses âgés d'en moyenne 57,4 ans et sans antécédents, Kiencke et coll. ont rapporté une prévalence de la DMCM préclinique de 48% (Kiencke *et al.*, 2010). Ces études soulignent qu'une



marge de progression existe aujourd'hui dans le dépistage de la DMCM, notamment préclinique, qui est associée à une multiplication par 4 du risque d'évènement cardiovasculaire à moyen terme (~4 ans) (Kiencke *et al.*, 2010).

### *b) Outils diagnostiques*

L'évaluation non-invasive de la morphologie et de la fonction cardiaques peut être réalisée par échocardiographie, par imagerie par résonance magnétique, par imagerie nucléaire ou bien encore par tomodensitométrie (ou scanner). L'imagerie par résonance magnétique est considérée comme la technique non-invasive de référence pour sa haute résolution spatiale, sa reproductibilité et la possibilité de mesurer avec précision les volumes et la masse cardiaques (Nagueh *et al.*, 2011; Kinno *et al.*, 2017). Cependant, son coût élevé ainsi que le temps d'examen et l'impossibilité de son utilisation pour les patients possédant certains dispositifs implantés (pacemakers, défibrillateurs automatiques) n'en font pas un appareil de routine en cardiologie. La tomodensitométrie et l'imagerie nucléaire, de leur côté, ont le double inconvénient de présenter un coût élevé et d'exposer le patient à des radiations, elles seront plutôt employées dans le dépistage d'ischémies et de coronaropathie ou dans le cas où ni l'échocardiographie, ni l'imagerie par résonance magnétique ne sont réalisables (Nagueh *et al.*, 2011; Kinno *et al.*, 2017). L'échocardiographie est ainsi aujourd'hui devenue la technique d'examen la plus répandue et recommandée en routine (Nagueh *et al.*, 2011). Elle a l'avantage d'être rapide, non-vulnérante et peu coûteuse, tout en offrant une bonne résolution spatiale et temporelle. **C'est donc sur l'échocardiographie que reposent ces travaux de thèse et c'est cette technique d'imagerie qui sera considérée dans la suite du document.** Les recommandations de l'*American Society of Echocardiography* concernant les techniques d'imageries appropriées à chaque type d'évaluation sont résumées figure 17.



	Echocardiography	Nuclear imaging	CMR	Cardiac CT
1. LV dimensions, wall thickness	Recommended as initial test	Not recommended	Recommended with inadequate echocardiography	Rarely needed if echocardiography and CMR are not feasible
2. LV EF and regional function	Recommended as initial test	Not needed if echocardiography and CMR are available	Recommended with inadequate echocardiography	Not needed if echocardiography and CMR are available
3. LV filling pressures	Recommended	Not recommended as it provides only indirect evidence	Not recommended	Cannot be used for this purpose
4. Pulmonary artery pressure	Recommended	Cannot be used for this purpose	Cannot be used for this purpose	Cannot be used for this purpose
5. LA volume and function	Recommended	Cannot be used for this purpose	Recommended with inadequate echocardiography	Rarely needed if echocardiography and CMR are not feasible
6. Dynamic obstruction	Recommended	Cannot be used for this purpose	Recommended with inadequate echocardiography	Cannot be used for this purpose
7. Mitral regurgitation	Recommended	Not recommended	Recommended with inadequate echocardiography	Not recommended
8. Ischemia/CAD (if clinically indicated)	Considered if nuclear and CT not feasible	Recommended	Research application	Recommended if epicardial CAD in question
9. Cardiac metabolism and neurotransmission	Cannot be used for this purpose	Research application	Research application	Cannot be used for this purpose
10. Monitoring of invasive therapy	Recommended	Rarely needed if echocardiography and CMR are not feasible	Recommended with inadequate echocardiography	Rarely needed if echocardiography and CMR are not feasible
11. Image replacement fibrosis	Research application	Not recommended	Recommended test	Cannot be used for this purpose
12. Screening	Recommended	Not recommended	Recommended with inadequate echocardiography	Not recommended

**Figure 17. Recommandations de l'American Society of Echocardiography concernant les techniques d'imageries appropriées à chaque type d'évaluation (Nagueh *et al.*, 2011).** CAD : coronaropathie ; CMR : imagerie par résonance magnétique ; CT : tomographie axiale ; EF : fraction d'éjection ; LA : oreillette gauche ; LV : ventricule gauche.

### c) Critères diagnostiques

Comme précédemment mentionné (partie I-2-a), la DMCM est classiquement caractérisée, chez le T2DM, par le développement, en l'absence d'hypertension, de coronaropathie ou de pathologie valvulaire ou congénitale, d'une hypertrophie concentrique avec dysfonction diastolique et fonction systolique globale préservée (Elliott *et al.*, 2008; Rydén *et al.*, 2013; Seferović & Paulus, 2015). À noter que la dysfonction diastolique peut être également observée en l'absence d'hypertrophie et inversement (Dawson *et al.*, 2005; Srivastava *et al.*, 2008; Miki *et al.*, 2013). Les critères diagnostiques actuels sont ainsi principalement basés sur l'évaluation de paramètres morphologiques et fonctionnels globaux du VG. Les valeurs de référence sont présentées figure 18.

#### 1. Morphologie cardiaque

Selon les études, la prévalence observée de l'hypertrophie ventriculaire gauche peut varier entre 21% et 71% chez les patients T2DM (Dawson *et al.*, 2005; Srivastava *et al.*, 2008; Jørgensen *et al.*, 2016).

Les paramètres permettant d'évaluer la morphologie cardiaque gauche regroupent les mesures des dimensions linéaires, ainsi que l'évaluation des volumes et de la masse du VG.





### Mesure des dimensions linéaires

Selon les recommandations conjointes de l'American Society of Echocardiography et de l'European Society of Cardiovascular Imaging (EACVI), parues en 2015, les mesures des dimensions linéaires gauches doivent être réalisées à partir d'une coupe parasternale grand axe (PSLAX), dans un axe perpendiculaire au grand axe du VG et à l'extrémité des valves mitrales (Lang *et al.*, 2015a). Les mesures sont effectuées en télédiastole (TD) et télésystole (TS), puis rapportées à la BSA (Lang *et al.*, 2015a). Les paramètres ainsi mesurés sont les épaisseurs TD et TS du septum interventriculaire (IVSd/-s) et de la paroi postérieure (PWd/-s) ainsi que le diamètre interne TD et TS du VG (LVDd/-s). Les valeurs de référence sont présentées figure 18.

### Évaluation des volumes

Le consensus actuel préconise l'évaluation des volumes du VG à partir des coupes apicales 2 et 4 cavités (2C/4C), en choisissant la vue permettant de dégager la surface maximale de la cavité ventriculaire (Lang *et al.*, 2015a). Le calcul s'effectue à partir de la méthode biplan de Simpson modifiée. Chez les patients présentant une bonne échogénicité, il est recommandé d'effectuer directement la mesure par une acquisition volumétrique en imagerie quadridimensionnelle (4D). Chez les patients peu échogènes en revanche, l'utilisation d'un agent de contraste peut être nécessaire pour délimiter correctement l'endocarde. Similairement aux mesures linéaires, les volumes sont rapportés en TD et TS (LVEDV/LVESV) et indexés à la BSA (Lang *et al.*, 2015a). Les valeurs de référence sont présentées figure 18.

### Calcul de la masse ventriculaire gauche

La masse du VG (LVM) peut être évaluée à partir du mode bidimensionnel (2D), du mode temps-mouvement ou du mode 4D. Cependant, l'insuffisance actuelle du nombre d'études utilisant ce dernier mode ne permet pas de définir des valeurs de référence, son utilisation n'est donc pas recommandée à l'heure actuelle. Les deux autres techniques peuvent être indifféremment utilisées mais leurs résultats ne sont pas directement comparables car les formules de calcul qui y sont associées diffèrent. Ces formules reposent cependant toutes deux sur l'estimation de la masse à partir des épaisseurs pariétales et du diamètre interne du VG en TD. La technique la plus largement utilisée est celle de la mesure en mode TM, elle utilise la formule dite du cube ou formule de Devereux (Devereux *et al.*, 1986; Lang *et al.*, 2015a) :

$$\text{LVM (g)} = 0,8 * 1,04 * [(\text{IVS} + \text{LVD} + \text{PW})^3 - \text{LVD}^3] + 0,6$$



Comme les autres paramètres morphologiques, la LVM peut être exprimée en fonction de la BSA (Lang *et al.*, 2015a). Cependant, d'autres méthodes d'indexation sont utilisées, notamment chez les patients obèses. La LVM pourra ainsi dans ce cas être rapportée à la taille<sup>2,7</sup> (Cuspidi *et al.*, 2009). Les valeurs de référence sont présentées figure 18.

Paramètre	Femme		Homme	
	Moyenne±SD	Fourchette	Moyenne±SD	Fourchette
IVS (mm)	-	6-9	-	6-10
PW (mm)	-	6-9	-	6-10
LVDD (mm)	45±3,6	-	50,2±4,1	-
LVDS (mm)	28,2±3,3	-	32,4±3,7	-
LVEDV (mL)	76±15	-	106±22	-
LVEDV/BSA (mL/m <sup>2</sup> )	45±8	-	54±10	-
LVESV (mL)	28±7	-	41±10	-
LVESV/BSA (mL/m <sup>2</sup> )	16±4	-	21±5	-
LVM (g)	-	66-150	-	96-200
LVM/BSA (g/m <sup>2</sup> )	-	44-88	-	50-102

Figure 18. Valeurs de référence des dimensions cardiaques (d'après Lang *et al.*, 2015).

#### Hypertrophie ventriculaire gauche

L'examen de la morphologie cardiaque permet d'évaluer et de caractériser le remodelage et l'hypertrophie ventriculaires à partir de la LVM et du calcul de l'épaisseur pariétale relative (RWT) :

$$RWT = (IVS+PW)/LVDD$$

Une LVM/BSA >95g/m<sup>2</sup> pour une femme ou >115g/m<sup>2</sup> pour un homme définit ainsi une hypertrophie et un RWT >0,42 indique un phénotype concentrique. Les 4 géométries cardiaques (géométrie normale, remodelage concentrique, hypertrophie concentrique et hypertrophie excentrique) sont présentées figure 19 (Lang *et al.*, 2015a).

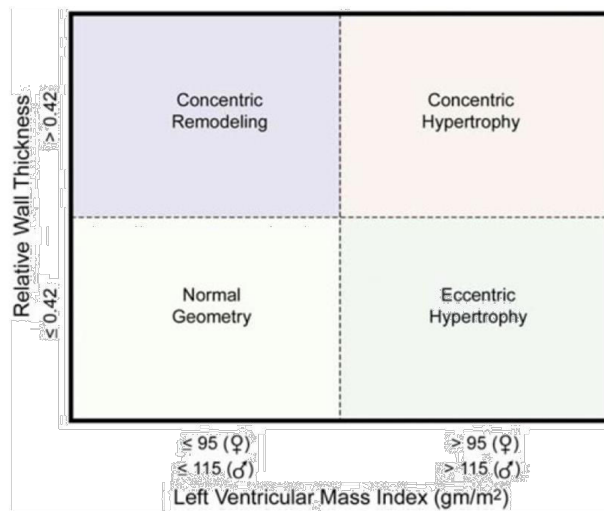
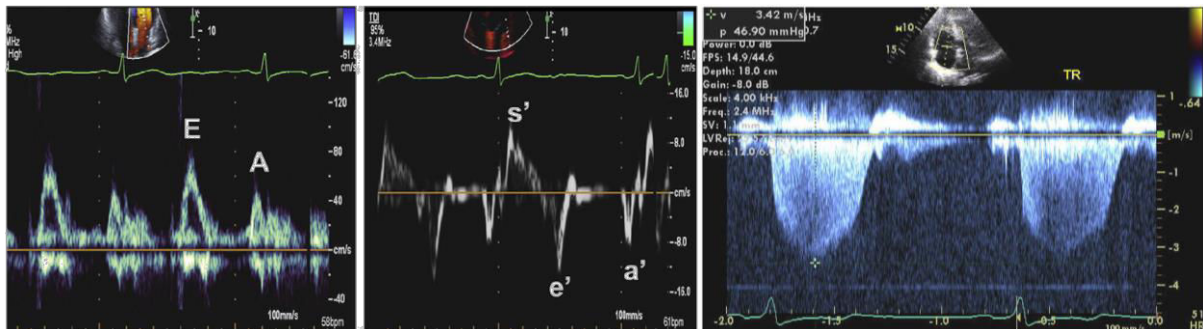


Figure 19. Classification de la géométrie cardiaque en fonction de la masse ventriculaire gauche indexée et de l'épaisseur pariétale relative (Lang *et al.*, 2015).

## 2. Fonction diastolique

Chez un individu sain, le remplissage du VG est principalement (~90%) passif, il est dû au gradient de pression atrio-ventriculaire qui se crée lorsque le VG se relâche (phénomène de suction), le remplissage actif par contraction auriculaire n'intervenant que dans une moindre mesure (Jia *et al.*, 2016). Une altération de la relaxation cardiaque, accompagnée de phénomènes de remodelage structural pariétal, vont conduire dans la durée à une augmentation des pressions de remplissage, qui va se répercuter sur l'oreillette gauche et provoquer ainsi sa dilatation (Jia *et al.*, 2016; Nagueh *et al.*, 2016).

Les recommandations actuelles émises par l'American Society of Echocardiography et l'European Society of Cardiovascular Imaging pour l'évaluation de la fonction diastolique font donc intervenir la mesure du pic de vitesse protodiastolique E (remplissage passif) du flux mitral, des pics de vitesse protodiastolique e' des parois septales et latérales, du volume indexé de l'oreillette gauche et du flux de régurgitation tricuspide systolique (TR) (figure 20) (Nagueh *et al.*, 2016).



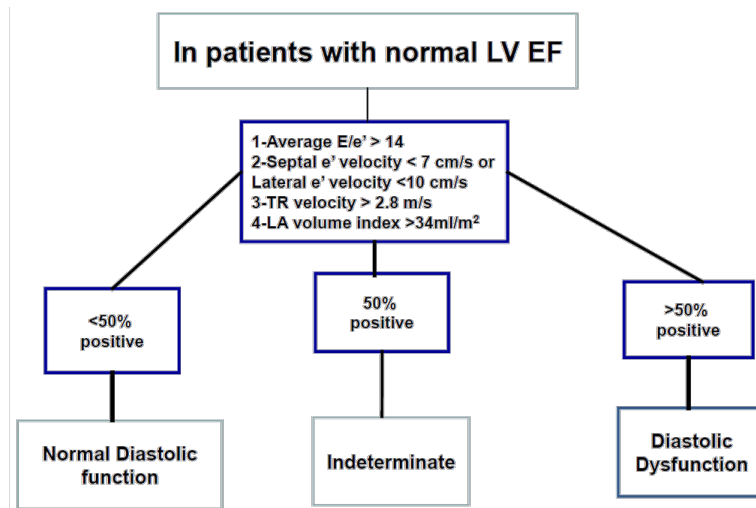
**Figure 20. Exemple de mesure des pics protodiastoliques E et e' ainsi que du flux de régurgitation tricuspide (adapté de Nagueh *et al.*, 2016).** A : pic diastolique tardif du flux mitral ; E : pic protodiastolique du flux mitral ; a' : pic diastolique tardif pariétal ; e' : pic protodiastolique pariétal ; s' : pic systolique pariétal ; TR : flux de régurgitation tricuspide.

Ces paramètres sont influencés par la relaxation cardiaque, mais également le gradient de pression LA/VG et la pression intra-LA. Les méthodes d'acquisition recommandées et le contexte de l'utilisation de ces indices sont résumés figure 21. La mesure des pic E et e' autorise le calcul du ratio E/e', un indicateur des pressions de remplissage du VG (Nagueh *et al.*, 2016).

Paramètre	Acquisition	Contexte
<b>Pic E</b>	Coupe 4C, Doppler pulsé à l'extrémité des valves mitrales	Reflet du gradient de pression LA/VG
<b>Pics e'</b>	Coupe 4C, TDI à l'anneau mitral, parois septales et latérales	Fonction régionale myocardique, dépend de la relaxation du myocarde
<b>Volume LA</b>	Coupes 4C et 2C, calcul par méthode biplan ou de l'aire de la longueur, avant l'ouverture des valves mitrales	Reflet de l'augmentation chronique des pressions de remplissage
<b>Flux TR</b>	Coupes PSLAX et 4C, Doppler continu avec imagerie de couleur	Reflet de la pression intra-LA, en l'absence de pathologie pulmonaire

**Figure 21. Acquisition et contexte d'utilisation des quatre paramètres préconisés pour identifier une dysfonction diastolique, selon les recommandations de l'ASE et de l'EACVI (d'après Nagueh *et al.*, 2016).** LA : oreillette gauche ; Pic E : pic de vitesse du flux protodiastolique mitral ; pic e' : pic de vitesse protodiastolique pariétal ; PSLAX : coupe parasternale grand axe ; TR : flux de régurgitation tricuspide ; VG : ventricule gauche ; 2/4C : coupes apicales 2 et 4 cavités.

Chez le sujet ne présentant pas de dysfonction systolique globale (FE normale), ce qui est le cas chez la majorité des patients T2DM, le dépassement de 50% des valeurs seuil des critères d'évaluation, définit la dysfonction diastolique. Ces valeurs seuil sont indiquées dans l'arbre décisionnel, figure 22 (Nagueh *et al.*, 2016).



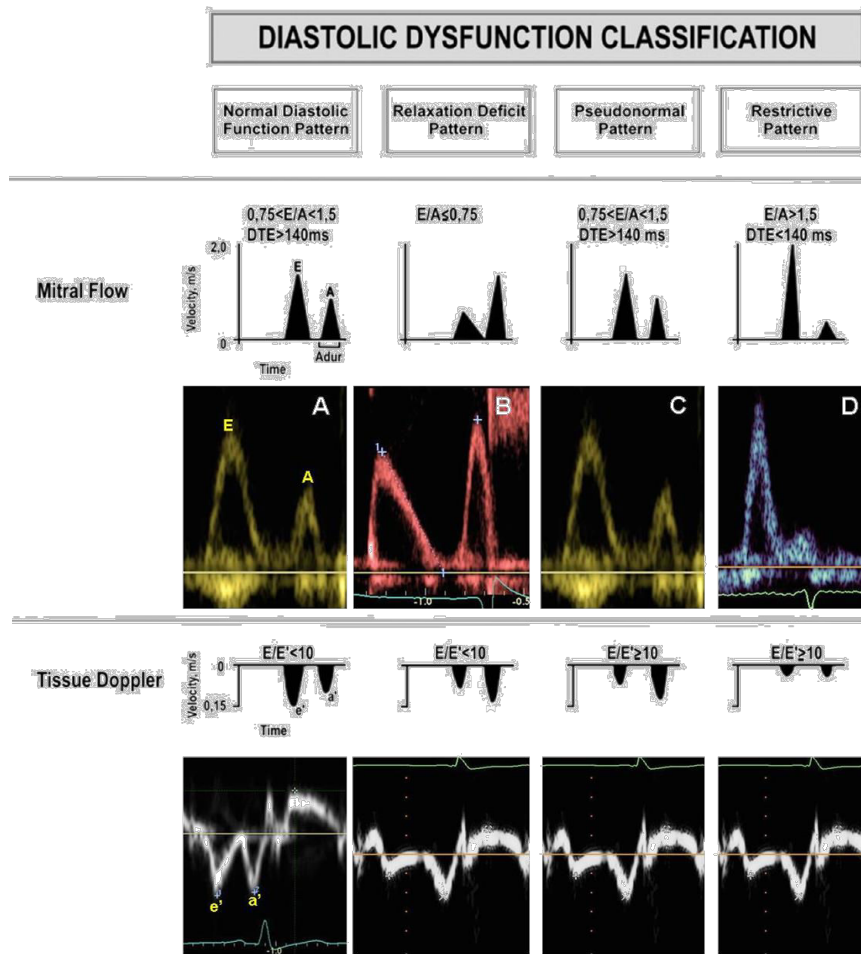
**Figure 22. Valeurs seuil et arbre décisionnel pour la classification de la fonction diastolique chez le patient présentant une fraction d'éjection préservée (adapté de Nagueh *et al.*, 2016).** Si le patient remplit plus de la moitié des critères indiqués, il présente une dysfonction diastolique. EF : fraction d'éjection ; LA : oreillette gauche ; LV : ventricule gauche ; TR : flux de régurgitation tricuspide.

Chez les patients présentant une dysfonction diastolique, une évaluation du grade de la dysfonction est réalisée. Trois grades sont classiquement décrits, en fonction de l'intensité de l'élévation de la pression intra-atriale et du volume de l'OG. Les différentes variables d'intérêt et leurs valeurs seuil sont indiquées figure 23.

	Normal	Grade I	Grade II	Grade III
LV relaxation	Normal	Impaired	Impaired	Impaired
LAP	Normal	Low or normal	Elevated	Elevated
Mitral E/A ratio	$\geq 0.8$	$\leq 0.8$	$> 0.8$ to $< 2$	$> 2$
Average E/e' ratio	$< 10$	$< 10$	10–14	$> 14$
Peak TR velocity (m/sec)	$< 2.8$	$< 2.8$	$> 2.8$	$> 2.8$
LA volume index	Normal	Normal or increased	Increased	Increased

**Figure 23. Gradation de la dysfonction diastolique (adapté de Nagueh *et al.*, 2016).** E/A : ratio entre le pic protodiastolique mitral E et le pic diastolique tardif mitral A ; E/E' : ratio entre les pics protodiastoliques E mitral et e' pariétal ; LAP : pression intra-auriculaire ; LV : ventricule gauche ; TR : flux de régurgitation tricuspide.

Outre les paramètres précédemment mesurés, le pic de vitesse diastolique tardif du flux mitral (A) est également pris en compte dans cette gradation, pour le calcul du ratio E/A. Ce ratio, avec le ratio E/e', définit le profil du remplissage cardiaque : normal, altération de la relaxation, pseudo-normal et restrictif (figure 24) (Danzmann *et al.*, 2008; Borlaug & Fine, 2016).



**Figure 24. Classification des profils de remplissage cardiaque, selon le flux mitral et le Doppler tissulaire (adapté de Danzmann *et al.*, 2008; Borlaug & Fine, 2016).** DTE : temps de décélération de l'onde protodiastolique mitrale E ; E/A : ratio entre le pic protodiastolique mitral E et le pic diastolique tardif mitral A ; E/E' : ratio entre les pics protodiastoliques E mitral et e' pariétal.

### 3. Fonction systolique

L'évaluation de la fonction systolique globale repose principalement sur la mesure de la FE. Elle est calculée à partir des LVEDV et LVESV précédemment évalués (Lang *et al.*, 2015a; Ponikowski *et al.*, 2016):

$$EF (\%) = (LVEDV - LVESV) / LVEDV$$

Selon les recommandations de l'American Society of Echocardiography et de l'European Society of Cardiovascular Imaging, les valeurs normales d'EF sont >54% chez la femme et >52% chez l'homme (Lang *et al.*, 2015a). D'après l'European Society of Cardiology, des valeurs de FE situées sous ce seuil mais >40% définissent une insuffisance cardiaque à fraction d'éjection intermédiaire (HFmEF), quand une fraction d'éjection <40% définit l'HFrEF (Ponikowski *et al.*, 2016). En outre, selon la *Heart Failure*



*Association et l'European Society Of Cardiovascular Imaging*, le LVEDV et le LVESV ne doivent pas dépasser  $97\text{mL/m}^2$  et  $49\text{mL/m}^2$ , respectivement (Paulus *et al.*, 2007).

## 2- Perspectives

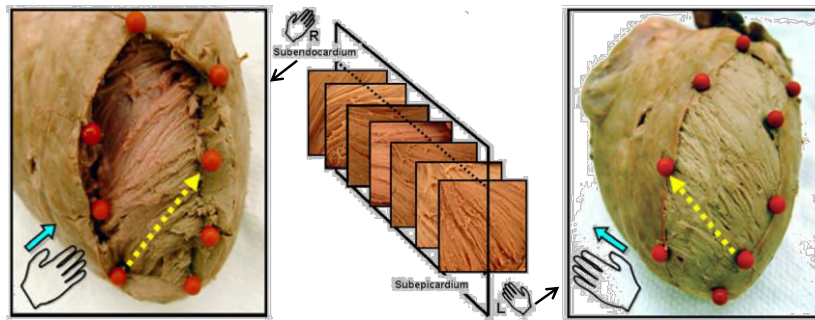
Les approches actuelles d'évaluation de la fonction cardiaque considèrent le remodelage et la fonction globale de pompe du cœur. Cependant, l'altération des indices utilisés dans ces approches n'est souvent constatée qu'à un stade de progression avancé de la pathologie, en particulier pour la fonction systolique. La dépendance de ces indices aux conditions de charge ne permet pas une bonne appréciation des propriétés contractiles et de relaxation intrinsèques du myocarde. Or, être en capacité d'évaluer ces propriétés permettrait de dépister à un stade plus précoce les altérations de la fonction cardiaque. Afin de répondre à cette nécessité, des techniques d'imagerie de déformation, permettant l'évaluation de la fonction régionale myocardique et proposant des indices moins sensibles aux conditions de charge, se sont développées ces dernières années. Leur utilisation pourrait permettre un dépistage plus précoce de la DMCM chez les patients T2DM asymptomatiques.

### *a) Évaluation de la fonction régionale myocardique par imagerie de déformation*

#### 1. Le muscle cardiaque

Afin de mieux appréhender les différents indices de la fonction régionale myocardique, un bref rappel sur l'anatomie et la mécanique de la contraction cardiaques peut être utile.

Les fibres myocardiques du VG sont organisées de manière héliocoïdale et confèrent au VG une structure chirale. Selon leur localisation au sein du mur myocardique, les fibres vont présenter une orientation soit dextrogyre, soit lévogyre. Selon l'axe longitudinal du cœur, les fibres ont une orientation dextrogyre et assez verticale au niveau du sous-endocarde, elles prennent ensuite majoritairement une orientation circonférentielle dans le mur médian, avant de devenir lévogyres au niveau du sous-épicarde avec une orientation très oblique (illustré figure 25) (Sengupta *et al.*, 2007).



**Figure 25. Orientation des fibres cardiaques, du sous-endocarde au sous-épicarde (adapté de Sengupta *et al.*, 2007). L : orientation lévogyre ; R : orientation dextrogyre.**

Cette architecture particulière permet de mieux comprendre la mécanique cardiaque observée pendant les différentes phases du cycle.

La dépolarisation du cœur débute au niveau des fibres sous-endocardiques apicales de la paroi antérieure du VG et libre du ventricule droit (VD), puis se diffuse vers la base, le dernier segment activé étant le segment basal postérieur. La diffusion du signal au sous-épicarde se fait selon une rotation horaire. La contraction précoce des fibres sous-endocardiques coïncide avec une élévation des pressions intra-VG, alors que la contraction des fibres sous-épiscopardiques correspond à la phase d'éjection. Le laps de temps qui s'écoule entre les deux est la contraction isovolumique, pendant laquelle les fibres sous-endocardiques sont contractées et les fibres sous-épiscopardiques étirées. À l'instar de la dépolarisation, la vague de contraction se diffuse de l'apex à la base du cœur. L'orientation des fibres induit pendant la phase isovolumique une petite rotation apicale horaire, alors que pendant la phase d'éjection, la contraction de l'ensemble du mur myocardique induit une rotation antihoraire de l'apex, couplée à une rotation horaire de la base. Ce mécanisme conduit à un phénomène de torsion, qui permettrait d'uniformiser la distribution du stress et le raccourcissement des fibres ainsi que de potentialiser la fraction d'éjection par rapport au raccourcissement des fibres (Sengupta *et al.*, 2006, 2007, 2008; Stöhr *et al.*, 2016).

La repolarisation suit le chemin inverse de la dépolarisation, elle se diffuse de la base à l'apex, le sous-épiscoparde apical étant la dernière région repolarisée. Cependant, la relaxation débute au niveau du sous-endocarde apical, juste avant la fermeture des valves aortiques, et se répand vers la base pendant la phase de relaxation isovolumique. Le sous-épiscoparde, en revanche, suit un schéma inverse, en se relâchant de la base à l'apex après la fermeture des valves et pendant la phase de remplissage précoce du VG. Cette relaxation différentielle des zones du mur myocardique provoque au niveau du VG la création d'un gradient de relaxation transmural, mais également apex-base. La





chute des pressions à l'apex crée ainsi le phénomène de succion dont dépend la phase précoce passive du remplissage diastolique. Cette phase dépend également de façon majeure du phénomène de détorsion. Pendant la phase de torsion systolique, les fibres sous-endocardiques ont accumulé de l'énergie cinétique, à la façon d'un ressort. Le relâchement de ces fibres et la restitution de l'énergie, emmagasinée dans les tissus conjonctifs et à l'étage sarcomérique par la molécule de titine (un « élastique moléculaire », qui conditionne plus de 80% de la rigidité du sarcomère à l'état étiré) lors de la détorsion, se traduit par une rotation horaire rapide de l'apex. Le fait que le sous-épicaire apical soit le dernier segment à se relâcher aide, avec la relaxation du sous-endocarde, à l'ouverture de la cavité ventriculaire au niveau de l'apex, ce qui renforce le gradient de pression et donc la succion (Sengupta *et al.*, 2006, 2007; Stöhr *et al.*, 2016).

## 2. Évaluation de la fonction régionale myocardique par échocardiographie

Afin d'évaluer la fonction régionale myocardique, deux techniques échocardiographiques sont actuellement employées : le Doppler tissulaire (TDI) et le *speckle-tracking imaging* (STI).

### Le Doppler tissulaire

Le TDI est la première technique d'évaluation de la fonction régionale myocardique par échocardiographie à avoir été développée, dans le courant des années 1990 (Gorcsan *et al.*, 1996). Son principe repose sur la mesure de la vitesse de déplacement des parois myocardiques par effet Doppler. Deux techniques différentes existent : le TDI couleur et le TDI pulsé.

La technique la plus couramment utilisée en pratique aujourd'hui est la technique de TDI pulsée, qui permet l'obtention, en un point précis et avec une haute résolution temporelle, d'un spectre de vitesse et donc des pics de vitesse systolique  $s'$ , protodiastolique  $e'$  et diastolique tardif  $a'$  (illustré figure 26) (Nikitin & Witte, 2004; Ho, 2006; Yu *et al.*, 2007; Mor-Avi *et al.*, 2011). La mesure Doppler étant dépendante de l'angle, le déplacement mesuré doit être le plus parallèle possible au faisceau ultrasonore, un angle maximal de  $15^\circ$  étant recommandé (Nikitin & Witte, 2004; Ho, 2006; Yu *et al.*, 2007; Mor-Avi *et al.*, 2011). C'est pourquoi, dans la pratique, ce sont les vitesses de déplacement longitudinales, en coupe apicale, qui sont évaluées. L'apex étant peu mobile, la mesure s'effectue à hauteur de l'anneau mitral (Nikitin & Witte, 2004; Ho, 2006; Yu *et al.*, 2007; Mor-Avi *et al.*, 2011). L'indice le plus couramment utilisé est  $e'$ , mesuré au niveau des parois septales et latérales, il fait en effet partie des points clés de l'évaluation de la fonction diastolique d'après les dernières recommandations (Nagueh *et al.*, 2016).

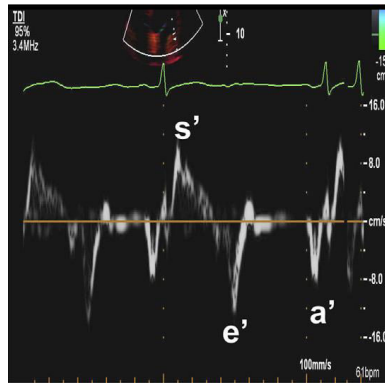


Figure 26. Spectre de vitesse obtenu en Doppler pulsé avec pics de vitesse systolique  $s'$ , protodiastolique  $e'$  et diastolique tardif  $a'$  (adapté de Nagueh *et al.*, 2016).

Le TDI couleur, quant à lui, superpose à l'image 2D (ou au mode TM) un codage couleur, colorant en rouge les mouvements en direction de la sonde et en bleu les mouvements s'en éloignant, en y associant une échelle d'intensité de ces couleurs pour représenter les vitesses (Nikitin & Witte, 2004). Ce système permet au clinicien une évaluation visuelle des mouvements de l'ensemble de la paroi myocardique ainsi que l'analyse, en post-traitement, des vitesses moyennes, du déplacement, du *strain* (déformation) et du *strain rate* (taux de déformation) (figure 27) (Nikitin & Witte, 2004; Ho, 2006; Mor-Avi *et al.*, 2011). Le déplacement  $d$  est calculé comme étant l'intégrale temporelle de la vitesse  $v$  du tissu :

$$d = \int v dt$$

Le *strain*  $\epsilon$  et le *strain rate*  $\epsilon_R$  sont eux dérivés des données de vitesse.  $\epsilon_R$  est calculé comme étant la différence des vitesses  $v_1$  et  $v_2$  entre deux échantillons, divisée par la distance qui les sépare  $r$ .  $\epsilon_R$  étant la dérivée temporelle de  $\epsilon$ ,  $\epsilon$  peut alors être calculé comme étant l'intégrale temporelle d'  $\epsilon_R$  (Mor-Avi *et al.*, 2011) :

$$\epsilon_R = (v_2 - v_1) / r$$

et

$$\epsilon = \int \epsilon_R dt$$

De la même façon qu'en Doppler pulsé, le déplacement de la zone évaluée doit être parallèle au faisceau ultrasonore, une analyse du strain en TDI couleur impose donc des acquisitions séparées avec des repositionnements adaptés de la sonde en fonction de la zone à traiter (Mor-Avi *et al.*, 2011). D'autre part, le  $\epsilon$  et le  $\epsilon_R$  dérivés du TDI présentent des artéfacts dont l'identification demande

de l'expérience (Mor-Avi *et al.*, 2011). Ces limitations, associées à une reproductibilité médiocre, ont conduit à la supplantation de cette technique par le STI.

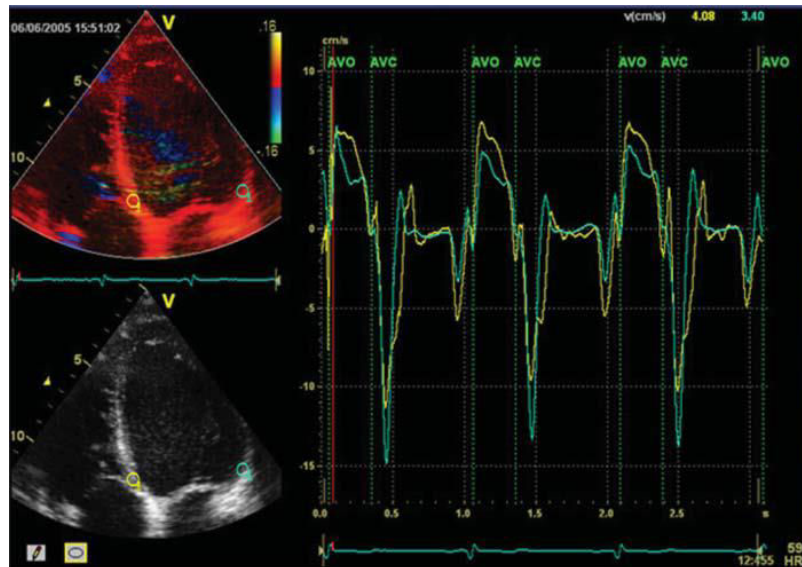


Figure 27. Analyse des vitesses de déplacement en Doppler tissulaire couleur (adapté de Mor-Avi *et al.*, 2011). Les zones évaluées sont indiquées par les cercles jaune et vert.

#### Le speckle-tracking imaging

Le STI est aujourd'hui la technique de choix pour l'évaluation de la fonction régionale myocardique par échocardiographie. Cette technologie, qui s'est développée au début des années 2000, permet d'évaluer les déformations myocardiques locales par un algorithme de suivi des marqueurs acoustiques situés dans une région d'intérêt, dont la position est stable au niveau du myocarde, image après image et dans toutes les directions (figure 28) (Korinek *et al.*, 2005; Amundsen *et al.*, 2006; Dandel *et al.*, 2009; Mor-Avi *et al.*, 2011). Cette technique présente de nombreux avantages par rapport au TDI, elle permet en effet d'évaluer à partir d'un seul clip 2D les déformations de l'ensemble du myocarde, de façon multidirectionnelle et sans dépendance à l'angle d'acquisition (Korinek *et al.*, 2005; Dandel *et al.*, 2009; Mor-Avi *et al.*, 2011).

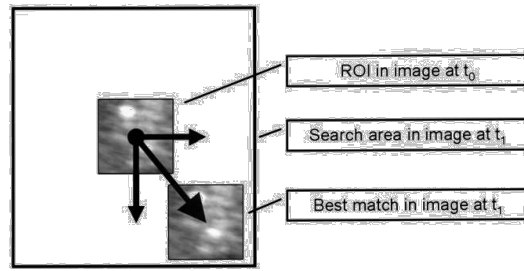


Figure 28. Principe du suivi des marqueurs acoustiques image après image (Amundsen *et al.*, 2006). ROI: zone d'intérêt ; t : temps.

L'analyse en STI est réalisée en post-traitement, à partir d'un clip préenregistré d'un cycle cardiaque. La région d'intérêt est définie en TD comme étant la zone située entre les bords épicaudique et endocaudique (Voigt *et al.*, 2015). Le tracé de cette zone peut être fait manuellement ou automatiquement. Le logiciel effectue ensuite le suivi des marqueurs de cette zone grâce à un algorithme et segmente le myocarde, ce qui permet d'obtenir des résultats régionalisés (figures 29 et 30) (Voigt *et al.*, 2015). Un modèle de segmentation en 17 segments est préconisé (schéma de segmentation présenté figure 30) (Lang *et al.*, 2015a).

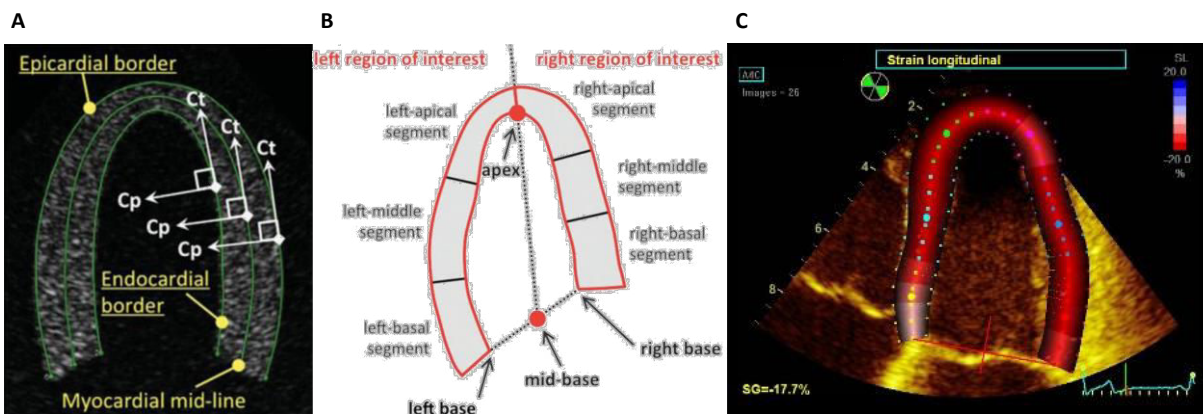


Figure 29. A) définition de la région d'intérêt, B) règle de segmentation et C) rendu final en *speckle-tracking imaging*, sur une coupe apicale (adapté de Voigt *et al.*, 2015).

Les déformations longitudinales sont évaluées à partir des coupes apicales 2C, 3C et 4C, les déformations circonférentielles à partir des coupes parasternales petit axe (PSAX) et les radiales sur l'ensemble des coupes précédemment citées (les différentes directions des déformations sont illustrées figure 31).

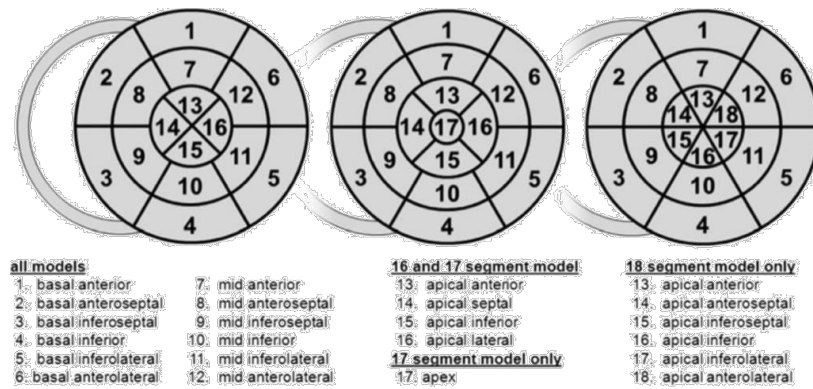


Figure 30. Nomenclature des segments selon le modèle utilisé (adapté de Voigt *et al.*, 2015).

L'intérêt majeur du STI est qu'il permet également, à partir des coupes PSAX obtenues à la base et à l'apex, l'évaluation de la rotation et ainsi l'estimation de la torsion « twist » (deg) myocardique du VG, deux éléments majeurs de sa fonction (voir II-2-a)1.) (figure 31) (Voigt *et al.*, 2015). Une attention toute particulière doit cependant être apportée dans l'acquisition des images servant à les calculer, la valeur de la rotation variant fortement suivant le niveau de la zone de mesure, tout particulièrement à l'apex (Stöhr *et al.*, 2016). De plus, le twist ainsi estimé ne prend pas en compte la variation de la dimension du VG sur son grand axe pendant le cycle cardiaque ; il est par ailleurs obtenu à partir de rotations mesurées sur des cycles cardiaques différents et donc potentiellement acquises à des FC différentes. Une des solutions à ces limites est le développement du STI 4D. Cette nouvelle technologie permet une acquisition volumique de l'ensemble du cœur et une analyse multidirectionnelle des déformations sur un cycle cardiaque reconstitué, ce qui permet également de normaliser la différence entre les rotations basales et apicales à la longueur du grand axe et de mieux appréhender l'estimation de la torsion « torsion » (deg/cm) ventriculaire (Voigt *et al.*, 2015).

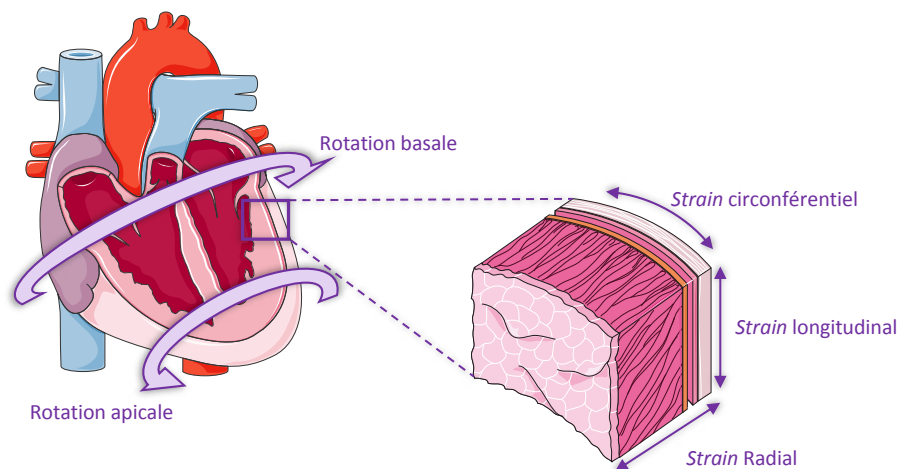
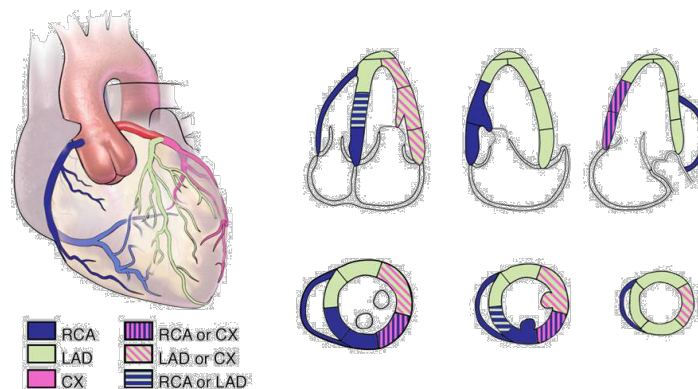


Figure 31. Schéma représentatif des indices fonctionnels évalués en *speckle-tracking imaging*.



À l'heure actuelle, l'élément le plus utilisé en clinique est le S longitudinal (LS) global (GLS) systolique, qui est la moyenne entre les LS en coupes apicales 2C, 3C et 4C (Lang *et al.*, 2015a). Si l'*American Society of Echocardiography* et l'*European Society Of Cardiovascular Imaging* n'ont pas été en mesure, dans leurs dernières recommandations, de donner une valeur seuil de GLS définissant une dysfonction systolique, elles estiment qu'une valeur de -20% peut être attendue chez une personne saine (Lang *et al.*, 2015a). En routine, ce GLS est utilisé pour détecter les segments ischémiques, qui apparaîtront hypo- ou akinétiques. La segmentation aide par ailleurs à l'identification de la ou des coronaire(s) impliquée(s) (Lang *et al.*, 2015a).



**Figure 32. Utilité du *speckle-tracking imaging* en clinique : la localisation des segments hypokinétiques aide à localiser la zone ischémisée et indique quelle(s) coronaire(s) peu(ven)t être impliquée(s) (Lang *et al.*, 2015). CX : artère circonflexe ; LAD : artère interventriculaire antérieure ; RCA : artère coronaire droite.**

Cette technique a été validée contre l'imagerie par résonance magnétique et la sonomicrométrie et sa principale limite repose sur l'échogénicité du patient, dont dépend la qualité du suivi des marqueurs (Korinek *et al.*, 2005; Amundsen *et al.*, 2006; Dandel *et al.*, 2009; Mor-Avi *et al.*, 2011). Cependant, il existe également une variabilité inter-vendeurs. Si un travail d'harmonisation a été réalisé par l'*American Society of Echocardiography* et l'*European Society Of Cardiovascular Imaging* en collaboration avec les industriels concernant les formules de calcul et les définitions des variables, les algorithmes de suivi sont, quant à eux, toujours dépendants du vendeur (Voigt *et al.*, 2015).

### 3. La fonction régionale myocardique dans le diabète de type 2

De nombreuses études, utilisant soit le TDI, soit le STI, se sont penchées sur la fonction régionale myocardique dans le T2DM. Les résultats de ces travaux sont synthétisés figure 33. La principale avancée qui a été permise par ces techniques est la démonstration de la présence d'une dysfonction systolique régionale chez les patients présentant une FE préservée (Fang *et al.*, 2004; Govind *et al.*, 2006; Moir *et al.*, 2006; Ng *et al.*, 2009; Nakai *et al.*, 2009; Ernande *et al.*, 2010; Zhang



*et al.*, 2013; Zoroufian *et al.*, 2014; Karagöz *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014b; Tadic *et al.*, 2015; Enomoto *et al.*, 2016). Cependant, la présence de cette dysfonction systolique n'a pas été systématiquement rapportée (Galderisi *et al.*, 2007; Cognet *et al.*, 2013; Cadeddu *et al.*, 2013; Wierzbowska-Drabik *et al.*, 2015), ce qui pourrait s'expliquer par la grande variabilité dans les critères de recrutement des populations de diabétiques évaluées. Des études ont en effet mis en évidence des relations entre la dysfonction régionale myocardique et la durée du diabète, la présence de complications ou bien encore le niveau de contrôle de la glycémie (Nakai *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2013; Zhen *et al.*, 2015; Enomoto *et al.*, 2016). D'autres facteurs confondants, comme la présence -ou non- d'une hypertension, doivent également être pris en considération (Govind *et al.*, 2006).

La pertinence de l'évaluation de la fonction régionale myocardique chez le T2DM est corroborée par sa valeur pronostique des événements cardiovasculaires dans cette population. Sur des périodes de suivi allant de 33 mois à 10 ans, trois études ont montré que, chez des patients avec FE préservée, le GLS était prédictif des événements cardiovasculaires, avec des risques relatifs de 1,10 à 1,39 et une sensibilité de 77,8% pour une valeur seuil de GLS à -17,9%, (Russo *et al.*, 2014; Holland *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2016).

Il est à noter que la majorité des études réalisées n'ont considéré que la fonction longitudinale. Or, la fonction circonférentielle, ainsi que la mécanique de rotation/torsion sont des éléments importants de la fonction cardiaque (voir II-2-a)1. (Sengupta *et al.*, 2008; Stöhr *et al.*, 2016). Les études s'étant penchées sur ces indices ont rapporté des résultats divergents et de plus amples recherches sont donc nécessaires dans ce domaine (Ng *et al.*, 2009; Nakai *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2013; Karagöz *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014b; Tadic *et al.*, 2015; Enomoto *et al.*, 2016).



Auteur	Technologie	HbA1c	Complications	Autre	FE	LS	CS	RS	Rot. apicales	Rot. basales	Torsion
Fang <i>et al.</i> , 2004	TDI	7,8%	oui	T2DM + T1DM	NS	↘	-	↘	-	-	-
Moir <i>et al.</i> , 2006	TDI	-	oui	-	NS	↘	-	-	-	-	-
Govind <i>et al.</i> , 2006	TDI	-	oui	-	NS	NS	-	-	-	-	-
Galderisi <i>et al.</i> , 2007	TDI	7,1%	oui	dyslipidémie	NS	NS	-	-	-	-	-
Nakai <i>et al.</i> , 2009	2D-STI	8,1%	oui	HTA, dyslipidémie	NS	↘	↘	↘	-	-	-
Ng <i>et al.</i> , 2009	2D-STI	-	non	HTA	NS	↘	NS	NS	-	-	-
Ernande <i>et al.</i> , 2010	2D-STI	7,7%	oui	HTA, dyslipidémie	NS	↘	-	↘	-	-	-
Cadeddu <i>et al.</i> , 2013	TDI	-	oui	-	NS	NS	-	-	-	-	-
Zhang <i>et al.</i> , 2013	4D-STI	6,1%	oui	-	NS	↘	NS	NS	-	-	-
		9,1%		dyslipidémie	NS	↘	↘	↘	-	-	-
Cognet <i>et al.</i> , 2013	2D-STI	7,0%	oui	-	NS	NS	-	-	-	-	-
Karagöz <i>et al.</i> , 2014	2D-STI	-	oui	-	NS	↘	↘	-	↘	↘	↘
Wang <i>et al.</i> , 2014	4D-STI	7,0%	oui	IMC=22,77	NS	↘	↘	↘	-	-	-
		7,1%		IMC=26,90	↘	↘	↘	↘	-	-	-
Zoroufian <i>et al.</i> , 2014	2D-STI	7,9%	oui	dyslipidémie	NS	↘	-	-	-	-	-
Tadic <i>et al.</i> , 2015	2D-STI	7,4%	oui	T2DM non-traité, dyslipidémie	NS	↘	↘	↘	-	-	NS
Wierzbowska-Drabik <i>et al.</i> , 2015	2D-STI	-	oui	dyslipidémie	NS	NS	-	-	-	-	-
Enomoto <i>et al.</i> , 2015	4D-STI	10,6%	oui	HTA	NS	↘	↘	NS	-	-	-

**Figure 33. Résumé des données disponibles dans la littérature concernant la fonction régionale myocardique dans le diabète de type 2, comparé à des populations contrôles.** IMC : indice de masse corporelle ; CS : *strain* circonférentiel ; FE : fraction d'éjection ; HbA1c : hémoglobine glyquée ; HTA : hypertension ; LS : *strain* longitudinal ; NS : non significatif versus contrôles ; Rot. : rotations ; RS : *strain* radial ; TDI : Doppler tissulaire ; T1-/T2DM : diabète de type 1/-2 ; 2D-/4D-STI : *speckle-tracking imaging* bi-/quadridimensionnel.

La disparité des résultats rapportés par les études s'étant intéressées à la fonction régionale myocardique dans le T2DM, souligne la nécessité d'approfondir les recherches en sélectionnant notamment des populations de patients asymptomatiques, présentant un diabète non compliqué et un contrôle satisfaisant de la glycémie. Par ailleurs, ces divergences pourraient être symptomatiques des limites de la sensibilité d'une évaluation au repos. Évaluer la fonction régionale du myocarde soumis à un stress pourrait ainsi potentiellement permettre de révéler des altérations fonctionnelles restant discrètes au repos.

## b) L'échocardiographie de stress

### 1. Généralités

L'échocardiographie de stress est historiquement utilisée dans le diagnostic précoce des ischémies (Sicari *et al.*, 2008; Lancellotti *et al.*, 2016). Elle repose sur le principe simple selon lequel, lors d'un stress, la demande en oxygène du myocarde augmente. Si un déséquilibre local se crée entre cette demande et l'apport en oxygène, une zone ischémique se crée et se révèle alors par une altération de la fonction régionale myocardique, au niveau d'un segment qui apparaissait pourtant





normal au repos (Sicari *et al.*, 2008; Lancellotti *et al.*, 2016). Les techniques de stress classiquement retrouvées sont l'exercice physique, la dobutamine (DB) et les agents vasodilatateurs (Sicari *et al.*, 2008; Lancellotti *et al.*, 2016). Ces trois techniques présentent la même précision et la même sensibilité, mais ont des mécanismes d'action différents (Sicari *et al.*, 2008).

L'exercice est la modalité la plus recommandée car elle préserve les mécanismes électromécaniques et hémodynamiques physiologiques. Cependant, il peut ne pas être réalisable chez certains patients et présenter des difficultés dans l'acquisition des paramètres échocardiographiques, en raison des mouvements importants de la cage thoracique qu'il entraîne (Sicari *et al.*, 2008; Lancellotti *et al.*, 2016).

L'agent vasodilatateur le plus communément utilisé est le dipyridamole, qui agit en augmentant le taux d'adénosine endogène. À l'inverse de l'exercice physique, cet agent va induire une légère baisse de l'apport sanguin, qui se caractérise sur le plan clinique par une réduction de la PA, une petite tachycardie et une légère augmentation de la fonction myocardique. Le dipyridamole révèle les zones ischémisées par le phénomène de « steal » (vol) : si une coronaire est sténosée, la vasodilatation va entraîner une chute des pressions post-sténose et le sous-épicaarde va alors « voler » le flux sanguin alimentant le sous-endocarde, entraînant sa dysfonction (Sicari *et al.*, 2008; Lancellotti *et al.*, 2016).

La DB est en revanche un agent agoniste  $\alpha_1$ - et  $\beta_{1\&2}$ -adrénergique, elle va donc induire des effets cardiaques inotropes, chronotropes, bathmotropes, dromotropes et lusitropes positifs. Elle peut ainsi augmenter la fréquence cardiaque (FC) jusqu'à 3 fois, le volume TD 1,2 fois et la PA systolique jusqu'à 2 fois. Comparée à l'exercice, la DB induit une augmentation plus mineure du *wall stress* (stress pariétal) et des volumes du VG (Lancellotti *et al.*, 2016). **C'est cette modalité de stress qui a été retenue dans ces travaux de thèse.**

Le protocole d'échocardiographie repose sur le même principe quelle que soit la technique employée : une première mesure des paramètres échocardiographiques est réalisée au repos (RP), le stress est ensuite appliqué de manière incrémentale jusqu'à un pic, puis une période de récupération est observée. Pour l'exercice, l'incrémental est réalisée avec des paliers de charge croissante (+15-25 watts/3min), jusqu'à l'atteinte de la FC maximale ; pour les agents pharmacologiques, des doses incrémentales sont perfusées par paliers de 5 min pour la DB et par paliers variant de 4 à 6 min pour les agents vasodilatateurs (Lancellotti *et al.*, 2016). Le protocole d'échocardiographie de stress à la DB recommandé par l'American Society of Echocardiography et l'European Society Of Cardiovascular Imaging est décrit figure 34.

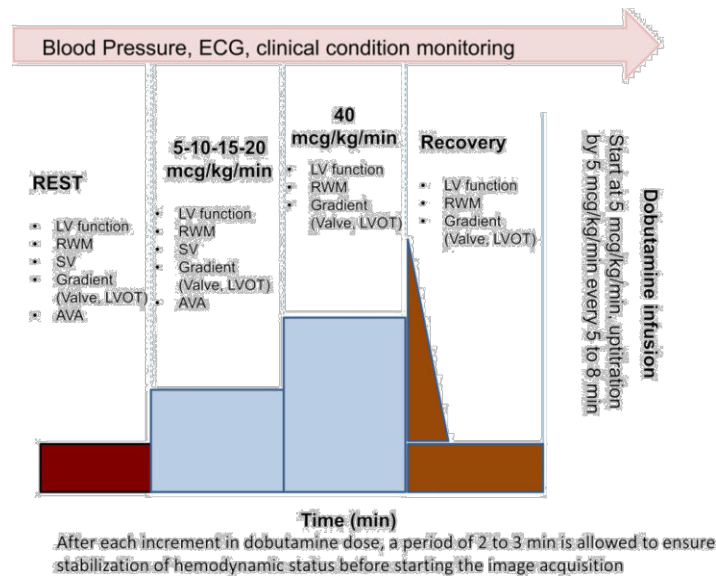


Figure 34. Protocole de stress à la dobutamine recommandé par l'ASE et l'EACVI (Lancellotti *et al.*, 2016).

Depuis maintenant quelques années, l'utilisation de l'échocardiographie de stress s'est élargie au diagnostic et à l'évaluation du pronostic de nombreuses cardiopathies non ischémiques, comme la cardiopathie hypertrophique, les valvulopathies, l'hypertension pulmonaire, ou bien encore les cardiopathies congénitales. Dans ces cas, l'échocardiographie de stress est aujourd'hui recommandée dans la stratification du risque, le pronostic de l'évolution de la maladie et de la réponse à des traitements (Lancellotti *et al.*, 2016).

## 2. L'échocardiographie de stress chez le patient diabétique

Chez le patient diabétique, l'échocardiographie de stress (quelle que soit sa modalité) est classiquement utilisée dans la détection de la coronaropathie et dans la stratification du risque, où elle a montré de bons résultats dans le pronostic des événements et de la mortalité cardiovasculaire des patients (Penfornis *et al.*, 2001; Marwick *et al.*, 2002; Innocenti *et al.*, 2014; Cortigiani *et al.*, 2015, 2017).

Très peu d'études se sont penchées sur le potentiel de cette technique, couplée à l'imagerie de déformation, dans le dépistage des altérations précoces de la fonction régionale myocardique dans le T2DM. Ces études ont cependant rapporté des résultats intéressants, résumés figure 35.



Auteur	Technologie	Stress	Repos	Pic de stress	Delta repos-stress	Récupération
Govind <i>et al.</i> , 2006	TDI	DB	NS	↘	-	-
Galderisi <i>et al.</i> , 2007	TDI	DB	NS	↘	-	-
Cadeddu <i>et al.</i> , 2013	TDI	DB	NS	NS	NS	-
Cognet <i>et al.</i> , 2013	2D-STI	Dipyridamole	NS	NS	↘	-
Wierzbowska-Drabik <i>et al.</i> , 2015	2D-STI	DB	NS	NS	-	↘

Figure 35. Résumé des données de la littérature sur le *strain* longitudinal au repos et pendant un stress pharmacologique, comparé à une population contrôlée. DB : dobutamine ; NS : non significatif comparé à la population contrôlée ; TDI : Doppler tissulaire ; STI : *speckle-tracking imaging*.

Si l'ensemble de ces études s'accorde sur l'absence de dysfonction régionale longitudinale au repos, la mise en évidence de sa présence en conditions de stress est très discutée. Govind, Galderisi et leurs collaborateurs mettent ainsi en évidence une réduction du  $\epsilon$  à la dose maximale de DB chez les patients T2DM comparés aux contrôles, lorsque Cadeddu et coll., Cognet et coll., Wierzbowska-Drabik et coll. n'observent aucune différence (du  $\epsilon$  ou du LS) (Govind *et al.*, 2006; Galderisi *et al.*, 2007; Cognet *et al.*, 2013; Cadeddu *et al.*, 2013; Wierzbowska-Drabik *et al.*, 2015). En revanche, Cognet et coll. rapportent une différence chez le patient T2DM dans la réponse de la fonction régionale myocardique au stress : le delta LS entre le repos et le stress est diminué (Cognet *et al.*, 2013). Cadeddu et coll. n'observent, quant à eux, pas de différence entre ces populations et rapportent même que le  $\epsilon$  n'augmente pas en conditions de stress (Cadeddu *et al.*, 2013). Enfin, Wierzbowska-Drabik et coll. rapportent pour leur part des différences uniquement en période de récupération, période non évaluée par les autres auteurs (Wierzbowska-Drabik *et al.*, 2015). Ces différences pourraient s'expliquer par les effets des agents pharmacologiques utilisés sur les conditions de charge, notamment à haute dose. Il a en effet été largement démontré que le *strain* longitudinal est sensible aux variations des conditions de charge (Choi *et al.*, 2008; Donal *et al.*, 2009; Burns *et al.*, 2010; Ho *et al.*, 2013; Dahle *et al.*, 2016; Murai *et al.*, 2016). Néanmoins, aucune de ces études ne propose d'indice pouvant renseigner sur ces conditions, comme le *meridional wall stress* ( $\sigma_{ES}$ , stress pariétal TS) pour la post-charge ou le volume TD pour la pré-charge (Lang *et al.*, 1986). Il est par ailleurs à noter que seule la fonction longitudinale a été évaluée dans ces études, or la fonction circonférentielle ainsi que la mécanique de rotation/torsion sont des éléments centraux dans la réponse du myocarde à un stress (Notomi *et al.*, 2006; Esch & Warburton, 2009; Doucende *et al.*, 2010).



Considérant la littérature actuelle sur la fonction régionale myocardique en conditions de stress dans le T2DM, le besoin d'études complémentaires, évaluant notamment la fonction circonférentielle et la mécanique de rotation/torsion ainsi que les conditions de charge, semble évident afin de pouvoir envisager cet outil dans le dépistage des altérations précoces de la fonction régionale myocardique dans le T2DM.

## II- DIAGNOSTIC DE LA CARDIOPATHIE DIABÉTIQUE : APPROCHES ACTUELLES ET PERSPECTIVES

- Les approches actuelles dans le diagnostic de la cardiomyopathie diabétique reposent sur l'évaluation de paramètres morphologiques et fonctionnels globaux. Cependant, ces paramètres sont peu sensibles dans les stades précoces du développement de la cardiomyopathie, où seule la fonction régionale myocardique est altérée.
- L'imagerie de déformation pourrait permettre d'évaluer cette fonction et donc de diagnostiquer plus précocement la cardiomyopathie diabétique. Cependant, les études menées rapportent des résultats contradictoires.
- L'échocardiographie de stress permet de révéler des altérations de la fonction myocardique qui restent discrètes au repos. Coupler l'imagerie de déformation au stress pourrait donc permettre de révéler les altérations précoces de la fonction régionale myocardique. Cependant, la littérature est sporadique et aucune évaluation de la fonction circonférentielle et de la mécanique torsion, éléments majeurs de la réponse au stress, n'a été réalisée.

**L'objectif de la première étude de cette thèse est donc de réaliser une évaluation comprehensive de la fonction régionale myocardique en conditions de stress, afin d'évaluer l'utilité de cette méthode dans le dépistage précoce de la cardiomyopathie diabétique.**



### III- LA SUPPLÉMENTATION EN CHOLÉCALCIFÉROL : UNE NOUVELLE STRATÉGIE PROPHYLACTIQUE CHEZ LE PATIENT DIABÉTIQUE ?

La carence en vitamine D (VitD) présente une forte prévalence chez le diabétique de type 2. Cette vitamine fait aujourd'hui l'objet d'un intérêt croissant par la communauté scientifique car elle présenterait une multitude d'effets systémiques, qui seraient bénéfiques pour le système cardiovasculaire. Cependant, les études réalisées jusqu'à présent ne se sont pas intéressées aux effets de la VitD sur la fonction cardiaque du patient diabétique. Cette vitamine pourrait-elle permettre de prévenir, voire d'améliorer les altérations précoces de la fonction régionale myocardique chez le patient T2DM ?

#### 1- La vitamine D : notions générales

##### a) Généralités

##### 1. Apports

La VitD est une vitamine liposoluble présente sous deux formes : le cholécalciférol (VitD<sub>3</sub>), naturellement synthétisé par les animaux, et l'ergocalciférol (VitD<sub>2</sub>), synthétisé par les plantes. Si la synthèse endogène est la principale source de VitD (90% des apports), cette vitamine peut également être retrouvée dans des aliments tels que l'huile de foie de morue, les poissons gras, le jaune d'œuf ou bien encore certains champignons (Holick & Chen, 2008; European Food Safety Authority, 2016). Cependant, cet apport alimentaire est minime, considérant l'importante quantité de produit à consommer pour couvrir les besoins en VitD (illustré figure 36) (Briot *et al.*, 2009). Des produits enrichis en VitD sont également disponibles sur le marché (produits laitiers et huiles).

	Ration quotidienne nécessaire pour couvrir les besoins [110,111]	Ration hebdomadaire nécessaire pour couvrir les besoins [110,111]
Huile de foie de morue	1,5 cuillère à café	10,5 cuillères à café
Girolles	12 portions de 60 g	84 portions de 60 g
Hareng au vinaigre	2 portions de 60 g	14 portions de 60 g
Sardines à l'huile	20 sardines	140 sardines
Œuf dur	22 œufs moyens	154 œufs moyens
Foie de veau	50 tranches de 100 g	350 tranches de 100 g
Beurre	5 plaquettes de 250 g	35 plaquettes de 250 g

Figure 36. Apports alimentaires nécessaires pour couvrir les besoins en vitamine D (d'après Briot *et al.*, 2009).

Les recommandations en terme d'apports nutritionnels conseillés en VitD et concernant la définition des normes de taux sanguin en calcidiol (25(OH)D) sont sujettes à controverse selon les sociétés savantes et les critères choisis (Haute Autorité de Santé, 2013c). Les dernières



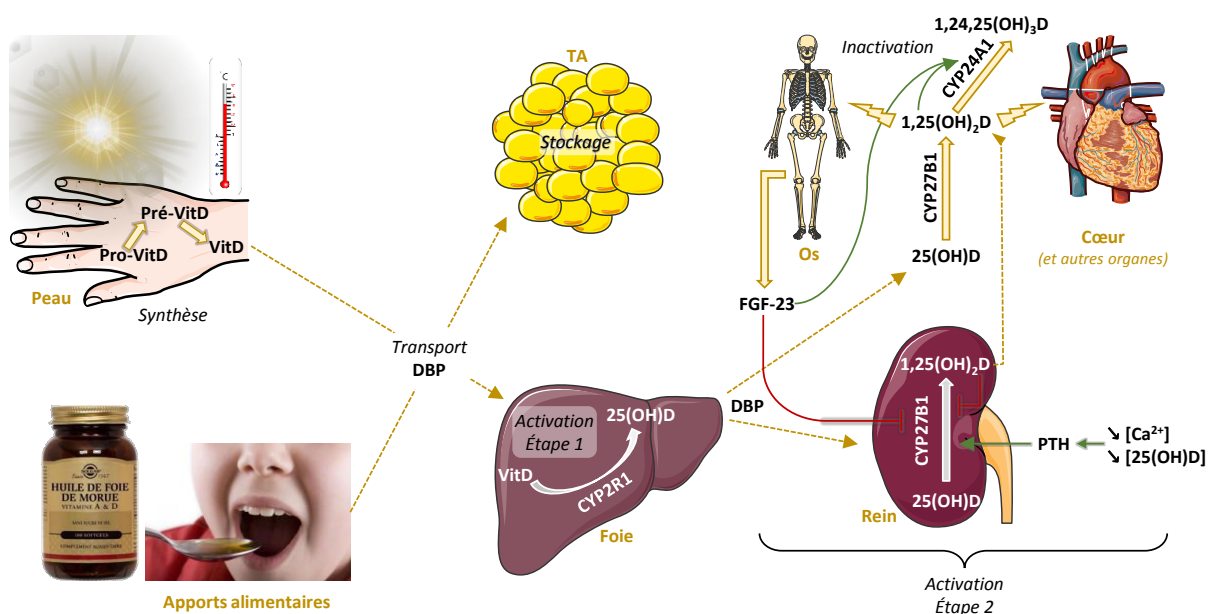
recommandations de l'*European Food Security Authority* (EFSA), parues en 2016, préconisent un taux circulant de calcidiol à 50ng/mL et estiment qu'un apport quotidien de 15µg/j (soit 600UI) est nécessaire et suffisant dans la plupart des tranches de la population pour atteindre cet objectif (European Food Safety Authority, 2016). Cet apport recommandé est inférieur à celui proposé, de 800 à 1 000 UI/j, par le Groupe de Recherche et d'Information sur l'Ostéoporose (GRIO) en 2011, mais supérieur aux recommandations actuelles de l'Anses, à 400IU/j (Benhamou *et al.*, 2011; Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail, 2015). En pratique, les apports constatés dans la population française par l'étude Individuelle des Consommations Nationales Alimentaires 3 (INCA3), menée par l'Anses en 2014-2015, sont largement inférieurs à ces recommandations : ils sont en moyenne de 3,1µg/j, soit 124UI/j (Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail, 2017). Ces apports insuffisants associés à un déficit d'exposition solaire peuvent expliquer la forte prévalence du déficit, voire de la carence en VitD dans la population générale, en France comme dans le monde (Benhamou *et al.*, 2011). En France, selon les données de l'Étude Nationale Nutrition Santé (ENNS) 2006-2007, 80,1% des adultes sont ainsi en insuffisance (<30ng/mL), 42,5% sont en déficit (<20ng/mL) et 4,8% en carence (<10ng/mL) (Vernay *et al.*, 2012).

## 2. Synthèse & métabolisme

La synthèse endogène de la VitD<sub>3</sub> a lieu au niveau de la peau, grâce au rayonnement ultraviolet B (UVB) solaire, qui transforme la pro-VitD<sub>3</sub> (7-déhydrocholestérol) en pré-VitD<sub>3</sub>, elle-même rapidement transformée en VitD<sub>3</sub> par la chaleur (Henry, 2011). Cette synthèse va donc dépendre de la saison, de l'heure de la journée, mais également de la surface corporelle exposée, de la pigmentation de la peau et de l'utilisation de crème solaire, qui peut filtrer 99% des UVB avec un SPF 15 (Holick & Chen, 2008; Henry, 2011). À titre d'exemple, en France, une exposition des bras et des jambes, de 5 à 10 min par jour, entre 10h et 15h au printemps, en été et à l'automne est conseillée pour couvrir les besoins (Briot *et al.*, 2009). Une fois synthétisée ou ingérée, la VitD est transportée dans la circulation sanguine par la VitD *binding protein* (DBP), aussi connue sous le nom de *group-specific component of serum* (GC), jusqu'au TA où elle peut être stockée, ou jusqu'aux organes où elle va subir deux hydroxylations successives pour être activée (Cooke *et al.*, 1988; Henry, 2011). Si la VitD peut être retrouvée sous forme libre dans le sang, l'utilité de cette protéine de transport serait de prolonger la demi-vie des différents métabolites de la vitamine afin de faire face à une potentielle carence (White & Cooke, 2000). La première hydroxylation est réalisée dans le foie par la 25-hydroxylase (ou CYP2R1) microsomale (Haussler *et al.*, 2013). Cette transformation de la VitD en 25(OH)D n'est pas régulée et son dosage est donc utilisé afin de déterminer la suffisance ou



la carence en VitD d'un patient (Henry, 2011; Haute Autorité de Santé, 2013c). La deuxième hydroxylation est quant à elle réalisée par la  $1\alpha$ -hydroxylase (ou CYP27B1) mitochondriale, principalement dans le rein, mais également, dans une moindre mesure, localement au niveau d'autres organes, dont le cœur (Hendrix *et al.*, 2004; Henry, 2011; Haussler *et al.*, 2013). Cette hydroxylation du calcidiol en calcitriol ( $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ ) est l'étape limitante de la bioactivation de la VitD et est étroitement contrôlée par le taux en calcitriol et le *fibroblast growth factor 23* (FGF-23), régulateurs négatifs, et la parathormone (PTH), régulatrice positive (Henry, 2011; Chanakul *et al.*, 2013). Le calcitriol n'est donc pas utilisé pour le dosage de la VitD en clinique, car en cas de carence la stimulation de la  $1\alpha$ -hydroxylase peut conduire à une élévation de son taux (Haute Autorité de Santé, 2013c).



**Figure 37. Principales étapes du métabolisme de la vitamine D.** DBP : *vitamin D binding protein* ; FGF : *fibroblast growth factor* ; PTH : *parathormone* ; TA : *tissu adipeux* ; Vit-/D : *vitamine D*.

Le rétrocontrôle négatif du calcitriol sur sa propre synthèse passerait par l'inhibition de sa transcription par la fixation du calcitriol sur le récepteur à la VitD (VDR), qui s'hétérodimérise avec le récepteur nucléaire *retinoïd X receptor* (RXR), puis se fixe sur un *vitamin D response element* négatif (nVDRE) situé sur l'ADN, possiblement après interaction avec un *VDR interacting repressor* (VDIR) (Henry, 2011). Par ailleurs, un taux élevé en calcitriol, associé à une phosphorémie élevée, induit la synthèse du FGF-23 par les ostéoblastes (Kolek *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2006). Ce facteur agit sur le tubule rénal proximal pour réguler l'expression de l' $1\alpha$ -hydroxylase et stimuler celle de la  $24$ -hydroxylase (ou CYP24A1), cette dernière étant responsable de l'inactivation de la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  par son hydroxylation en  $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}$  (Shimada *et al.*, 2004; Haussler *et al.*, 2013). À l'inverse, la



synthèse de PTH, régulatrice positive de l' $1\alpha$ -hydroxylase, par la parathyroïde est induite par une diminution de la calcémie, associée à la levée de l'inhibition de sa transcription par le VDR par un taux en calcidiol inférieur à 78-110 nmol/L (selon les études), soit 31-44 ng/mL (Dawson-Hughes *et al.*, 1997; Chapuy *et al.*, 1997; Haussler *et al.*, 2013).

### 3. Mécanismes d'action

Le calcitriol est capable d'exercer ses effets par deux mécanismes différents : il peut agir *via* son récepteur nucléaire, le VDR et déclencher des réponses transcriptionnelles, mais il peut également opérer par voie non transcriptionnelle en induisant des cascades de signalisation par l'activation de messagers secondaires transmembranaires (Helm *et al.*, 1996; Boland, 2011). La figure 39 récapitule ces différents mécanismes.

#### Effets génomiques

Le premier mécanisme d'action de la VitD identifié est la régulation de l'expression génique *via* son récepteur nucléaire, le VDR. Ce récepteur, qui est largement représenté dans le règne animal et exprimé dans la très grande majorité des tissus, existe sous deux isoformes de 424aa et 427aa (DeLuca, 2004; Bouillon *et al.*, 2008; Moukayed & Grant, 2013). En l'absence de calcitriol, le VDR est localisé majoritairement (>60%) dans le noyau, mais également dans le cytoplasme (Hsieh *et al.*, 1998). En présence de leur ligand, les récepteurs cytoplasmiques vont être transloqués dans le noyau. Le VDR associé au calcitriol va ensuite être phosphorylé et libéré de ses corépresseurs (Bouillon *et al.*, 2008; Moukayed & Grant, 2013). Après hétérodimérisation avec le RXR, l'ensemble se lie à l'ADN au niveau d'un VDRE, situé généralement à 1kbase du gène dans sa région promotrice, grâce aux doigts de zinc situés à la fois sur le VDR et sur le RXR (figures 38 et 39) (Hsieh *et al.*, 1998; DeLuca, 2004; Bouillon *et al.*, 2008; Haussler *et al.*, 2013). Ces derniers servent également à l'hétérodimérisation des deux récepteurs et sont primordiaux pour la fonction du VDR et leur mutation cause la résistance aux effets de la VitD médiés par le VDR (Bouillon *et al.*, 2008; Rosen *et al.*, 2012). Enfin, le recrutement de coactivateurs permet de renforcer l'hétérodimérisation entre le VDR et le RXR et d'initier la transcription par le recrutement de l'ARN polymérase II (figures 38 et 39) (DeLuca, 2004; Bouillon *et al.*, 2008; Rosen *et al.*, 2012; Haussler *et al.*, 2013; Moukayed & Grant, 2013). À l'inverse, le VDR activé peut également inhiber la transcription de certains gènes, dont notamment ceux de la PTH et de la CYP27B1, par son interaction avec les nVDRE (Bouillon *et al.*, 2008; Henry, 2011).



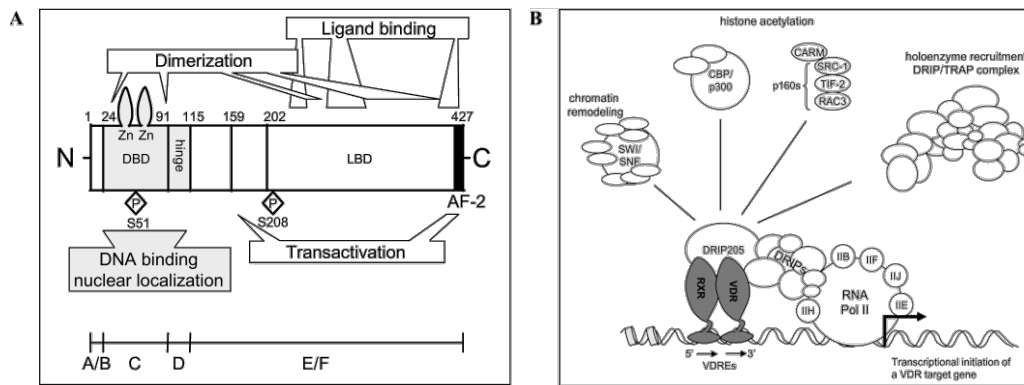


Figure 38. A) Structure et B) mécanisme de régulation de la transcription du récepteur à la vitamine D (VDR) (d'après Bouillon *et al.*, 2008). DBD : DNA binding domain ; LBD : Ligand binding domain; Pol : polymérase ; RXR : rétinol X récepteur.

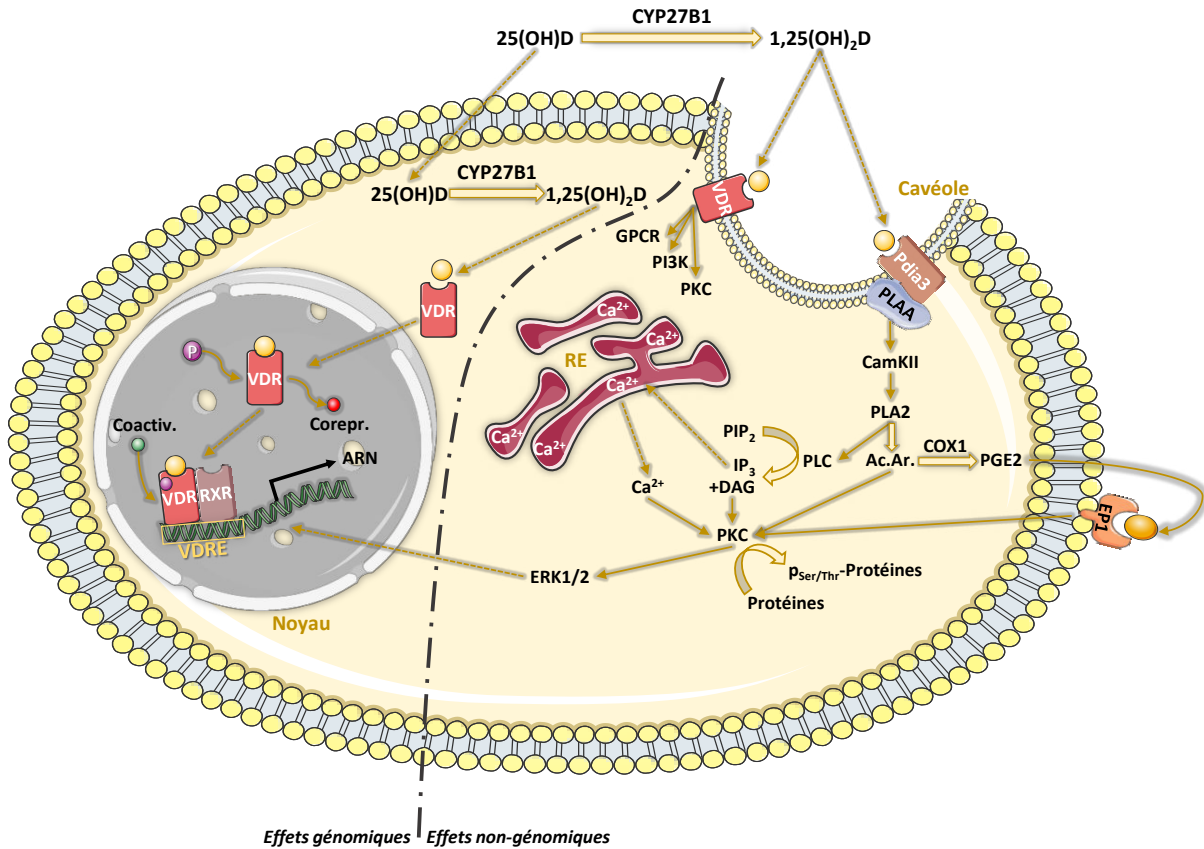
Plus récemment, il a également été montré que la VitD, toujours *via* le VDR, pouvait exercer des effets épigénétiques, notamment par des modifications d'histone et la régulation de l'expression de miR (Lisse *et al.*, 2013; Fetahu *et al.*, 2014; Pike & Meyer, 2014).

#### Effets non-génomiques

Outre ses effets génomiques bien connus, le calcitriol est également capable d'induire des effets rapides par l'activation de cascades de signalisation intracellulaires par le biais de messagers secondaires (figure 39). La  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  peut ainsi activer les PKC et phospholipase C dans de nombreux types cellulaires, ainsi que stimuler le captage rapide du calcium par l'entérocyte, mais également par le myocyte (Boland, 2011; Rosen *et al.*, 2012). Si les connaissances sur ce mode d'action sont plus récentes et moins étoffées, un récepteur membranaire par lequel ces effets sont médiés a été identifié. Ce récepteur, situé dans les cavéoles, a été appelé *1,25(OH) $_2$ D membrane-associated rapid response steroid-binding protein* ( $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ -MARRS), il est aussi connu sous le nom d'*endoplasmic reticulum stress protein 57* (ERp57), *Glucose-regulated protein, 58kDa* (GRP58) ou bien encore *protein disulfide isomerase, family A, member 3* (Pdia3) (Rosen *et al.*, 2012; Moukayed & Grant, 2013; Doroudi *et al.*, 2015). Ce récepteur interagirait avec la *phospholipase A2* (PLA2) *activating protein* (PLAA), associée à la cavéoline 1, ce qui activerait la CamKII, activant elle-même la PLA2. L'acide arachidonique ainsi relâché pourrait soit directement activer les PKC, soit être métabolisé en prostaglandine E2 par la cyclooxygénase I et activer les PKC (Doroudi *et al.*, 2015). D'autre part, la PLA2 peut également activer la phospholipase C, qui hydrolyse le phosphatidylinositol-4,5- biphosphate ( $\text{PIP}_2$ ) en inositol triphosphate ( $\text{IP}_3$ ), qui va mobiliser les stocks calciques, et en DAG, ce dernier activant à son tour les PKCs, qui sont rapidement transloquées à la membrane (Schwartz *et al.*, 2003; Doroudi *et al.*, 2014). Enfin, les PKC activées vont pouvoir stimuler les MAP kinases ERK1/2 (Doroudi *et al.*, 2014).



À noter que le VDR est également responsable d'effets non-génomiques. En effet, ce récepteur a également été retrouvé associé à la cavéoline 1 dans les cavéoles et pourrait activer les voies de signalisation *via* un GPCR, la phosphoinositide-3 kinase (PI3K), la phospholipase C ou bien encore les PKCs (figure 39) (Norman, 2006).



**Figure 39. Schéma récapitulatif des mécanismes d'action de la vitamine D.** Ac.Ar. : acide arachidonique ; CamKII : kinase calmoduline-dépendante II ; Coactiv. : coactivateur ; Corepr. : corépresseur ; COX1 : cyclooxygénase 1 ; DAG : diacylglycérol ; EP1 : *prostaglandin E2 receptor 1* ; ERK1/2 : *extracellular-signal-regulated kinase 1/2* ; GPCR : récepteur couplé à une protéine G ; IP<sub>3</sub> : inositol triphosphate ; P : phosphate ; PGE2 : prostaglandine E2 ; PIP<sub>2</sub> : phosphatidyl-inositol-4,5- biphosphate PI3K : phosphoinositide-3 kinase ; PKC : protéine kinase C ; PLAA : *phospholipase A2 activating protein* ; PLA2 : phospholipase A2 ; PLC : phospholipase C ; p<sub>Ser/Thr</sub>-protéines : protéines phosphorylées en sérine ou thréonine ; RE : réticulum endoplasmique ; RXR : *retinoid X receptor* ; VDR : récepteur à la vitamine D ; VDRE : *vitamin D response element*.

### b) Cibles & fonction

La fonction canonique de la VitD est le maintien de la minéralisation osseuse par la régulation du métabolisme phosphocalcique, et plus particulièrement par le maintien d'une calcémie normale. En cas de diminution de la calcémie, les récepteurs au calcium de la glande parathyroïde, des récepteurs couplés à une protéine G (GPCR), stimulent l'excrétion de PTH (Brown *et al.*, 1993; DeLuca, 2004). Cette hormone stimule alors la synthèse de calcitriol, qui va ensuite stimuler l'absorption intestinale active de Ca<sup>2+</sup>, notamment par le canal TRPV6, et de phosphate (DeLuca,

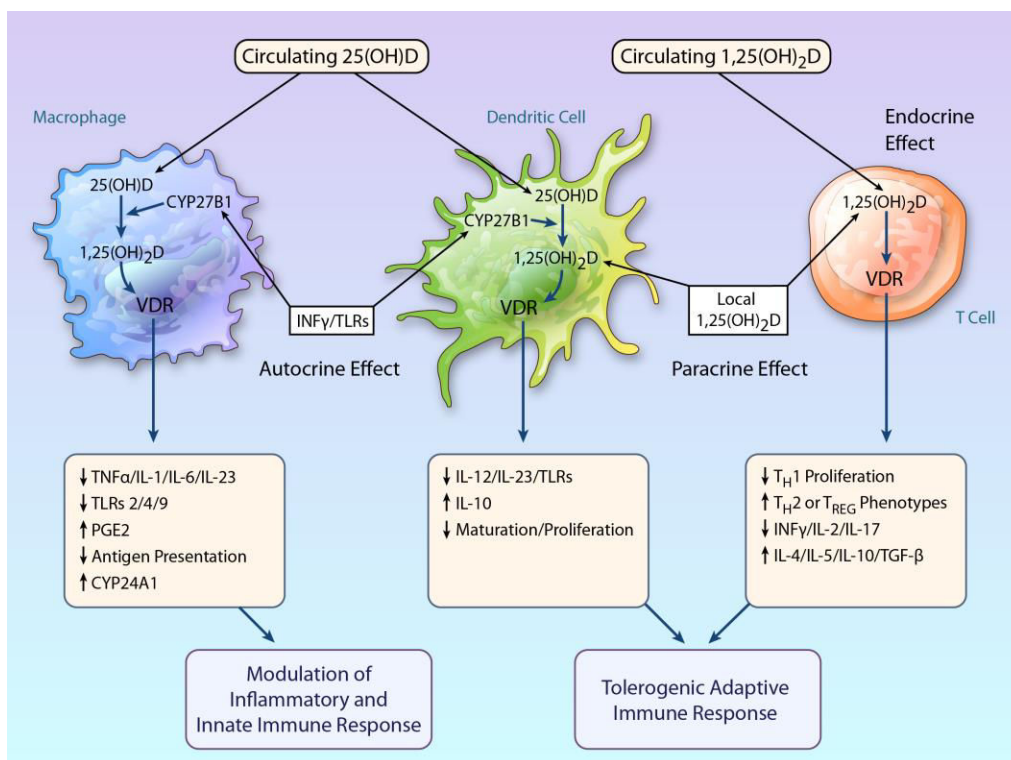


2004; Verstuyf *et al.*, 2010; Haussler *et al.*, 2013). L'absorption de calcium est maximale, c'est-à-dire de 65%, pour un taux sanguin en VitD supérieur à 32ng/mL (Briot *et al.*, 2009). D'autre part, le calcitriol, de concert avec la PTH, stimule la réabsorption de calcium par le tubule rénal distal, *via* le canal TRPV5 (DeLuca, 2004; Verstuyf *et al.*, 2010; Haussler *et al.*, 2013). En cas d'insuffisance de l'absorption intestinale du  $\text{Ca}^{2+}$ , le calcitriol, toujours en association avec la PTH, peut également induire l'expression du *receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand* (RANKL) par les ostéoblastes et ainsi activer les ostéoclastes, provoquant la résorption osseuse afin de mobiliser le  $\text{Ca}^{2+}$  intra-osseux (DeLuca, 2004).

Cependant, d'autres rôles sont aujourd'hui largement décrits pour la VitD, qui interviendrait, entre autres, dans la modulation du système immunitaire, de l'inflammation et de la prolifération cellulaire.

La VitD serait ainsi un facteur aux propriétés immunomodulatrices. En effet, le VDR est exprimé dans la plupart des types de cellules immunitaires, et notamment dans les macrophages, les cellules dendritiques et les lymphocytes T (figure 40) (Mathieu & Adorini, 2002; Briot *et al.*, 2009; Norman & Powell, 2014). La VitD permet d'inhiber l'activation des lymphocytes T en Th1 pro-inflammatoires en inhibant la sécrétion des molécules stimulatrices CD40, CD80 et CD86 et de l'IL-12, tout en stimulant la production d'IL-10 (Mathieu & Adorini, 2002; Briot *et al.*, 2009; Kamen & Tangpricha, 2010). Par ailleurs, les macrophages expriment l' $1\alpha$ -hydroxylase en présence d'interféron  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), de TNF- $\alpha$ , d'IL-1 et d'IL-12, ce qui pourrait être un mécanisme de régulation, la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  permettant d'inhiber la production des cytokines pro-inflammatoires et l'activation des Th1 (Mathieu & Adorini, 2002; Kamen & Tangpricha, 2010). Enfin, la VitD stimulerait la différenciation des  $\text{CD4}^+$  naïves en Th2, anti-inflammatoires, et stimulerait les lymphocytes T régulateurs (Mathieu & Adorini, 2002; Briot *et al.*, 2009; Kamen & Tangpricha, 2010). Le calcitriol favoriserait donc la tolérance du système immunitaire et son utilité a ainsi été démontrée dans la tolérance des allogreffes (Mathieu & Adorini, 2002). La VitD induirait en outre l'expression de facteurs immunomodulateurs. Elle stimule notamment l'expression de la cathélicidine (ou hCAP18 chez l'Homme, clivée pour produire le peptide LL-37), un peptide du système immunitaire inné aux propriétés antimicrobiennes, antifongiques et antivirales, également impliqué dans la modulation de la réponse inflammatoire, les mécanismes de cicatrisation, l'angiogenèse et la régulation de l'apoptose (Kamen & Tangpricha, 2010; Bandurska *et al.*, 2015; Pound *et al.*, 2015). À noter que la stimulation des *toll-like receptors* 1 et 2 induit l'expression de l' $1\alpha$ -hydroxylase chez les macrophages, qui produisent par la suite la cathélicidine en réponse au calcitriol (Kamen & Tangpricha, 2010). Ce peptide protégerait par ailleurs des réactions auto-immunes et sa déficience

serait impliquée dans le T1DM (Bandurska *et al.*, 2015; Pound *et al.*, 2015). Chez la souris NOD (*Non Obese Diabetic*), un modèle de T1DM, le traitement avec un analogue de la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  permet d'ailleurs de prévenir la destruction des îlots de Langerhans (Etten *et al.*, 2003). De plus, une méta-analyse des études ayant évalué le risque de développer un T1DM chez l'enfant a montré que la supplémentation en VitD réduisait significativement ce risque, et ce de manière dose-dépendante (Hyppönen *et al.*, 2001; Zipitis & Akobeng, 2008). Outre la cathélicidine, le mécanisme majeur par lequel le calcitriol régulerait l'auto-immunité serait la favorisation du développement de cellules dendritiques au phénotype tolérogène, avec l'inhibition de l'activation du *major histocompatibility complex II* (MHCII) et des CD40, CD80 et CD86 (Kamen & Tangpricha, 2010). La VitD permettrait également d'inhiber les phénomènes auto-immuns par la stimulation des lymphocytes T régulateurs, qui régulent les Th17, des lymphocytes impliqués dans les processus d'auto-immunité (Kamen & Tangpricha, 2010).



**Figure 40. Effets immunomodulateurs de la vitamine D sur les macrophages, les cellules dendritiques et les lymphocytes T (Norman & Powell, 2014).** Il- : interleukine ; PGE2 : prostaglandine E2 ; T<sub>H</sub>1/-2 : lymphocyte T 1/-2 ; T<sub>REG</sub> : lymphocyte T régulateur ; TLR : *toll-like receptors* ; TNFα : *tumor necrosis factor α* ; VDR : récepteur à la vitamine D.

La VitD interviendrait par ailleurs dans les mécanismes de détoxification en induisant l'expression d'enzymes CYP, notamment au niveau du côlon. Le calcitriol présenterait ainsi des effets anticancéreux en stimulant l'expression d'enzymes et de transporteurs capables d'hydroxyler puis d'excréter l'acide lithocholique, un acide biliaire secondaire qui aurait des effets carcinogènes sur le



côlon (Haussler *et al.*, 2013). Mais ce phénomène n'est pas le seul à avoir suscité l'intérêt des chercheurs en cancérologie pour la VitD. Effectivement, le calcitriol, *via* le VDR, a la capacité de réguler l'expression de nombreux gènes associés à la régulation de la prolifération, de la différenciation et du cycle cellulaires, à l'expression de facteurs de croissance et à l'apoptose (Samuel & Sitrin, 2008; Moukayed & Grant, 2013). Dans différents modèles de cellules cancéreuses, il a ainsi été montré que la 1,25(OH)<sub>2</sub>D pouvait inhiber l'expression de proto-oncogènes tels que c-Myc et c-Fos, stopper le cycle cellulaire dans la phase de transition G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, tout en induisant l'apoptose, par l'expression des protéines p53, Bak et Bax, qui induisent le relargage de cytochrome c par la mitochondrie et la mort cellulaire (Samuel & Sitrin, 2008; Moukayed & Grant, 2013). D'autre part, le calcitriol induit l'expression d'enzymes antioxydantes telles que la superoxyde dismutase et stimule les processus autophagiques (Moukayed & Grant, 2013). De nombreux travaux chez le rongeur ont également montré l'efficacité, qui serait dose-dépendante, du calcitriol comme agent antitumoral, mais également comme potentialisateur d'autres agents (Feldman *et al.*, 2014; Moukayed & Grant, 2017). Chez l'Homme, des études épidémiologiques ont associé le statut vitaminique D au risque de développer un cancer, notamment colorectal, et le maintien d'un statut optimal semble aujourd'hui important afin de réduire le risque de cancer, mais également de potentialiser les effets des traitements (Basit, 2013; Feldman *et al.*, 2014; Moukayed & Grant, 2017).

### c) La supplémentation en vitamine D

Considérant l'importance de la VitD dans le métabolisme phosphocalcique (une carence en VitD est associée au développement de l'ostéomalacie, de l'ostéoporose et au rachitisme), une supplémentation est nécessaire en cas d'insuffisance ou de carence, voire même conseillée en l'absence de déficience dans la prévention des chutes chez la personne âgée (Haute Autorité de Santé, 2013c). Les modalités de supplémentation ont fait l'objet de nombreux travaux, tentant de déterminer la forme de VitD (ergocalciférol ou cholécalciférol), la dose et l'intervalle de prise garantissant le maintien d'un taux de 25(OH)D optimal et sans effet toxique.

Tout d'abord, il semblerait que la VitD<sub>3</sub> soit à privilégier comparativement à la VitD<sub>2</sub>, bien que ces deux formes possèdent la même activité biologique (Tsugawa *et al.*, 1999). En effet, des études ont montré que le cholécalciférol serait plus efficace pour augmenter le taux sanguin de VitD, notamment en prise intermittente, et aurait une demi-vie plus longue que l'ergocalciférol, ce qui pourrait être dû à une affinité supérieure de la *vitamin d binding protein* pour la première forme, comparativement à la deuxième (Heaney *et al.*, 2003; Romagnoli *et al.*, 2008; Jones *et al.*, 2014; Shieh *et al.*, 2016; Bouillon *et al.*, 2016). Concernant l'intervalle des prises, il n'est plus aujourd'hui conseillé de prendre de fortes doses 1 ou 2 fois par an pour des raisons d'effets secondaires



transitoires, tels que l'hypercalcémie ou l'augmentation du risque de fracture (Benhamou *et al.*, 2011; Bouillon *et al.*, 2016). Des études se sont donc intéressées à l'efficacité comparative de prises mensuelles, hebdomadaires ou journalières. Si une étude récente, réalisée dans la population générale, n'a pas rapporté de différence d'efficacité entre ces différentes modalités, une précédente étude chez des sujets âgés (>80 ans) en résidence médicalisée, a noté une plus grande efficacité de la prise journalière, la prise mensuelle étant la moins efficace (Chel *et al.*, 2008; Takács *et al.*, 2017). Cependant, une troisième étude, également réalisée chez le sujet âgé, n'a pas retrouvé cette différence (Ish-Shalom *et al.*, 2008). Il semblerait donc qu'à doses cumulées équivalentes la différence d'efficacité de ces différentes modalités de prise ne soit pas majeure et que le choix du schéma posologique doit principalement viser à optimiser la compliance du patient au traitement (Ish-Shalom *et al.*, 2008; Bouillon *et al.*, 2016). La dose de VitD à prescrire en supplémentation varie selon les recommandations des différentes organisations émettrices, de la même façon que la dose journalière de VitD conseillée (Bouillon, 2017). À l'heure actuelle, en France, le groupe de recherche et d'information sur l'ostéoporose recommande une supplémentation calquée sur les apports journaliers recommandés, à savoir 800 à 1 200 UI/J (Benhamou *et al.*, 2011). Selon le schéma posologique choisi, le praticien prescrira donc 7 000 UI en dose hebdomadaire ou 100 000 UI en dose trimestrielle. Si l'intoxication à la VitD est extrêmement rare lorsque la source est naturelle (soleil, alimentation), l'intoxication pharmacologique est possible et peut causer de sévères effets secondaires comme la calcification de tissus mous, voire être létale (Bouillon, 2017). Cependant, plusieurs jours voire plusieurs semaines à des doses quotidiennes 100 fois supérieures à celles recommandées, seraient nécessaires avant d'aboutir à une hypercalcémie, qui ne serait pas observée pour des taux circulants de 25(OH)D inférieurs à 100ng/mL (250nM) (Briot *et al.*, 2009; Benhamou *et al.*, 2011; Haute Autorité de Santé, 2013c).

En cas d'insuffisance ou de carence en VitD, le groupe de recherche et d'information sur l'ostéoporose recommande par ailleurs un « traitement d'attaque », présenté figure 41, pour normaliser rapidement le taux circulant de 25(OH)D. Selon l'importance du déficit, 3 schémas posologiques sont proposés, qui correspondent à des doses journalières de 3 300 à 7 000 UI (Benhamou *et al.*, 2011).

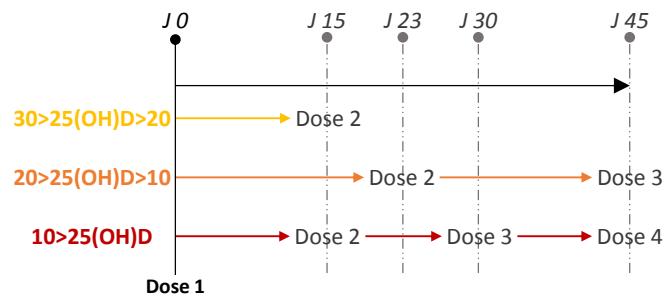


Figure 41. Schéma posologique recommandé par le GRIO en traitement "d'attaque" de la déficience en vitamine D, selon l'importance du déficit. Une dose = 100 000 UI ; J : jour.

## 2- Vitamine D, diabète et cœur

### a) La vitamine D chez le patient diabétique

Similairement à la population générale, la carence en VitD présente une forte prévalence chez le diabétique. Les prévalences rapportées par les différentes études sont en revanche très variables, ce qui pourrait en partie s'expliquer par la diversité des populations d'étude (origine géographique, style de vie ...). D'autre part, les seuils choisis de déficience sont également sujets à variation. On peut ainsi retrouver dans la littérature des prévalences rapportées variant de 38% de patients T2DM avec un taux en 25(OH)D <50ng/mL à 93% des patients T2DM présentant un taux de 25(OH)D <30ng/mL, la moyenne se situant autour de 50-60% de patients dits « déficients » (généralement défini par un taux <20ng/mL) (Fernández-Juárez *et al.*, 2013; Alcubierre *et al.*, 2015; Usluogullari *et al.*, 2015; Reddy *et al.*, 2015). De nombreuses études ont associé cette hypovitaminose D au développement du T2DM. Des études prospectives menées chez des cohortes de patients sains ou pré-diabétiques, suivis sur des périodes allant de 2 à 29 ans, ont ainsi observé une association indépendante entre un faible taux circulant de calcidiol à l'inclusion et un risque plus élevé de développer un T2DM pendant la période de suivi, même après ajustement avec différentes variables confondantes, comme la saison ou l'IMC (Deleskog *et al.*, 2012; Afzal *et al.*, 2013; Tsur *et al.*, 2013; Clemente-Postigo *et al.*, 2015; Park *et al.*, 2018). Des résultats qui ont également été confirmés par des méta-analyses prenant en compte des populations de diverses origines (Forouhi *et al.*, 2012; Khan *et al.*, 2013; Song *et al.*, 2013). D'autre part, une étude par clamp hyperglycémique réalisée chez des personnes saines a associé le taux sérique de 25(OH)D à la sensibilité à l'insuline et à la fonction des cellules  $\beta$ -pancréatiques (Chiu *et al.*, 2004). La déficience en VitD pourrait en outre être associée au développement des complications macro- et microvasculaires du diabète et à leur sévérité, bien que la littérature ne soit pas unanime sur ce point (Fernández-Juárez *et al.*, 2013; Alcubierre *et al.*, 2015; Herrmann *et al.*, 2015; Usluogullari *et al.*, 2015; Reddy *et al.*, 2015; Jung *et al.*,



2016). Ce lien entre carence en VitD et intolérance au glucose a également été rapporté dans des modèles expérimentaux, l'intolérance au glucose étant abolie après supplémentation (Nyomba *et al.*, 1984; Cade & Norman, 1986). Différentes hypothèses ont été émises quant aux mécanismes impliqués dans cette relation. Tout d'abord, les cellules  $\beta$  pancréatiques expriment le VDR et de nombreuses études expérimentales ont rapporté que la 1,25(OH)D stimulerait la sécrétion d'insuline quand, réciproquement, une carence altérerait sa sécrétion (Norman *et al.*, 1980; Palomer *et al.*, 2008). Cet effet passerait par l'induction d'oscillations calciques intracellulaires *via* l'activation de canaux calciques non sélectifs et voltage-dépendants par le calcitriol, ce phénomène étant dépendant de la concentration en calcium extracellulaire (Sergeev & Rhoten, 1995). Par ailleurs, la VitD exercerait des effets protecteurs de la fonction  $\beta$  pancréatique par l'inhibition du RAS (Leung, 2016). En effet, le calcitriol, *via* le VDR, serait un régulateur négatif de la transcription de la rénine (Li *et al.*, 2002). Cette inhibition de la transcription de la rénine permettrait ainsi de réguler le taux d'angiotensine II, cette hormone étant responsable d'une inhibition de la sécrétion d'insuline glucose-dépendante et d'une diminution de la perfusion des îlots (Cheng & Leung, 2011). Les propriétés immunomodulatrices du calcitriol pourraient également avoir un impact sur le développement de cette pathologie, le développement de l'insulinorésistance étant associé à un environnement pro-inflammatoire et des cytokines comme le TNF $\alpha$  pouvant directement impacter la voie de signalisation de l'insuline dans des organes clés comme le TA ou le muscle (voir section I-1-d)3.) (Mathieu, 2015). Enfin, le phénotype du VDR exprimé par l'individu aurait son importance. En effet, plusieurs variations alléliques de ce récepteur existent et ont été identifiées, pour la majorité d'entre elles, dans la région 3'-UTR (*untranslated region*) du gène, mais également près de sa région promotrice en 5' (Al-Daghri *et al.*, 2014). Parmi elles, les SNPs (*single nucleotide polymorphism*) *Apal*, *BsmI* et *TaqI* (région 3'-UTR) ont été associés à un risque accru de T2DM ainsi qu'à ses complications, quand au contraire, *FokI* (région promotrice) est associé à un risque moins important de T2DM (Palomer *et al.*, 2008; Al-Daghri *et al.*, 2014; Maia *et al.*, 2016; Ezhilarasi *et al.*, 2018). Cependant, ces observations ne sont pas unanimement rapportées et ces disparités pourraient s'expliquer par les différentes origines des patients inclus (Ye *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 2014). Outre le polymorphisme du VDR, les variations alléliques de la *vitamin d binding protein* ont également été associées à des variations du risque diabétique (Palomer *et al.*, 2008).

Contrairement aux études expérimentales où la supplémentation en VitD permet d'améliorer la tolérance au glucose, les études interventionnelles menées chez des patients diabétiques n'ont pas obtenu de résultats probants. Dans leur étude randomisée en double-aveugle SUNNY (*study on the effect of vitamin D supplementation on glycemic control in type 2 diabetes*), Krul-Poel et coll. n'ont





rapporté aucun effet d'une supplémentation de 6 mois à 50 000 UI/mois (soit 1 667 UI/j) de cholécalciférol sur la glycémie et l'insulinémie à jeun, l'HbA1c, l'HOMA-IR ou l'HOMA-B (un indice de la fonction des cellules  $\beta$ -pancréatiques) dans une population de 275 patients diabétiques, à l'exception toutefois d'une amélioration de l'HbA1c chez les patients sévèrement carencés ( $25(\text{OH})\text{D} < 12\text{ng/mL}$ ) (Krul-Poel *et al.*, 2015). Des résultats en accord avec une précédente étude (également randomisée en double-aveugle), à plus petite échelle, chez 16 patients diabétiques soumis à 12 semaines de supplémentation en cholécalciférol, dont 2 semaines à 11 200 UI/jour puis 10 semaines à 5 600 UI/jour, qui n'avait observé aucun effet sur la fonction des cellules  $\beta$  pancréatiques ou la sensibilité à l'insuline (évalués par l'HbA1c, la glycémie à jeun, la mesure de la sécrétion d'insuline basale, un test de tolérance au glucose intraveineux et un clamp euglycémique hyperinsulinémique) (Kampmann *et al.*, 2014). Des résultats similaires sont obtenus avec une combinaison cholécalciférol + calcium, dans une population multi-ethnique (Gagnon *et al.*, 2014). Enfin, si une amélioration de l'HbA1c a été rapportée après 1 an de supplémentation à forte dose (en moyenne 12 695 UI/j) chez le patient pré-diabétique en hypovitaminose D ( $25(\text{OH})\text{D} < 30\text{ng/mL}$ ), aucun effet n'est cependant observé sur des indices comme la glycémie à jeun, l'HOMA-IR ou l'HOMA-B et sur le risque d'évolution vers le T2DM (Davidson *et al.*, 2013).

## *b) Vitamine D et fonction cardiaque*

### 1. Vitamine D et cœur

Les cardiomyocytes expriment à la fois la  $1\alpha$ -hydroxylase et le VDR, la VitD est donc activée et peut agir directement au niveau du myocarde (Hendrix *et al.*, 2004; Tishkoff *et al.*, 2008). En 2008, l'équipe de R. Simpson a localisé le VDR associé à la cavéoline 3 au niveau des tubules T de la cellule, une localisation en adéquation avec le rôle régulateur des flux calciques du calcitriol (Tishkoff *et al.*, 2008; Zhao & Simpson, 2010). En effet, de précédents travaux de la même équipe, réalisés *in vitro* sur des cardiomyocytes isolés de rat ont montré des effets inotropes, mais surtout lusitropes positifs de la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ , qui agirait rapidement par voie non-génomique, *via* l'activation de la PKC et par la phosphorylation du phospholamban et de la troponine I cardiaque (Green *et al.*, 2006). L'implication du VDR dans ce processus a par la suite été mise en évidence par Tishkoff et coll. en exposant des cardiomyocytes isolés de souris KO (*knock out*) ou WT (*wild type*) pour le VDR au calcitriol (Tishkoff *et al.*, 2008). Outre cet effet aigu sur la contractilité du cardiomyocyte, le calcitriol est également capable de réguler la prolifération et favoriser la différenciation de ces cellules. Il a ainsi été montré que la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  peut activer la voie de signalisation Wnt non-canonique ( $\beta$ -caténine indépendante), associée à la différenciation du cardiomyocyte, tout en inhibant la voie Wnt canonique ( $\beta$ -caténine dépendante), associée à la prolifération cellulaire (figure 42) (Kim *et al.*,

2016). Dans des modèles d'infarctus, la VitD permettrait de diminuer la réponse hypertrophique et la fibrose par l'inhibition de la voie Wnt canonique (Kim *et al.*, 2016).

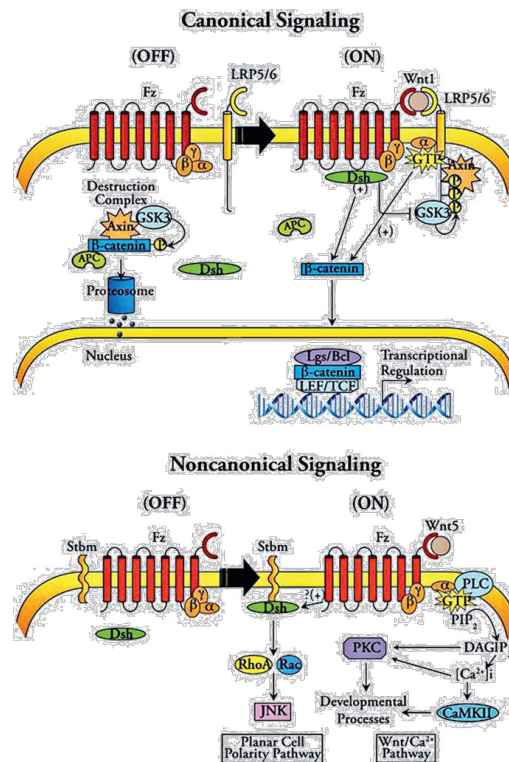


Figure 42. Les voies de signalisation Wnt canonique et non-canonique (Kim *et al.*, 2016).

Il a d'autre part été montré que la souris KO pour le VDR présentait une hypertrophie cardiaque ainsi que des lésions fibrotiques (Xiang *et al.*, 2005; Simpson *et al.*, 2007; Rahman *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2011). Ces effets anti-hypertrophiques du calcitriol pourraient en partie être médiés par une diminution de l'expression de la rénine, bien que cette hypothèse ne fasse pas l'unanimité (Xiang *et al.*, 2005; Simpson *et al.*, 2007). Cependant, grâce à leur modèle de souris KO VDR sélectif du cardiomyocyte, Chen et coll. s'affranchissent des potentiels effets pro-hypertenseurs du KO VDR global et montrent qu'au niveau du myocyte, la VitD exercerait des effets anti-hypertrophiques directs par l'inhibition de la voie calcineurine/NFAT (*nuclear factor of activated T cells*), classiquement associée à l'hypertrophie pathologique (Chen *et al.*, 2011). Cette inhibition serait médiée par une expression accrue de la MCIP1 (*calcineurin inhibitory protein 1*, aussi appelée Rcan1) (Chen *et al.*, 2011). Par ailleurs, l'effet anti-fibrotique médié par le VDR serait dû à l'action directe du calcitriol sur le fibroblaste, comme le suggèrent ces mêmes auteurs (Chen *et al.*, 2011). Cette observation est en accord avec d'autres travaux de la littérature ayant montré que la VitD n'agit pas uniquement sur la structure et la fonction du myocyte, mais influence également la matrice extracellulaire myocardique. Toujours dans un modèle de souris KO VDR, Rahman et coll. ont



ainsi rapporté une activité accrue des métalloprotéinases 1 et 2 (MMP1/-2), associée à une diminution de l'expression de leurs inhibiteurs, les TIMP (*tissue inhibitor of metalloproteinase*) 1 et 3 (Rahman *et al.*, 2007). Enfin, chez l'Homme, une étude menée par Dorsch et coll. dans une population de patients insuffisants cardiaques a trouvé une association entre le polymorphisme du bloc haplotypique formé par *Bsml*, *Apal* et *TaqI* et PIIINP (*N-terminal pro-peptide of collagen type III*), un biomarqueur de la synthèse du collagène de type III (Dorsch *et al.*, 2014).

## 2. Vitamine D et maladies cardiovasculaires

### Études observationnelles

Le lien entre VitD et maladies cardiovasculaires a depuis longtemps été remarqué. Des travaux publiés dès les années 1970 ont ainsi rapporté que les hommes vivant à plus haute altitude et donc soumis à un rayonnement UVB plus important ont une mortalité d'origine coronarienne inférieure, que la prévalence des pathologies ischémiques et de l'hypertension augmente dans les pays éloignés de l'équateur ou bien encore que l'incidence des évènements cardiovasculaires augmente en hiver (Brindley *et al.*, 2010). De nombreuses études observationnelles ont donc été menées dans diverses populations de patients afin d'évaluer l'existence d'un lien entre le statut en 25(OH)D et différents paramètres associés aux maladies cardiovasculaires.

Dans la population générale (adultes âgés de plus de 20 ans), l'étude menée par Scragg et coll. dans la cohorte de la NHANES (*National Health and Nutrition Examination Survey*) a associé de faibles taux sériques en 25(OH)D à une FC et une PAS plus élevées et donc à un travail cardiaque qui serait plus important (Scragg *et al.*, 2010). Deux années auparavant, une étude menée par T.J. Wang et coll. chez les enfants de la cohorte de la *Framingham Heart Study* (âge moyen 59 ans) avait mis en évidence, sur une période de 5 ans de suivi, un risque deux fois plus élevé d'évènements cardiovasculaires chez les individus carencés en VitD (25(OH)D <15ng/mL) (Wang *et al.*, 2008). Ces résultats ont été confirmés en 2017 par Zhu et coll., qui ont associé un taux de 25(OH)D <25ng/mL au risque de mortalité toutes causes, de mortalité cardiovasculaire et d'insuffisance cardiaque dans une population de 3 946 Australiens suivie sur une période de 20 ans (Zhu *et al.*, 2017). Cette valeur seuil de 25(OH)D avait également été précédemment évoquée dans une méta-analyse réalisée par L. Wang et coll., qui avaient alors mis en évidence une relation linéaire négative entre le taux circulant de calcidiol et le risque cardiovasculaire pour des taux compris entre 8 et 25ng/mL (Wang *et al.*, 2012). Enfin, dans leur étude *Baltimore Longitudinal Study of Aging*, Ameri et coll. se sont plus spécifiquement intéressés à la fonction cardiaque. Dans une population de 711 volontaires sans pathologie cardiaque, cette équipe a associé un taux de 25(OH)D <30ng/mL au remodelage



cardiaque et au risque d'hypertrophie concentrique (augmentation de l'épaisseur pariétale myocardique, diminution du diamètre VG et du volume TD indexé, augmentation du RWT) (Ameri *et al.*, 2013). De manière intéressante, les bénéfices d'un taux circulant en calcidiol >30ng/mL sont perdus au-delà de 37ng/mL et les auteurs soulignent la nécessité de supplémenter les patients carencés mais préconisent également d'éviter la supplémentation de patients présentant un taux optimal en VitD (Ameri *et al.*, 2013).

Si la carence en 25(OH)D est également associée à un pronostic défavorable chez les patients insuffisants cardiaques, la majorité des études menées chez des personnes âgées n'ont pas retrouvé cette relation entre structure et fonction cardiaque et taux circulant de calcidiol, à l'exception de l'étude menée par Fall et coll., qui a observé ce lien à l'inclusion mais pas sur la période de suivi de 5 ans (Ballegooijen *et al.*, 2012; Fall *et al.*, 2012; van Ballegooijen *et al.*, 2013; Saponaro *et al.*, 2018). De manière intéressante, une étude menée dans une population de jeunes femmes (34 ans d'âge moyen) a associé une déficience en VitD (25(OH)D<20ng/mL) à l'épaississement du TAE (Gurses *et al.*, 2015).

#### Études interventionnelles

Si les études observationnelles ont obtenu, dans la population générale, des résultats concordants, les études interventionnelles présentent en revanche moins d'homogénéité, ce qui peut en partie s'expliquer par la variabilité des populations d'étude et des schémas posologiques adoptés.

Les études de supplémentation prenant en compte comme critère de jugement principal la PA ou la fonction macro- ou microvasculaire, ont ainsi obtenu des résultats contradictoires mais globalement non significatifs, comme rapporté par Beveridge et coll. dans leurs méta-analyses (Beveridge *et al.*, 2015, 2018). Cependant, il est à noter que ces études proposaient des protocoles très variés, avec des schémas posologiques de 900 à 5 000 UI/j, pendant 4 à 12 semaines, en prise quotidienne ou intermittente et sous forme de cholécalciférol, d'ergocalciférol ou de paricalcitol (un analogue de la VitD), dans des populations présentant une grande variété de conditions cliniques (patients sains, coronariens, hypertendus, insuffisants rénaux, diabétiques, infarctus récent...) et de taux circulant de calcidiol à l'inclusion. En revanche, les études ayant évalué l'utilité d'une supplémentation en VitD chez le patient insuffisant cardiaque ont obtenu des résultats plus robustes. En 2011, une petite étude menée par Zia et coll. chez des patients afro-américains présentant une cardiomyopathie dilatée avec FE<35% et déficients en VitD (25(OH)D <30ng/mL) a montré qu'une supplémentation en VitD de 14 semaines (50 000 UI/semaine d'ergocalciférol pendant 8 semaines +



6 semaines à 1 000 UI/jour de cholécalférol associé à un mix multivitaminé contenant 400 UI de VitD) permettait d'améliorer la FE de 24,3% à 31,3% (Zia *et al.*, 2011). Cette observation a par la suite été confirmée par de plus larges études, chez l'enfant comme chez l'adulte, dont notamment l'étude VINDICATE (*VitamIN D Treating patlents With Chronic heArT failurE*), qui a montré qu'une supplémentation à haute dose (4 000 UI/j) de cholécalférol pendant 1 an permettait non seulement d'améliorer la FE, mais également de diminuer le diamètre TS du VG ainsi que d'inverser le remodelage cardiaque chez 229 patients en insuffisance cardiaque chronique et carencés en VitD (25(OH)D <20ng/mL) (Shedeed, 2012; Amin *et al.*, 2013; Dalbeni *et al.*, 2014; Witte *et al.*, 2016). La récente méta-analyse réalisée par Zhao et coll. a également corroboré ces résultats sur le remodelage et la fonction ventriculaire, en précisant toutefois que l'efficacité de l'intervention est d'autant plus importante si la FE est altérée et pour des doses de VitD élevées (4 000 UI/j) (Zhao *et al.*, 2018). Outre ces auteurs ayant choisi la fonction cardiaque comme critère de jugement principal, d'autres équipes se sont intéressées à des marqueurs plasmatiques d'activation du RAS ou de l'inflammation et ont également constaté une diminution du TNF- $\alpha$  associé à une augmentation de l'IL-10 ainsi qu'une diminution de l'activité de la rénine et du taux d'aldostérone suite à la supplémentation (Schleithoff *et al.*, 2006; Schrotten *et al.*, 2013; Boxer *et al.*, 2014).

L'ensemble de ces études interventionnelles souligne le potentiel de la supplémentation en VitD dans l'amélioration de la fonction cardiaque chez le patient carencé mais met également en évidence la nécessité d'une étude de sa pertinence au cas par cas, pour chaque population pathologique, et de l'importance de la dose, qui doit être suffisamment élevée pour induire des effets notables.

### *c) Vitamine D et cardiomyopathie diabétique*

Chez le patient T2DM, des études observationnelles ont associé la carence en VitD au risque de mortalité et d'évènements cardiovasculaires, à la rigidité artérielle, à la variabilité du rythme cardiaque et, de façon non-significative mais avec une forte tendance ( $p=0,051$ ), à la cardiopathie neuropathique autonome (Joergensen *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2012; Heidari *et al.*, 2015; Jung *et al.*, 2015). Chez ces patients, les études interventionnelles se sont principalement intéressées aux effets d'une supplémentation sur la fonction vasculaire. Dans une étude menée en 2010, Witham et coll. ont ainsi évalué les effets de doses uniques de 100 000 UI ou 200 000 UI de VitD<sub>3</sub> chez des patients T2DM présentant un taux sérique de calcidiol <40ng/mL. Si aucune amélioration du FMD (*flow-mediated dilatation*, un indice de la fonction macrovasculaire endothéliale) n'a été observée après 8 ou 16 semaines post-supplémentation, une diminution de la PA systolique dès 8 semaines et pour les deux dosages ainsi qu'une diminution des pro-BNP à 16 semaines avec 200 000 UI a en revanche été



observée (Witham *et al.*, 2010). Dans leur étude parue deux ans auparavant, Sugden et coll. ont néanmoins rapporté à la fois une amélioration du FMD et de la PA chez des patients T2DM présentant un taux circulant de 25(OH)D <20ng/ml, 8 semaines après l'administration d'une dose unique de 100 000 UI de VitD<sub>2</sub> (Sugden *et al.*, 2008). À ce jour, les études interventionnelles réalisées dans cette population ne se sont cependant pas intéressées à la fonction cardiaque en tant que critère de jugement principal, et seules des études expérimentales ont été menées. Toutefois, la plupart de ces études ont été conduites dans des modèles de rats diabétiques de type 1 (induits à la streptozotocine), ou dans des modèles mixtes avec streptozotocine associée à un régime gras et sucré. Cependant, il est à noter que dans ces modèles, la supplémentation en VitD a permis d'améliorer la fonction et le remodelage cardiaque, de diminuer la fibrose, le stress oxydant et l'inflammation (Lee *et al.*, 2014b, 2014a; Wang *et al.*, 2014a; Wei *et al.*, 2017; Qu *et al.*, 2017; Zeng *et al.*, 2017). Ces effets cardioprotecteurs ont été associés à différents mécanismes, selon les auteurs. D'une part, la VitD permettrait ainsi de diminuer la fibrose par une moindre expression des cytokines TGF- $\beta$  (*tissue growth factor  $\beta$* ) et CTGF (*connective tissue growth factor*) et par une régulation de l'expression du procollagène I (Lee *et al.*, 2014b; Wang *et al.*, 2014a). D'autre part, une supplémentation en calcitriol permettrait de diminuer l'expression du récepteur à l'angiotensine II et du RAGE, diminuant ainsi l'inflammation (Lee *et al.*, 2014b). Le calcitriol pourrait par ailleurs réduire les phénomènes d'apoptose en modulant l'expression de Fas/FasL, tout en favorisant l'autophagie *via* l'inhibition de la voie  $\beta$ -caténine/TCF4/GSK-3 $\beta$ /mTOR (Wei *et al.*, 2017; Zeng *et al.*, 2017). Dans un modèle de rat diabétique de type 2 induit par un régime gras de 6 mois, le groupe supplémenté en VitD<sub>3</sub> en prévention primaire présentait une PA et une masse cardiaque préservées, ainsi qu'une réduction de la fibrose cardiaque, par rapport aux animaux non supplémentés (Mazzone *et al.*, 2018).

Ainsi, à l'heure actuelle, peu de données sont disponibles concernant les effets d'une supplémentation en VitD sur la fonction cardiaque du patient T2DM et leurs potentiels mécanismes sous-jacents, soulignant la nécessité de plus amples recherches, à l'échelle clinique comme expérimentale.



### III- LA SUPPLÉMENTATION EN CHOLÉCALCIFÉROL : UNE NOUVELLE STRATÉGIE PROPHYLACTIQUE CHEZ LE PATIENT DIABÉTIQUE ?

- La prévalence de l'hypovitaminose D est élevée chez le patient diabétique. Or, le taux circulant de calcidiol a été associé dans de nombreuses études au développement des maladies cardiovasculaires.
- La vitamine D est en effet une hormone possédant des effets à la fois systémiques et directs sur le cardiomyocyte. Elle intervient ainsi dans l'homéostasie calcique et dans la régulation de l'immunité, de l'inflammation et de la prolifération cellulaire, et, plus spécifiquement, dans la modulation de l'hypertrophie, de la fibrose, de la contractilité et de la relaxation myocardiques.
- Les études menées chez des patients en insuffisance cardiaque ont largement rapporté les effets bénéfiques de la supplémentation en vitamine D. Or, à ce jour, très peu de données sont disponibles dans la littérature concernant les effets d'une supplémentation en vitamine D dans la cardiomyopathie diabétique.

**Le deuxième objectif de ces travaux de thèse sera donc d'évaluer les effets d'une supplémentation en cholécalciférol sur la fonction cardiaque de patients diabétiques de type 2, mais également d'élucider les mécanismes sous-jacents dans un modèle de souris diabétique de type 2.**







# MATÉRIELS & MÉTHODES





**D**ans le cadre de cette thèse, deux études ont été menées.

L'étude 1, purement clinique, s'est intéressée à l'utilité de l'échocardiographie de stress dans le dépistage des altérations précoces de la fonction régionale myocardique chez le patient asymptomatique présentant un diabète de type 2 non-complicqué. Cette première étude a bénéficié d'un financement par la bourse de recherche « insuffisance cardiaque » de la Société Française de Cardiologie (appel 2014), dotée par Novartis® et soutenant les projets de recherche clinique visant à améliorer les connaissances et/ou la prise en charge des patients souffrant d'insuffisance cardiaque.

L'étude 2 est en revanche une étude translationnelle, menée en parallèle chez l'Homme et la souris, qui a porté sur l'effet d'une supplémentation en Vitamine D<sub>3</sub> sur la fonction myocardique dans le diabète. Une population de patients asymptomatiques présentant un diabète de type 2 non-complicqué a été investiguée pour le versant clinique, tandis que des travaux expérimentaux ont été conduits chez des souris soumises à un régime diabétogène.

Les deux protocoles cliniques (études 1 & 2) mis en place sont des études cas-contrôle prospectives et mono-centriques menées en collaboration avec les services de cardiologie et d'endocrinologie du centre hospitalier Henri Duffaut d'Avignon. L'étude expérimentale (étude 2) a, quant à elle, été menée en collaboration avec l'équipe 1 de l'UMR 1260 INSERM/INRA/AMU Centre de Recherche en Cardiovasculaire et Nutrition (C2VN).

## I- PROTOCOLES CLINIQUES – Études 1 & 2

Les projets ont été soumis au Comité de Protection des Personnes se livrant à des Recherches Médicales de Nîmes et ont reçu un avis favorable (N° IRB 15.05-01 et 18.01-01). Ils ont également été déclarés à la CNIL (N° qVU13529473) et enregistrés sur la base de données ClinicalTrials.gov (N° NCT 02505451 et NCT03437421).

### 1- Populations

Dans le cadre des deux études cliniques, les patients ont été recrutés au sein des services de cardiologie et d'endocrinologie du CH Henri Duffaut d'Avignon. Pour la première étude, deux groupes ont été constitués : un premier groupe de patients, non-diabétiques et ne présentant pas de syndrome métabolique (selon la définition harmonisée de 2009 (Alberti *et al.*, 2009)), dits « contrôles » (CTRL), recrutés à l'occasion d'exams de routine au sein du centre hospitalier et un



deuxième groupe de patients diabétiques de type 2 (selon la définition de l'*American Diabetes Association* (American Diabetes Association, 2017)) dits « diabétiques de type 2 » (T2DM). Dans le cadre de la deuxième étude, un seul groupe a été mis en place, composé de patients diabétiques évalués avant et à l'issue d'une période de 3 mois de supplémentation en VitD<sub>3</sub>. Pour l'ensemble, les patients devaient être âgés de 40 à 69 ans ; les groupes de l'étude 1 ont été appariés en âge et en sexe.

#### Critères d'exclusion pour l'ensemble des sujets

- × Obésité sévère (IMC >35 kg/m<sup>2</sup>)
- × hypertension mal contrôlée (>140/95)
- × Artériopathie des membres inférieurs (> au stade II de Leriche)
- × Cardiopathie ou insuffisance coronaire
- × FE <55%
- × Hypertrophie ventriculaire gauche modérée à sévère (>109g/m<sup>2</sup> pour les femmes, >132g/m<sup>2</sup> pour les hommes)
- × Syndrome d'apnée du sommeil
- × Dysthyroïdie mal compensée
- × Pathologie chronique
- × Incapacité à donner un consentement écrit éclairé

#### Critères d'exclusion des patients T2DM de l'étude 1

- × Déséquilibre glycémique important (HbA1c >9%)
- × Insulinothérapie
- × Neuropathie autonome ou périphérique diabétiques sévères
- × Rétinopathie diabétique sévère
- × Néphropathie diabétique avancée (définie par une protéinurie documentée et/ou une insuffisance rénale)

#### Critères d'exclusion des patients T2DM de l'étude 2

- × Déséquilibre glycémique important (HbA1c >9%)
- × Neuropathie autonome ou périphérique diabétiques sévères
- × Rétinopathie diabétique sévère



- × Néphropathie diabétique avancée (définie par une protéinurie documentée et/ou une insuffisance rénale)

Dans le cadre de la seconde étude, le groupe T2DM a été sous-divisé en quatre sous-catégories, selon le taux sanguin en 25-OH-D<sub>3</sub> :

- « non déficients » : 25-OH-D<sub>3</sub> ≥30ng/mL → **T2DM-N**
- « insuffisants » : 29 ≥ 25-OH-D<sub>3</sub> ≥20 ng/mL → **T2DM-I**
- « déficients » : 19 ≥ 25-OH-D<sub>3</sub> ≥10 ng/mL → **T2DM-D**
- « carencés » : 25-OH-D<sub>3</sub> <10 ng/mL → **T2DM-C**

Le consentement écrit et éclairé des patients a été recueilli avant toute inclusion au protocole.

Dans le cadre de la première étude, un effectif final de 35 patients CTRL (17 hommes et 18 femmes) et 44 patients T2DM (26 hommes et 18 femmes), âgés de 40 à 66 ans, a pu être inclus (organigramme de recrutement figure 43).

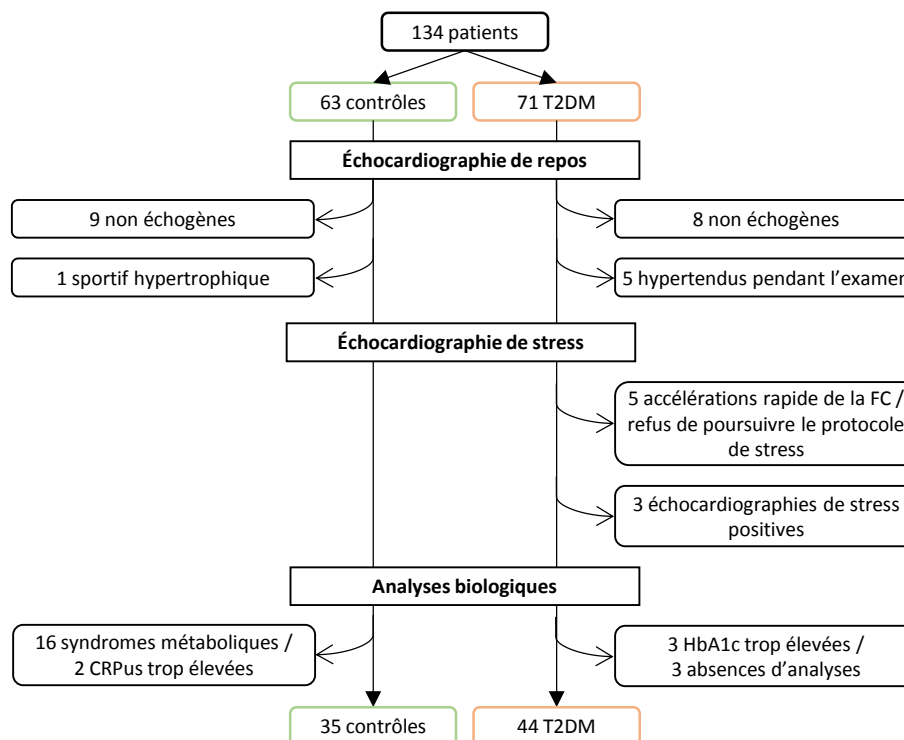


Figure 43. Organigramme de recrutement des patients de l'étude 1.

Dans le cadre de la deuxième étude, un effectif temporaire de 6 patients T2DM-N (6 hommes) et 20 patients carencés (toutes catégories confondues, 9 hommes et 11 femmes) et ayant



suivi le protocole de supplémentation à terme a pu être recruté à ce jour (organigramme de recrutement figure 44), l'objectif à termes étant le recrutement de 45 patients dans chacun des deux groupes.

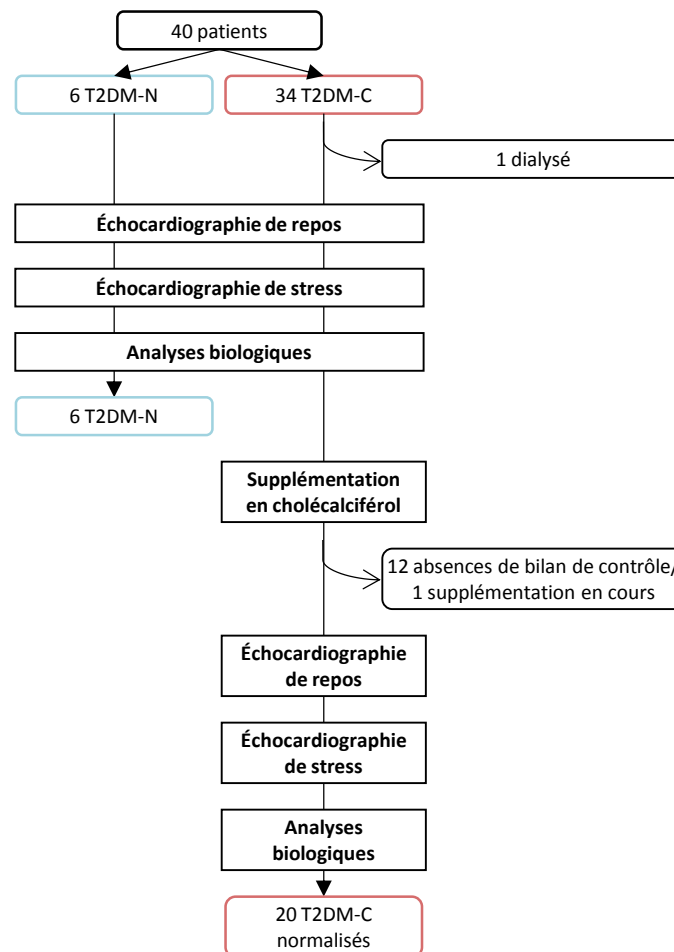


Figure 44. Organigramme de recrutement des patients de l'étude 2.

## 2- Examen clinique, anthropomorphique et biologique préalable

À l'inclusion dans le protocole, un entretien médical permet d'identifier les différents antécédents familiaux, les facteurs de risque tels que le tabagisme, l'historique du diabète, l'hypertension artérielle ainsi que les traitements médicaux. Un examen médical est également réalisé afin de déterminer les paramètres anthropomorphiques (taille, poids, calcul du IMC et tour de taille).

Dans un deuxième temps, un bilan sanguin complet à jeun est fait. La clairance de la créatine, l'albuminémie, la thyroïdostimuline (TSH), la protéine C-réactive (méthode ultra-sensible, CRP<sub>us</sub>) ainsi que le N-terminal pro-peptide natriurétique de type B (NT-ProBNP) sont dosés. Afin d'évaluer les



métabolismes lipidiques et glucidiques des patients, la glycémie, l'insulinémie, le cholestérol total, le HDL-cholestérol, le LDL-cholestérol et les TG sont également dosés chez tous les sujets. Chez les patients T2DM, un contrôle de l'HbA1c est effectué si le dernier dosage date de plus d'un mois. La sensibilité à l'insuline est évaluée par l'*homeostasis model assessment of insulin resistance* (HOMA-IR), un indice reposant sur la glycémie et l'insulinémie à jeun (Matthews *et al.*, 1985).

Dans le cadre de la deuxième étude, le dosage de la VitD<sub>3</sub> est également effectué, ainsi que celui de la PTH, la calcémie et la phosphorémie.

### 3- Bilan échocardiographique

Toutes les acquisitions échocardiographiques ont été réalisées par un cardiologue expérimenté.

Un échographe Vivid E95™ (GE Healthcare, Chicago, États-Unis) équipé de la sonde M5Sc™ (1,4-4,6 MHz) a été utilisé.

Les évaluations ont été systématiquement réalisées dans la pénombre, le sujet positionné en décubitus latéral gauche. L'électrocardiogramme de surface est enregistré tout au long de la procédure et les PA du patient sont relevées automatiquement par un moniteur (Vital Signs Monitor M3™, Edan Instruments Inc., Shenzhen, Chine).

Chaque paramètre est moyenné sur 3 à 5 cycles cardiaques.

Pour toutes les mesures réalisées, les normes de l'*American Society of Echocardiography* (ASE) sont respectées (Lang *et al.*, 2015a; Nagueh *et al.*, 2016).

Tout traitement par  $\beta$ -bloquant est interrompu 72h au moins avant l'échocardiographie de stress.

#### a) Échocardiographie conventionnelle au repos du cœur gauche (études 1 & 2)

##### 1. Dimensions cardiaques

La surface, la longueur et le volume ventriculaires, mesurés en TS et TD, sont moyennés à partir de coupes apicales 2C et 4C. La surface atriale est évaluée en TD sur une coupe 4C et le volume atrial est calculé en biplan à partir des coupes 2C et 4C.

Les épaisseurs pariétales (PW et IVS) ainsi que les diamètres internes (ventricule, chambre de chasse, oreillette) TS et TD du cœur gauche sont quant à eux mesurés en mode temps-mouvement à partir d'une coupe PSLAX.



La LVM est calculée suivant la formule de Devereux (Devereux *et al.*, 1986), puis indexée à la taille<sup>2.7</sup>, afin de tenir compte des variations de masse corporelle attendues entre les populations (Cuspidi *et al.*, 2009).

## 2. Indices fonctionnels

### Fonction systolique

La FE est calculée par la méthode Simpson biplan à partir des volumes TD et TS précédemment mesurés.

La vitesse longitudinale systolique de déplacement des parois ( $s'$ ) est évaluée au niveau de l'anneau mitral en mode Doppler tissulaire, à partir d'une incidence apicale 4C pour les parois septales et latérales et à partir d'une coupe apicale 2C pour les parois antérieures et inférieures. La valeur rapportée par la suite est la moyenne des mesures effectuées au niveau des 4 parois.

### Fonction diastolique

Les vitesses maximales diastoliques du flux transmitral (onde E protodiastolique et onde A de remplissage actif par contraction atriale), ainsi que le temps de décélération de l'onde E, sont mesurés en Doppler pulsé à partir d'une coupe apicale 4C. Le rapport E/A est calculé par la suite.

Le temps de relaxation isovolumique est évalué en coupe apicale 5 cavités par l'enregistrement simultané, en Doppler pulsé, du flux transmitral et du flux aortique, permettant la mesure du temps entre la fermeture de la valve aortique et l'ouverture de la valve mitrale.

Les vitesses longitudinales diastoliques de déplacement des parois (pic protodiastolique  $e'$  et pic tardif  $a'$ ) sont évaluées, comme précédemment décrit en systole, au niveau de l'anneau mitral en mode Doppler tissulaire, à partir d'une coupe apicale 4C pour les parois septales et latérales et à partir d'une coupe apicale 2C pour les parois antérieures et inférieures. La moyenne des pics  $e'$  et  $a'$  est calculée à partir des 4 parois. Le rapport  $E/e'$  ( $e'$  étant obtenu à partir de la moyenne des pics  $e'$  septal et  $e'$  latéral, conformément aux recommandations de l'*American Society of Echocardiography* et de l'*European Association of Cardiovascular Imaging*, Nagueh *et al.*, 2016), considéré comme étant un bon indicateur des pressions de remplissage du VG, est ensuite calculé (Nagueh *et al.*, 2016).

### ***b) Protocole de stress à la dobutamine***

Une perfusion intraveineuse de DB est mise en place suite à l'échocardiographie de repos. Des doses croissantes, de 10 à 40  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ , sont perfusées par paliers de 3 minutes.





À partir de  $20 \mu\text{g.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$  de DB, de l'atropine est administrée, si nécessaire, par doses incrémentales de 0,25 mg et jusqu'à 1,5 mg, afin de lever l'inhibition muscarinique et d'atteindre la FC maximale théorique ajustée à l'âge (FC maximale théorique =  $220 - \text{âge}$ ).

À la fin du protocole de stress, une demi-ampoule de 10 mg d'aténolol est administrée afin de faire chuter la FC. Au besoin, l'autre moitié peut être administrée dans les minutes qui suivent.

Les patients sont par la suite gardés 1h en observation en ambulatoire.

### *c) Enregistrement de boucles pour l'analyse en Speckle-tracking imaging*

Afin de conduire *a posteriori* l'analyse en mode 2D-STI, des boucles sont enregistrées, sur 5 cycles cardiaques (de pic à pic du QRS), au repos et sous faible dose de DB, avec une FC cible comprise entre 110 et 120 bpm en condition de stress. Une analyse sous faible dose de DB est préférée à la forte dose afin de maintenir une qualité d'imagerie suffisante, associée à une FC qui permette un bon suivi des points lors de l'analyse, tout en visant à limiter les effets de la dobutamine sur les conditions de charge.

Des coupes apicales 4C, 2C ainsi que des coupes PSAX à la base, aux piliers et à l'apex sont enregistrées. Afin de garantir la qualité de l'analyse, quelle que soit la FC, la fréquence d'acquisition est fixée à 100 images par seconde minimum.

### *d) Analyse en mode Speckle-Tracking Imaging bidimensionnel*

L'analyse par 2D-STI est réalisée grâce au logiciel EchoPAC 201™ (GE Healthcare, Chicago, États-Unis) à partir des boucles de 5 cycles préalablement enregistrées. Pour chaque coupe, les 3 cycles cardiaques proposant la meilleure qualité d'imagerie sont sélectionnés puis analysés un à un avant moyennage.

Les points définissant l'endocarde sont tout d'abord placés manuellement par l'opérateur, au moment du cycle offrant la meilleure visibilité du sous-endocarde myocardique. Le tracé de l'épicarde est ensuite automatiquement déterminé par le logiciel, et ajusté selon besoin. Le bon suivi des points est vérifié visuellement avant approbation du calcul. En cas de mauvais suivi, les points peuvent être replacés manuellement ou le segment exclu de l'analyse. Cependant, au-delà de 3 segments exclus sur les 6 segments du modèle, le cycle est éliminé.

Les résultats obtenus sont ensuite exportés pour être analysés par un script développé à cet effet sur le logiciel Scilab 4.1™ (Scilab Entreprises, Versailles, France) au sein de notre laboratoire. Ce script va, entre autres, permettre de normaliser l'échelle de temps en pourcentage du temps de



fermeture des valves aortiques (délai entre le pic du QRS et la fin du flux sous-aortique), d'extraire les valeurs de pic moyennées des différents paramètres et de calculer le *twist* (torsion calculée à partir des données de rotation obtenues à partir des coupes PSAX à l'apex et à la base).

Enfin, le *Strain imaging diastolic index* (SI-DI, figure 45), un indice sensible aux variations rapides des pressions de remplissage du VG, est calculé selon la formule :

$$SI - DI = \frac{a - b}{a}$$

Avec *a* : valeur du *strain* au temps de fermeture des valves aortiques et *b* : valeur du *strain* au 1/3 de la diastole (Chiang *et al.*, 2014).

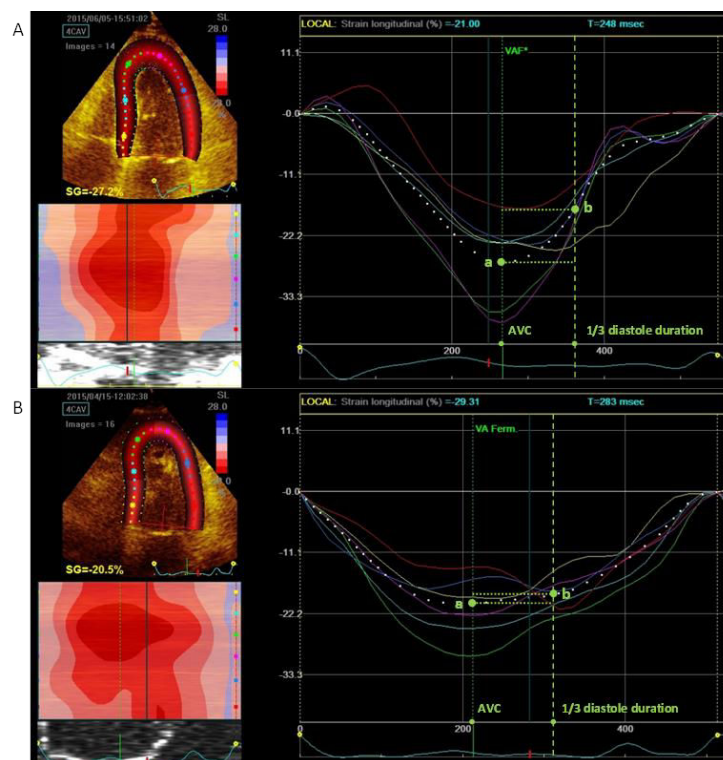


Figure 45. Calcul du SI-DI chez A) un patient contrôlé et B) un patient diabétique.

#### e) Mesure du tissu adipeux épocardique

L'épaisseur du TAE est mesurée suivant les recommandations de Iacobellis *et al.* (Iacobellis *et al.*, 2003; Iacobellis & Willens, 2009).

Le TAE est situé au niveau du sous-épicaarde et s'identifie en échocardiographie comme l'espace non échogène situé entre l'épicaarde et le feuillet externe de la paroi myocardique (voir figure 46). Il se mesure sur les coupes PSLAX et PSAX, perpendiculairement à la paroi libre du ventricule droit et dans l'axe défini par les valves aortiques. Le TAE étant compressé en TD, la mesure



s'effectue en TS. La valeur retenue est la moyenne des mesures obtenues, en triplicata, aux deux incidences.

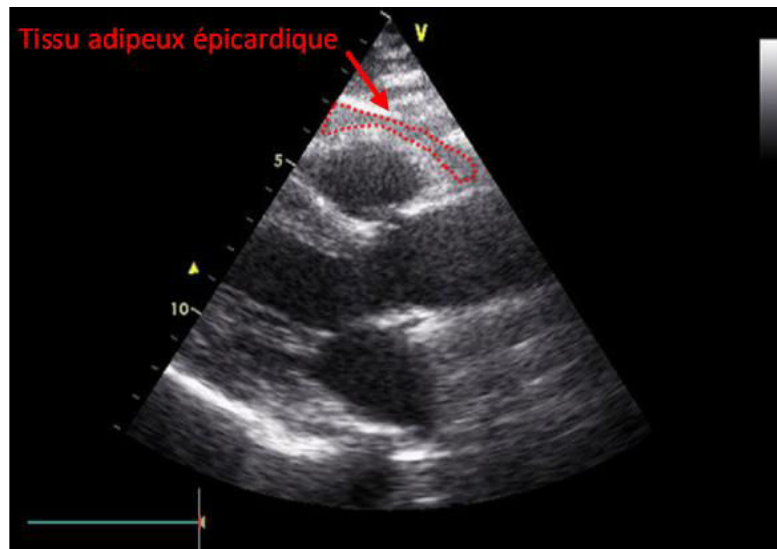


Figure 46. Identification du tissu adipeux épigardique en échocardiographie (Iacobellis & Willens, 2009).

#### 4- Supplémentation en vitamine D<sub>3</sub> (étude 2)

Selon leur taux sanguin en 25-OH-D<sub>3</sub>, trois protocoles de supplémentation adaptés (proposés par le service d'endocrinologie, d'après les recommandations de société savantes (Benhamou *et al.*, 2011; Pramyothin & Holick, 2012) sont appliqués chez les patients T2DM déficients :

- Pour les patients du groupe **T2DM-I** : **200 000 UI**, soit deux ampoules d'UVEDOSE™ (Laboratoires Crinex, Montrouge, France) à 100 000 UI, à prendre le jour même (T0) puis 15 jours après (T15).
- Pour les patients du groupe **T2DM-D** : **300 000 UI**, soit trois ampoules d'UVEDOSE™ à prendre à T0, T23 et T45.
- Pour les patients du groupe **T2DM-C** : **400 000 UI**, soit quatre ampoules d'UVEDOSE™ à prendre à T0, T15, T30 et T45.

Suite à cette supplémentation, un contrôle, comprenant uniquement des analyses biologiques, est effectué :

- 4 semaines après la dose T15 pour le groupe T2DM-I (soit T45)
- 2 semaines après la dose T45 pour le groupe T2DM-D (soit T60)
- 2 semaines après la dose T45 pour le groupe T2DM-C (soit T60)



En cas de taux sanguin  $<30\text{ng/mL}$  de 25-OH-D<sub>3</sub>, une dose d'entretien de 5 gouttes/jour (soit 1 000 UI) de DÉDROGYL™ (DB Pharma, La Varenne-Saint-Hilaire, France) est prescrite au patient jusqu'à la fin du troisième mois de supplémentation. Un bilan échocardiographique final est effectué à la fin du troisième mois (protocole illustré figure 47).

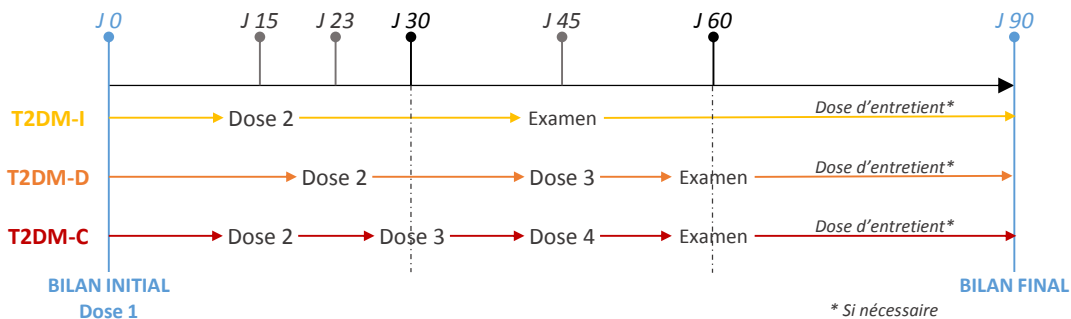


Figure 47. Protocole de supplémentation en cholécalciférol des patients de l'étude 2.

## II- PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL – Étude 2

### 1- Modèle animal

Tous les protocoles expérimentaux sont conformes aux Directives Parlementaires Européennes 2010/63/EU (N°CEEA-00322.03) et ont été approuvés par le comité d'éthique local (Dossier n°2017071209197796-OBERT).

Les souris utilisées dans le cadre de cette étude sont de souche C57Bl/6JRj (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France) et ont été hébergées en animalerie dans des conditions contrôlées (cycle 12h lumière/12h obscurité, température ambiante  $21\pm 1^\circ\text{C}$ , taux d'humidité  $60\pm 10\%$ ), avec un accès *ad libitum* à la nourriture et à la boisson. Les animaux sont reçus à l'animalerie à l'âge de 6 semaines et acclimatés aux conditions d'hébergement pendant 2 semaines.

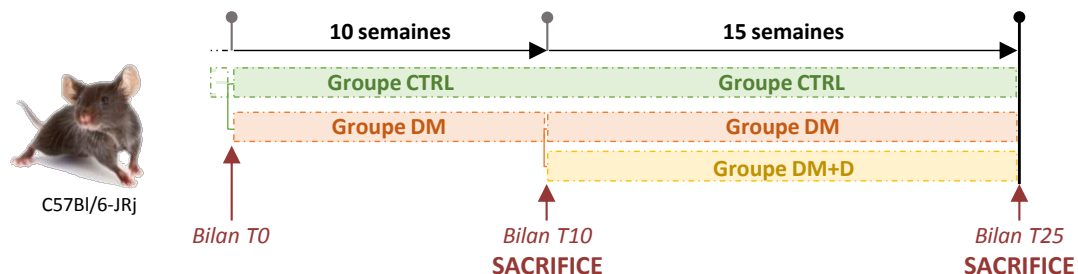


Figure 48. Protocole expérimental de l'étude 2.



Le protocole général est décrit figure 48. Pour limiter l'impact des différentes manipulations sur les animaux, des lots de souris différents sont utilisés selon les évaluations.

## 2- Régime diabétogène et supplémentation en vitamine D<sub>3</sub>

À l'âge de 10 semaines, les souris sont randomisées en deux groupes de régime :

- Régime contrôle (CTRL) : croquettes A04 (SAFE Diets, Augy, France) et eau (figure 49).

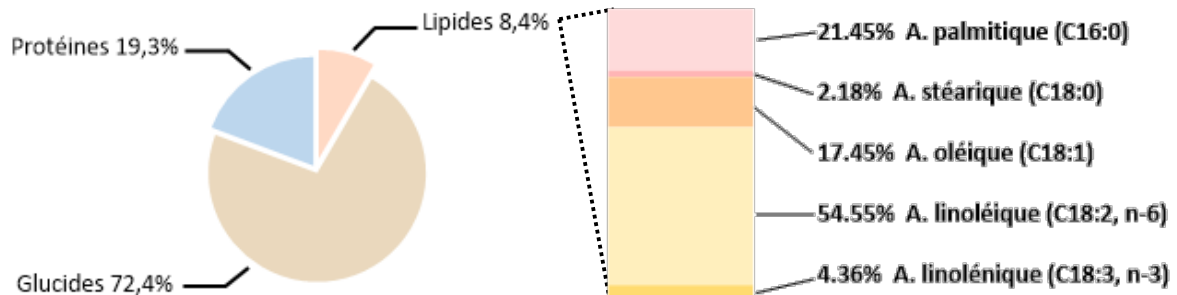


Figure 49. Composition des croquettes A04, exprimée en pourcentage des apports énergétiques et composition en lipides, exprimée en pourcentage des lipides mentionnés dans la composition.

- Régime diabétogène (DM) : pâte HF230 (SAFE Diets, Augy, France) et eau à 10% de saccharose (ThermoFisher Scientific, Waltham, États-Unis) (figure 50).

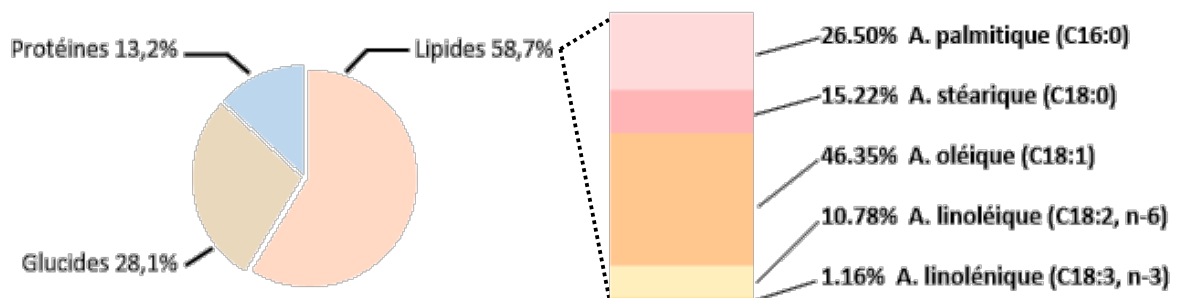


Figure 50. Composition de la pâte HF230, exprimée en pourcentage des apports énergétiques et composition en lipides, exprimée en pourcentage des lipides mentionnés dans la composition.

Les animaux suivent ces régimes pendant 10 semaines, puis le groupe DM est subdivisé en deux groupes de régime :

- Régime DM, poursuit le régime diabétogène (pâte HF230 et eau à 10% de saccharose).



- Régime DM supplémenté en VitD<sub>3</sub> (DM+D) : pâte HF230 enrichie en VitD<sub>3</sub> à 15 000 UI/kg (SAFE Diets, Augy, France) et eau à 10% de saccharose.

Les souris suivront ces régimes jusqu'à la fin du protocole, pendant les 15 semaines suivantes, soit 25 semaines de protocole au total.

### 3- Suivi longitudinal

Hormis les pesées et le suivi de la prise alimentaire, les évaluations faisant partie du suivi longitudinal (« bilans ») des souris sont effectuées avant la mise en place du régime obésogène et diabétogène (T0) ; puis avant la mise en place de la supplémentation en VitD<sub>3</sub> (T10) ; en milieu de supplémentation (T17) et en fin de protocole (T24).

#### *a) Poids*

Les animaux sont pesés hebdomadairement à partir de la mise en place des groupes de régime (à l'âge de 10 semaines) et jusqu'à la fin des 25 semaines du protocole.

#### *b) Prise alimentaire*

La prise alimentaire des souris est mesurée de la mise en place des groupes de régime jusqu'à la fin du protocole. La pesée est effectuée à chaque renouvellement de l'aliment, soit trois fois par semaine. La consommation de boisson est également suivie.

#### *c) Homéostasie glucidique*

Afin de contrôler l'état de l'homéostasie glucidique des animaux et d'évaluer l'effet diabétogène du régime, la glycémie à jeun puis la réponse à l'insuline (*Intra-Peritoneal Insulin Tolerance Test*, IPITT) sont mesurées.

Les animaux sont mis à jeun dans des cages propres (afin d'éviter la coprophagie) 6h avant le début du test (Andrikopoulos *et al.*, 2008; Ayala *et al.*, 2010).

La mesure de la glycémie est réalisée grâce à un lecteur de glycémie à bandelettes (CareSens N™, Dinno Santé, Bussy-Saint-Georges, France), à partir d'une gouttelette de sang. Le prélèvement est effectué à partir d'une petite incision au scalpel dans le tiers supérieur de la queue, après anesthésie locale avec une crème de lidocaïne-prilocaine (Biogaran, Colombes, France).

Après la mesure de la glycémie à jeun, le test de tolérance à l'insuline est effectué. Une dose d'1 UI.kg<sup>-1</sup> d'insuline est injectée en intra-péritonéal, pour un volume d'injection de 0,1 mL/10 g pc (Andrikopoulos *et al.*, 2008; Ayala *et al.*, 2010). La glycémie est ensuite mesurée 10, 30, 60, 90 et 120



min après l'injection. Les valeurs obtenues sont exprimées en fonction du temps et le pic minimum de glycémie, le temps du pic ainsi que l'aire sous la courbe sont relevés.

#### d) Fonction cardiaque

Un bilan cardiaque complet est réalisé par échocardiographie avec le système d'imagerie Vevo 3100™ (Fujifilm VisualSonics, Toronto, Canada) équipé de la sonde MX550D™ (22-55 MHz).

La souris est préalablement anesthésiée par l'inhalation d'un mélange à 4% d'isoflurane (IsoFlo™, Zoetis, Parsippany, États-Unis) dans de l'air médical (22% O<sub>2</sub>, 78% N<sub>2</sub>) (Air Liquide, Paris, France) ventilé à un débit d'1L.min<sup>-1</sup>. L'anesthésie est ensuite maintenue au masque pendant toute la durée de l'examen par un mélange de 1% à 1,5% d'isoflurane dans l'air médical, ventilé à 1L.min<sup>-1</sup>. L'animal est positionné en décubitus dorsal sur une plaque chauffante permettant le maintien de sa température corporelle, suivie par sonde rectale, ainsi que la détection de son rythme respiratoire. L'ECG est monitoré tout au long de l'examen grâce aux électrodes présentes au niveau des pattes sur cette même plaque (figure 51).



Figure 51. Échocardiographie chez la souris.

Le post-traitement des images est effectué à l'aide du logiciel VevoLab™ (Fujifilm VisualSonics, Toronto, Canada) et l'analyse du *strain* est réalisée grâce au logiciel VevoStrain™ (Fujifilm VisualSonics, Toronto, Canada).

Chaque paramètre est moyenné sur 3 cycles cardiaques et toutes les mesures sont réalisées entre deux pics inspiratoires.



## 1. Bilan cardiaque de repos

### Dimensions cardiaques

Les diamètres et épaisseurs pariétales antérieures et postérieures TS et TD (respectivement LVDs, LVDD, AWs, AWd, PWs, PWD) du VG sont mesurés en mode temps-mouvement à partir des coupes PSLAX et PSAX (figure 52). La masse (LVM) est ensuite automatiquement calculée, de même que les volumes TD et TS (LVEDV, LVESV):

$$LVM = 1,053 \times [(LVDD + PWD + AWd)^3 - LVDD^3]$$

$$LVE_{xV} = \frac{7}{2,4 \times LVD_x} \times LVD_x$$

Le RWT est calculé manuellement par la suite.

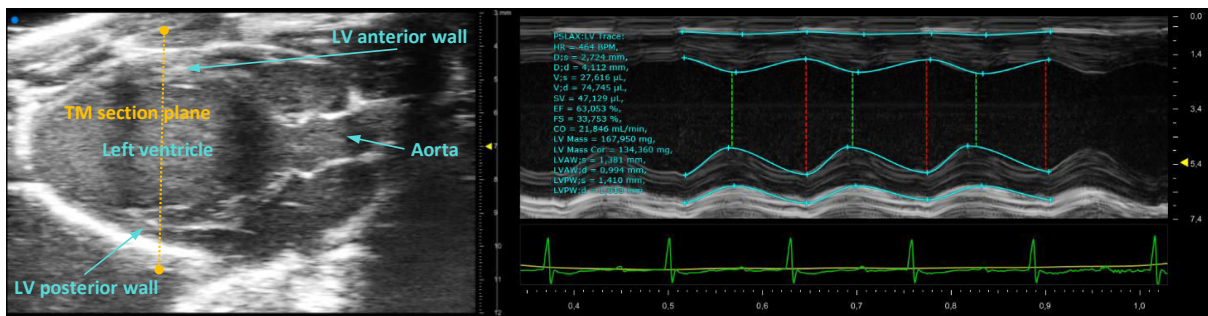


Figure 52. Mesure des dimensions cardiaques en mode temps-mouvement à partir d'une coupe PSLAX.

### Indices fonctionnels

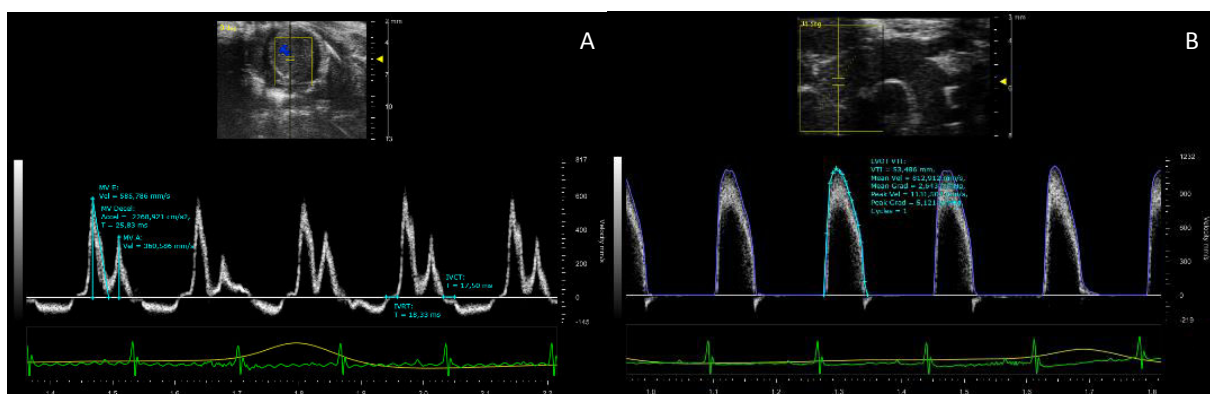


Figure 53. Mesure des indices fonctionnels cardiaques. A) Flux transmittal B) Flux aortique.





- **Fonction systolique**

La FE et la fraction de raccourcissement sont calculées à partir des dimensions cardiaques mesurée en coupe PSLAX. L'intégrale temps-vitesse (VTI), la vitesse pic d'éjection et le temps d'éjection du flux aortique sont mesurés en mode Doppler pulsé, à partir d'une coupe sus-sternale de l'aorte ascendante (figure 53B). Après la mesure du diamètre de l'aorte (AoD) à l'insertion des valves sigmoïdes en mode 2D, sur une coupe PSLAX, le volume d'éjection systolique (VES) est calculé selon la formule :

$$VES = VTI \times (\pi \times AoD^2) / 4$$

Le débit cardiaque est ensuite obtenu par le calcul du produit du volume d'éjection systolique par la FC.

- **Fonction diastolique**

Les vitesses maximales des ondes E et A, ainsi que le temps de décélération de l'onde E, sont évalués à partir du flux transmitral, obtenu en coupe apicale 4C (figure 53A). Le rapport E/A est ensuite calculé.

Enregistrement de boucles pour l'analyse du *strain*

Des séquences en mode 2D aux incidences PSLAX et PSAX sont enregistrées pour l'analyse du *strain a posteriori*.

## 2. Protocole de stress à la dobutamine

Suite à l'échocardiographie de repos, une échocardiographie de stress est réalisée. Des séquences en mode temps-mouvement et 2D (pour l'analyse du *strain*) aux incidences PSLAX et PSAX sont enregistrées 5 min après l'injection en intra-péritonéal d'une dose de 1,5 mg.kg<sup>-1</sup> de DB (Panpharma, Luitré, France) (Wiesmann *et al.*, 2001; Stuckey *et al.*, 2012; Calligaris *et al.*, 2013). À la fin de la procédure, un β-bloquant préférentiel des récepteurs β1 (dit « cardiosélectif », l'aténolol (Tenormin®, AstraZeneca, Cambridge, Royaume-Uni) est injecté en bolus d'1 mg.kg<sup>-1</sup> par voie IP afin de stopper les effets de la DB et d'éviter d'éventuels problèmes d'arythmie chez les animaux. À la fin de l'échocardiographie, l'anesthésie est stoppée et la ventilation maintenue jusqu'au réveil, puis la souris est placée sous couveuse à 33°C pendant 45 min afin de limiter les risques d'hypothermie.



### 3. Analyse du strain

Dans un premier temps, les 3 cycles proposant la meilleure qualité d'imagerie sont sélectionnés à l'aide d'un tracé TM. Les points définissant l'endocarde sont ensuite placés sur l'image offrant la meilleure visibilité des parois du myocarde. Le tracé de l'épicarde est automatiquement déterminé par le logiciel, qui segmente également la paroi myocardique selon un modèle à 6 segments. Après correction du tracé, le bon suivi des points est vérifié visuellement avant approbation du calcul. En cas de mauvais suivi, les points peuvent être replacés ou le segment exclu de l'analyse. Cependant, au-delà de 3 segments exclus sur les 6 segments du modèle, l'analyse est éliminée. La moyenne des vitesses de déplacement et des *strain* et *strain rate* des 6 segments est rapportée pour les fonctions longitudinale (en coupe PSLAX) et circonférentielle (en coupe PSAX aux piliers). L'asynchronie pariétale intraventriculaire gauche est estimée, dans les trois dimensions de déformation (longitudinale, circonférentielle et radiale), à l'aide de la mesure des délais maximum d'obtention des *time to peak* de *strain* entre les 6 segments (figure 54).

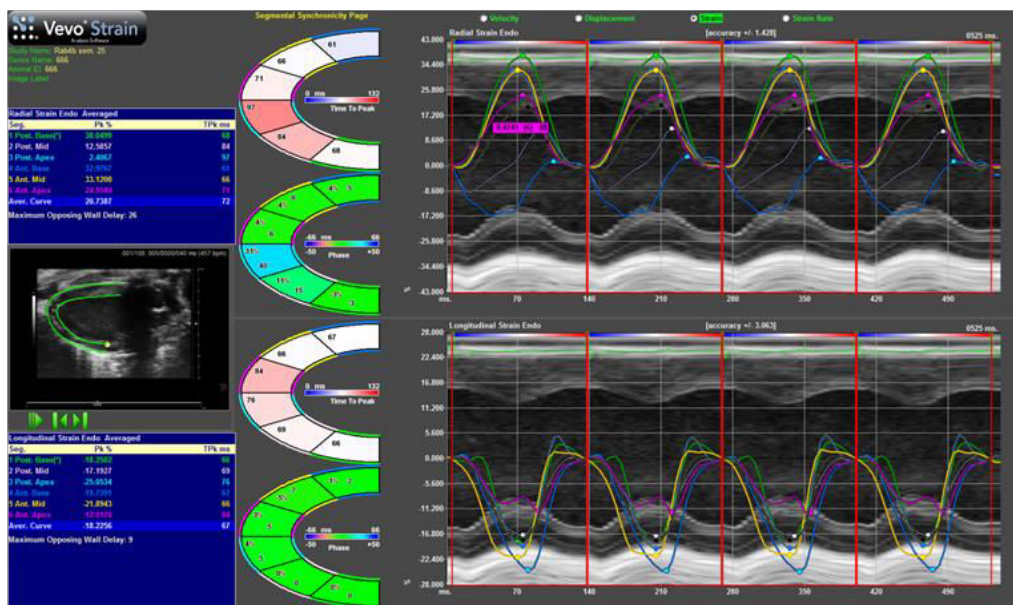


Figure 54. Résultat de l'analyse du strain à partir d'une coupe PSLAX.

### 4- Sacrifice des animaux et échantillonnage

Un premier lot de souris CTRL et DM est sacrifié 10 semaines après la mise en place des régimes, avant le début de la supplémentation en VitD<sub>3</sub>. Les autres animaux sont sacrifiés à la fin du protocole, 25 semaines après la mise en place des régimes.

La veille au soir du sacrifice, les animaux sont mis à jeun (~13h de jeûne). Avant la mise à mort, les souris sont anesthésiées par l'inhalation d'un mélange à 4% d'isoflurane (IsoFlo™, Zoetis,



Parsippany, États-Unis) dans l'air médical ventilé à un débit d' $1\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ . L'anesthésie est maintenue au masque à 1,5% d'isoflurane dans l'air médical, ventilé à  $1\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ , pendant le prélèvement de la totalité du volume sanguin par ponction intracardiaque, sur seringue héparinée (S-Monovette® 1,2mL Hep-Li, Sarstedt, Nümbrecht, Allemagne). Le sang est ensuite centrifugé pendant 10 min à  $3\,000\text{g}$  puis le sérum est aliquoté et congelé à  $-80^\circ\text{C}$  dans l'attente d'être analysé.

Une fois le sang prélevé, la souris est mise à mort par dislocation cervicale. Le cœur, le foie, le rein et la rate sont prélevés et pesés. Le tibia est mesuré afin de calculer le ratio poids du cœur/longueur du tibia, permettant de normaliser le poids du cœur à la taille de la souris et de détecter la présence d'une hypertrophie cardiaque.

Des échantillons de foie et de rein sont plongés dans l'azote liquide ou dans la formaline (Merck KGaA, Darmstedt, Allemagne). Le cœur est nettoyé dans une solution de Krebs (NaCl 118,29 mM, KCl 4,70 mM,  $\text{MgSO}_4$  1,2 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,2 mM,  $\text{NaHCO}_3$  25 mM, glucose 11,10 mM,  $\text{CaCl}_2$  1,25 mM) avant d'être fixé entier dans la formaline, pour les cœurs destinés à l'histologie, ou d'être disséqué en VG et ventricule droit avant d'être plongé dans l'azote, pour les spécimens destinés aux analyses biochimiques. Dans ce cas, le VG est également pesé séparément après dissection.

Les échantillons congelés sont conservés à  $-80^\circ\text{C}$ , les échantillons fixés dans la formaline sont rincés dans du tampon phosphate salin (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  et 2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 24h après, puis conservés dans l'éthanol 70% à  $+4^\circ\text{C}$ .

La rate n'est pas conservée mais son poids est un critère d'exclusion de l'animal du protocole en cas d'élévation importante de celui-ci, signe d'un état inflammatoire majeur pouvant biaiser les résultats des analyses.

## 5- Analyses biochimiques et biomoléculaires

### a) Analyses sur échantillon cardiaque

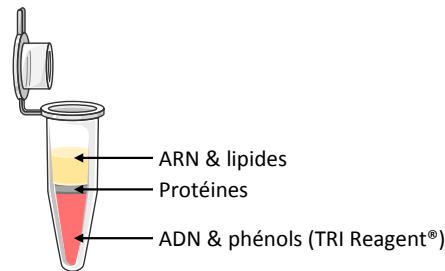
#### 1. Analyse de l'expression génique par RT-qPCR

##### Extraction des ARN

Les ARN totaux sont extraits à partir d'un échantillon de VG de 25mg. Le tissu myocardique est tout d'abord homogénéisé au vibro-broyeur à billes (Retsch GmbH, Haan, Allemagne) dans le TRI Reagent® (Merck KGaA, Darmstedt, Allemagne), une solution permettant la lyse des cellules, tout en préservant les acides nucléiques par l'inhibition des nucléases. Du chloroforme est ensuite ajouté à



l'homogénat obtenu, afin de solubiliser les lipides. Après agitation et une incubation de 5 min, une centrifugation de 15 min à 13000g à 20°C permet d'obtenir une solution triphasique (figure 55).



**Figure 55. Solution triphasique obtenue après centrifugation de l'homogénat.**

La phase supérieure, contenant les ARN et lipides, est prélevée, puis incubée 30 min à -20°C en présence d'isopropanol afin de faire précipiter les ARN. Après une centrifugation de 10 min à 13000g à 4°C, le surnageant est éliminé et le culot d'ARN est lavé par deux fois à l'éthanol 80% et centrifugé 5 min à 7500g à 4°C. Après évaporation complète de l'éthanol, le culot est repris dans 40µL d'H<sub>2</sub>O *RNase free* et thermomixé 5 min à 1500rpm à 65°C, afin de dénaturer les ARN pour la transcription inverse. La réaction est stoppée par la mise dans la glace des échantillons.

#### Dosage des ARN totaux et analyse qualitative

Les ARN précédemment obtenus sont dosés par spectrophotométrie (BioDrop® µLITE, Isogen Life Science, Utrecht, Pays-Bas). La concentration est mesurée à 260nm à partir de 2µL d'échantillon, contre un blanc d'H<sub>2</sub>O *RNase free*. Les absorbances à 230nm (phénols) et 280nm (protéines) sont également lues afin de déterminer les ratios A260/A230 et A260/A280, permettant d'apprécier la qualité des extraits : le ratio A260/A230 permet d'évaluer la contamination phénolique (élimination du TRI Reagent®) et le ratio A260/A280 permet d'évaluer la contamination protéique.

Les échantillons sont conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

#### Transcription inverse

La transcription inverse (*reverse transcription*, RT) est réalisée à partir d'1µg d'ARN totaux. Le volume d'échantillon utilisé est donc ajusté en fonction des concentrations en ARN précédemment mesurées. Les ARN sont incubés 1h à 37°C avec un mix réactionnel préparé à partir du kit M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen™, Carlsbad, États-Unis) et comprenant : du dithiothreitol (DTT), permettant de stabiliser les enzymes et autres protéines possédant des groupes sulfhydriles libres ; la reverse transcriptase *Moloney Murine Leukemia Virus* (M-MVL RT), une ADN polymérase recombinante permettant de synthétiser l'ADNc à partir des ARN ; des désoxynucléotides (dNTP), qui seront intégrés par la M-MVL RT pour synthétiser l'ADNc ; et des hexamères, qui sont des



oligodésoxyribonucléotides courts de séquence aléatoire servant d'amorces. À la fin de l'incubation, de l'H<sub>2</sub>O *RNAse free* est ajoutée et les ADNc sont conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

### PCR quantitative

La PCR quantitative en temps-réel (*quantitative polymerase chain reaction*, qPCR) est réalisée à partir de 2,5µL de la solution d'ADNc préalablement préparée, dans un mix réactionnel composé d'H<sub>2</sub>O *RNAse free*, des amorces sens et antisens correspondant au gène d'intérêt, et du qPCR MasterMix Plus for SYBR® Green I No ROX (Eurogentec, Liège, Belgique), contenant : du MgCl<sub>2</sub> (5mM), des stabilisateurs, l'uracile-N-glycosylase (une enzyme permettant de dégrader les produits de PCR précédentes, qui pourraient contaminer le mix et engendrer des faux-positifs), des dNTPs, l'ADN polymérase HotGoldStar® (une *Taq* polymérase sans activité au-dessous de 74°C et nécessitant une première étape d'activation de 10 min à 95°C) et la sonde fluorescente SYBR Green I, qui émet une lumière verte une fois fixée dans le petit sillon des ADN double brin, permettant ainsi la quantification des produits d'amplification à la fin de chaque cycle d'amplification.

L'ensemble de la réaction est effectuée par le système AriaMX® (Agilent Technologies, Santa Clara, États-Unis). La procédure débute par l'activation de l'uracyl-n-glycosylase, pendant 2 min à 50°C. Une deuxième étape de 10 min à 95°C permet à la fois de désactiver l'uracyl-n-glycosylase et d'activer la HotGoldStar®. Puis s'ensuivent 40 cycles composés d'une étape de dénaturation de 15 sec à 95°C et d'une étape d'hybridation d'1 min à 60°C. La fluorescence est mesurée à la fin de chaque cycle (figure 56).

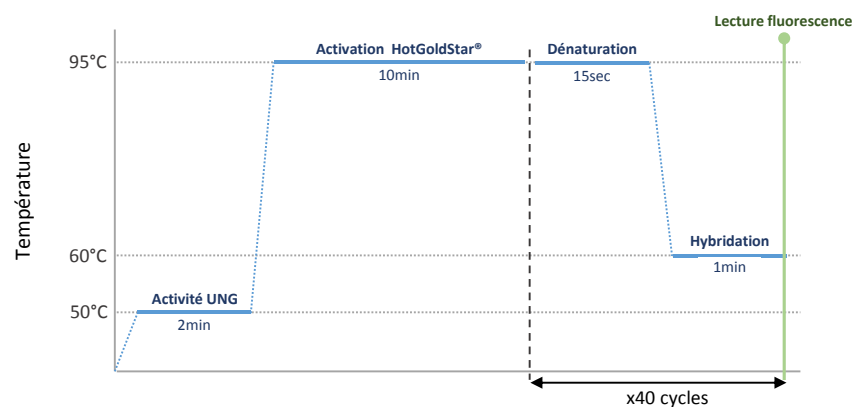


Figure 56. Protocole de qPCR en temps-réel adapté au MasterMix Plus for SYBR® Green I No ROX (Eurogentec, Liège, Belgique).

Les résultats d'expression des gènes d'intérêt sont rapportés à l'expression d'un contrôle interne, la sous-unité ribosomale 18S dans notre cas, qui possède une expression ubiquitaire et non impactée par les conditions expérimentales.



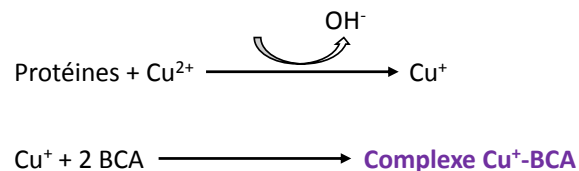
## 2. Activation de la voie NF-κB

### Extraction des protéines

L'extraction des protéines totales est réalisée à partir d'un échantillon de 25mg de VG. Le tissu myocardique est tout d'abord homogénéisé au vibro-broyeur à billes (Retsch GmbH, Haan, Allemagne) dans du tampon D (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/2H<sub>2</sub>O, KCl et cocktail d'inhibiteurs de protéases : AEBSF, Aprotinin, Bestatin, E-64, EDTA, Leupeptin (ref.P2714, Merck KGaA, Darmstedt, Allemagne)). Après une centrifugation à 13000g pendant 5 min, le surnageant est récupéré puis aliquoté pour être conservé à -80°C jusqu'à utilisation.

### Dosage des protéines

Les protéines précédemment extraites sont dosées par le kit colorimétrique Pierce BCA Protein Assay™ (ThermoFisher Scientific, Waltham, États-Unis), reposant sur la méthode du test à l'acide bicinchoninic (*Bicinchoninic acid assay*, BCA) :



Le dosage est réalisé avec 10μL d'échantillon dilué au 10<sup>ème</sup>. Une gamme étalon d'albumine bovine sérique en 6 points est préparée. Après une incubation de 30 min à 37°C avec le réactif, les absorbances sont lues à 562nm, puis la concentration en protéines est calculée d'après la courbe étalon.

### ELISA

L'activation de la voie NF-κB est déterminée par la quantification de la sous-unité P65 phosphorylée rapportée à la P65 totale. Le dosage se fait par la méthode immuno-enzymatique ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) (figure 57), grâce aux kits ELISA NFκB p65 Totale et Phospho [pS536] Multispecies InstantOne™ (Invitrogen™, ThermoFisher Scientific, Waltham, États-Unis). La même procédure est appliquée dans les deux cas. Dans une plaque 96 puits, 50μL d'extrait protéique, d'un contrôle positif (lysate de différents types cellulaires cultivés dans le but d'activer de manière optimale la voie) et d'un contrôle négatif (tampon D d'extraction) sont pipetés. Après ajout du cocktail d'anticorps de capture et de détection, la plaque est incubée 1h à température ambiante, sous agitation douce. Après rinçage, le réactif de détection est ajouté puis une nouvelle incubation de 30 min à l'obscurité est réalisée avant l'ajout de la solution stop. La lecture des absorbances est



immédiatement faite à 450nm puis rapportée par gramme de protéine, avant calcul du ratio  $P65_{phospha}/P65_{totale}$ .

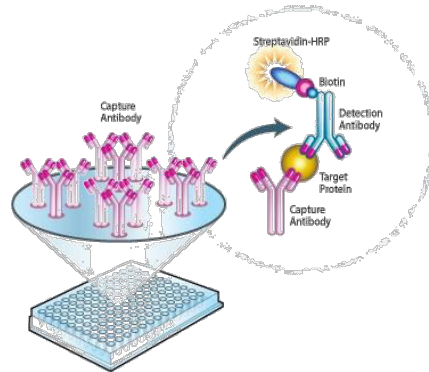


Figure 57. Principe de l'ELISA (Abcam.com).

### 3. Lipidomique et dosage des triglycérides

#### Extraction des lipides

Les lipides cardiaques sont extraits à partir d'un échantillon de 20mg de VG par une double extraction au méthyl tert-butyl éther (MTBE). Après broyage dans l'azote liquide au mortier et pilon, 0,2mL de tampon phosphate salin, 1,5mL de méthanol, 5mL de MTBE et 1,25mL d'eau déionisée sont ajoutés à la poudre de myocarde obtenue afin de réaliser la première extraction. Après 1h d'agitation et 10min de centrifugation à 1000rpm et 10°C, la phase supérieure, lipidique, du liquide biphasique obtenu est prélevée. Puis la deuxième extraction est réalisée sur la phase inférieure du liquide, avec 2mL d'un mélange méthanol/MTBE/H<sub>2</sub>O (10/3/2,5, v/v/v). Après 10 min d'agitation et 10 min de centrifugation à 1000rpm et 10°C, la phase supérieure est pipetée et additionnée à la première phase prélevée. Enfin, une évaporation sous flux d'azote de plusieurs heures permet l'obtention d'un extrait sec pouvant être conservé à -80°C.

#### Lipidomique

Après reprise de l'extrait sec dans 200µL d'un mélange CHCl<sub>3</sub>/méthanol/H<sub>2</sub>O -60/30/4,5, v/v/v), le profil lipidique du myocarde est analysé par chromatographie liquide haute performance, sur une colonne en C18 (Accucore™ 02, ThermoFisher Scientific, Waltham, États-Unis) couplée à une analyse en spectrométrie de masse haute résolution, après ionisation à pression atmosphérique par électrospray, grâce au système hybride quadripôle-Orbitrap™ Q Exactive™ Plus (ThermoFisher Scientific, Waltham, États-Unis) (figure 58). L'ensemble du système est géré par le logiciel Xcalibur™ (ThermoFisher Scientific, Waltham, United-States). L'analyse est réalisée avec un volume d'injection



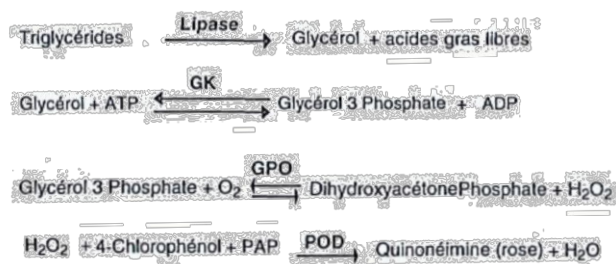
de 2 $\mu$ L et un débit de 0,4mL.min<sup>-1</sup>. La phase mobile est composée de A (acétonitrile/H<sub>2</sub>O, 60/40, 0.1% HCOOH, 10mM formiate d'ammonium) et D (alcool isopropylique/acétonitrile, 90/10, 0.1% HCOOH, 10mM formiate d'ammonium), la phase de reconditionnement de la colonne est B (acétonitrile 100, 0.1% formiate d'ammonium). Ce système permet d'atteindre une précision de masse <2ppm et de caractériser plus de 400 espèces lipidiques appartenant aux classes des glycérolipides (TG, DAG...), glycérophospholipides (lysophosphatidylcholine...), sphingolipides (céramides...), prénoles (ubiquinones...) et stérols (cholestérol...) (Fahy *et al.*, 2005).



Figure 58. Système de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution hybride quadripôle-Orbitrap™ Q Exactive™ Plus (ThermoFisher Scientific, Waltham, États-Unis).

### Dosage des triglycérides

Le contenu myocardique en TG est évalué par un kit colorimétrique reposant sur la méthode de Fossati et Prencipe couplée à une réaction de Trinder (Triglycérides méthode GPO, BIOLABO, Maizy, France) :



Le dosage est réalisé avec 5 $\mu$ L d'extrait lipidique repris dans du NP40 à 4%. Après une incubation de 10 min à température ambiante avec le réactif, les absorbances sont lues à 492nm, puis la concentration en TG est déterminée par référence à une courbe étalon de glycérol en 5 points. Le contenu en TG est ensuite exprimé par gramme de myocarde.





## b) Dosages plasmatiques

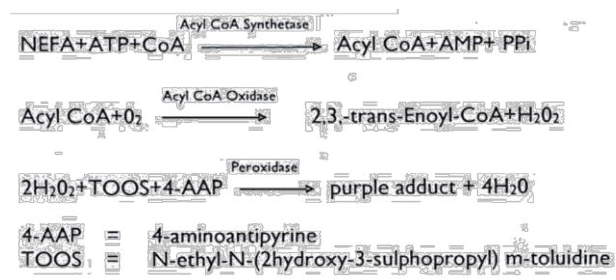
### 1. Métabolisme gluco-lipidique

#### Dosage des triglycérides

Les TG plasmatiques sont dosés par la même méthode que les TG myocardiques, grâce au kit colorimétrique reposant sur la méthode de Fossati et Prencipe couplée à une réaction de Trinder (Triglycérides méthode GPO, BIOLABO, Maizy, France). Ce dosage est réalisé sur 5µL d'échantillon.

#### Dosage des acides gras non-estérifiés

Les AGNE sont dosés par un kit colorimétrique (NEFA, RANDOX, Crumlin, Royaume-Uni) :

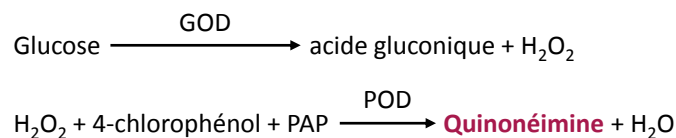


Le dosage est réalisé avec 10µL d'échantillon. Après une première incubation de 10 min à 37°C avec la solution enzymatique puis une deuxième incubation de 10 min à 37°C avec le réactif, l'absorbance est lue contre le blanc réactif (H<sub>2</sub>O) à 540nm, puis la concentration en AGNE est déterminée par référence à l'étalon (1,04mM) grâce au calcul :

$$[\text{NEFA}] = \frac{\text{DO échantillon}}{\text{DO étalon}} \times [\text{étalon}]$$

#### Dosage du glucose

La glycémie est mesurée par un kit colorimétrique reposant sur la méthode de Trinder (Glucose GOD-PAP, BIOLABO, Maizy, France) :



Le dosage est réalisé avec 5µL d'échantillon. Après une incubation de 20 min à température ambiante en présence du réactif, les absorbances sont lues contre le blanc réactif (H<sub>2</sub>O) à 492nm,



puis la concentration en glucose est déterminée par référence à l'étalon (5,55mM / 1g.L<sup>-1</sup>) grâce au calcul :

$$[\text{Glucose}] = \frac{DO \text{ échantillon}}{DO \text{ étalon}} \times [\text{étalon}]$$

#### Dosage de l'insuline

Le dosage de l'insuline est réalisé grâce au kit ELISA Mouse ultrasensitive Insulin ELISA (ALPCO, Salem, États-Unis). Dans une plaque pré-coatée avec les anticorps anti-insuline, 25µL d'échantillon, de blanc réactif (H<sub>2</sub>O) et de standards (gamme étalon en 7 points) sont pipetés, puis incubés 2h à température ambiante avec le conjugué. Après rinçage, le substrat est incubé 30 min avant ajout de la solution stop. La lecture des absorbances est immédiatement faite à 450nm, puis la concentration en insuline est déterminée après analyse de la gamme étalon par un modèle logistique à 5 paramètres.

## 2. Vitamine D et calcium

#### Vitamine D

Le dosage du cholécalférol et de la 25(OH)D est réalisé à partir de 100µL de plasma par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution après extraction et dérivatisation (Bonnet *et al.*, 2018). L'ensemble de la procédure est réalisée sur des échantillons primo-décongelés dans la glace et à l'abri de la lumière. Avant toute manipulation, un étalon interne composé des formes deutérées du cholécalférol et de la 25(OH)D<sub>3</sub> est ajouté à une concentration finale de 2ng/mL aux fractions plasmatiques. Cet étalon permettra de corriger les variations de dosage dues aux biais de pipetage.

Le processus d'extraction des formes de VitD<sub>3</sub> débute par l'ajout d'acétonitrile. Après homogénéisation et centrifugation à 3000g pendant 10min, le surnageant est prélevé et évaporé de la moitié de son volume sous azote. De l'acétate d'éthyle est ensuite ajouté, puis après 10 min d'homogénéisation et 20 min de centrifugation à 590g, la phase organique supérieure est prélevée et évaporée sous azote.

La dérivatisation est ensuite réalisée à partir de l'extrait sec obtenu. Cette opération permet de greffer une molécule de 4-phenyl-1,2,4-triazole-3,5-dione (PTAD) sur les formes à doser, ce qui permet d'augmenter la sensibilité de la détection ; ces molécules étant présentes à des taux inférieurs à 100ng/mL dans le plasma et la quantité d'échantillon limitée chez la souris. Le PTAD à



2mg/mL est ajouté en 2 fois, avec 2 homogénéisations de 10 min. L'ajout d'eau déionisée permet de stopper la réaction. Après évaporation, l'extrait obtenu sera repris dans l'acétonitrile au moment du dosage.

Le dosage est réalisé à partir de 5µL d'extrait. La chromatographie liquide haute performance utilise une colonne en C18 Hypersil GOLD® (ThermoFisher Scientific, Waltham, États-Unis). La phase mobile, composée de A (H<sub>2</sub>O/acide formique, 99,9/0,1) et B (acétonitrile/acide formique, 99,9/0,1) est perfusée à un débit de 0,4mL.min<sup>-1</sup>, selon un gradient décroissant du ratio A/B. La mesure en spectrométrie de masse est ensuite effectuée après ionisation positive par électrospray à pression atmosphérique par le système hybride quadripôle-Orbitrap™ Q Exactive™ Plus, contrôlé par le logiciel Xcalibur™ (ThermoFisher Scientific, Waltham, États-Unis). Au moment de la détection du pic de la molécule d'intérêt, une charge de 20 permet de casser cette molécule mère en molécules filles de masse (m/z) connue. Ce sont ces molécules filles qui seront dosées, ce processus permettant de valider l'identification.

La concentration plasmatique est ensuite déterminée d'après une gamme étalon de 10 standards, concentrés de 100ng/mL à 0,22ng/mL en formes d'intérêt, après report de la surface de pic de la molécule dosée sur la surface de pic de l'étalon interne deutéré.

#### Calcium

Le Ca<sup>2+</sup> plasmatique est dosé à partir de 5µL d'échantillon par un kit colorimétrique reposant sur la méthode Arsenazo III (Calcium méthode Arsenazo III, BIOLABO, Maizy, France) : après une incubation de 1 min à température ambiante, le métallochromogène Arsenazo III forme un complexe coloré avec les ions Ca<sup>2+</sup>, dont l'absorbance est lue à 620nm et 690nm contre le blanc réactif (H<sub>2</sub>O), puis moyennée. La concentration en Ca<sup>2+</sup> est ensuite calculée par référence à l'étalon (2,5mM / 100mg.L<sup>-1</sup>) :

$$[\text{Calcium}] = \frac{DO \text{ échantillon}}{DO \text{ étalon}} \times [\text{étalon}]$$



## 6- Analyses histologiques

### a) Morphologie et fibrose cardiaques

#### 1. Préparation des coupes

##### Déshydratation

La déshydratation des échantillons est réalisée par l'automate Excelsior™ ES (ThermoFisher Scientific, Waltham, États-Unis). Le protocole a pour objectif de remplacer l'eau contenue dans les tissus par de la paraffine. Pour cela les échantillons sont imprégnés dans des bains successifs de degré croissant en alcool (75%, 90%, 95%, 2x100%), puis de xylène et enfin de paraffine liquide. L'ensemble du processus s'opère sur 9h.

##### Inclusion

Les échantillons déshydratés sont inclus en bloc de paraffine à l'aide de la station de travail HistoStar™ (ThermoFisher Scientific, Waltham, États-Unis). Dans la zone chauffée de la station, les cœurs sont placés et orientés dans des moules de taille adaptée puis recouvert de paraffine liquide, avant d'être placés sur une plaque refroidissante permettant la prise de la paraffine. Après quelques minutes, le bloc peut être démoulé.

##### Coupe

Protocole à venir.

#### 2. Coloration

Protocole à venir.

#### 3. Lecture des lames et analyse

Protocole à venir.



### III- ANALYSE STATISTIQUE

Les résultats des protocoles cliniques sont exprimés en moyenne  $\pm$  SD, les résultats de l'étude expérimentale sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. La significativité est définie par  $p < 0,05$ .

Toutes les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel IBM SPSS Statistics 20.0™ (IBM Corp., Armonk, États-Unis).

Avant toute analyse, la Normalité est vérifiée par le test de Shapiro-Wilk et les variables non-Gaussiennes sont log-transformées.

Les variables qualitatives nominales sont analysées par le test du Khi-deux.

Les données non appariées sont analysées par un modèle linéaire généralisé.

Les données appariées (repos vs. DB ou avant vs. après supplémentation au sein de chaque condition) sont analysées par un modèle linéaire général à effets mixtes :

- Pour les données issues de la première étude clinique, l'âge et le sexe sont introduits en covariants, de même que des variables comme les traitements médicamenteux, des facteurs de risque ou des données biologiques, si pertinent. En cas d'interaction significative entre le groupe et la condition, l'analyse est approfondie avec un modèle linéaire généralisé pour comparer les groupes au sein de chaque condition (e.g. repos ou DB) ainsi qu'avec un test t de Student pour échantillons appariés pour comparer les conditions dans chaque groupe.
- Pour les données issues de l'étude expérimentale, la FC ou les valeurs de référence à T0 peuvent être introduites en covariant, si pertinent. En cas d'interaction significative entre le groupe et le temps (T0, T10 et T25), l'analyse est approfondie avec un modèle linéaire généralisé pour comparer les groupes entre eux à chaque temps de mesure ; également un modèle linéaire général à effets mixtes est à nouveau appliqué cette fois au sein de chaque groupe permettant d'évaluer l'effet temps, suivi en cas d'effet général significatif, d'un test post-hoc de Bonferroni permettant de comparer les temps deux à deux.

Les corrélations sont détectées par un test de Pearson et les prédicteurs indépendants sont déterminés par régression linéaire multiple.





# RÉSULTATS





---

## Étude I

---

**Utilité de l'échocardiographie de stress en mode 2D speckle-tracking imaging dans le dépistage des altérations précoces de la fonction régionale myocardique chez le patient asymptomatique présentant un diabète de type 2 non-complicqué**



**Dobutamine Stress Echocardiography Unmasks Early Left Ventricular Dysfunction in Asymptomatic Patients with Uncomplicated Type 2 Diabetes: A Comprehensive Two-Dimensional Speckle-Tracking Imaging Study**

Clothilde Philouze, MS, Philippe Obert, PhD, Stéphane Nottin, PhD, Asma Benamor, MS, Olivier Barthez, MD, and Falah Aboukhoudir, MD, *Avignon, France*

# Dobutamine Stress Echocardiography Unmasks Early Left Ventricular Dysfunction in Asymptomatic Patients with Uncomplicated Type 2 Diabetes: A Comprehensive Two-Dimensional Speckle-Tracking Imaging Study

Clothilde Philouze, MS, Philippe Obert, PhD, Stéphane Nottin, PhD, Asma Benamor, MS, Olivier Barthez, MD, and Falah Aboukhoudir, MD, Avignon, France

**Background:** Discrepancies are present in the literature on resting myocardial mechanics in patients with uncomplicated type 2 diabetes mellitus (T2DM). Data are noticeably sparse regarding circumferential function and torsional mechanics. Resting deformation imaging may not be sensitive enough to detect subtle dysfunctions. The aim of this study was thus to comprehensively evaluate myocardial mechanics in patients with T2DM at rest and to investigate whether dobutamine stress echocardiography could unmask functional alterations that would remain otherwise subtle at rest.

**Methods:** Forty-four patients with T2DM and 35 healthy control subjects of similar age and sex were prospectively recruited. After conventional echocardiography, myocardial mechanics was evaluated at rest and during low-dose dobutamine stress echocardiography (target heart rate, 110 beats/min).

**Results:** Patients with T2DM presented with altered global diastolic function but preserved systolic function. Deformation imaging indexes were similar between groups at rest, but significant differences were noticed under dobutamine infusion for longitudinal strain ( $-21.2 \pm 2.4\%$  vs  $-24.2 \pm 2.5\%$ ,  $P < .001$ ), circumferential strain (apex,  $-32.3 \pm 5.3\%$  vs  $-36.3 \pm 5.3\%$ ,  $P = .002$ ; papillary muscle,  $-25.6 \pm 3.2\%$  vs  $-28.0 \pm 3.6\%$ ,  $P = .001$ ; base,  $-23.2 \pm 3.6\%$  vs  $-25.3 \pm 3.8\%$ ,  $P = .03$ ), apical ( $11.2 \pm 4.4^\circ$  vs  $14.1 \pm 6.3^\circ$ ,  $P = .020$ ) and basal ( $-12.2 \pm 3.3^\circ$  vs  $-14.3 \pm 3.9^\circ$ ,  $P = .021$ ) rotation, and twist ( $21.9 \pm 5.9^\circ$  vs  $26.8 \pm 8.3^\circ$ ,  $P = .007$ ). Multivariate analysis identified epicardial fat, dyslipidemia, and fasting glycaemia as significant contributors to the changes from rest to dobutamine.

**Conclusions:** These findings demonstrate the usefulness of dobutamine stress echocardiography in establishing impairments in myocardial mechanics in patients with uncomplicated T2DM. Systemic metabolic disturbances and epicardial fat act as the main contributors to the blunted response to dobutamine stress in these patients. (J Am Soc Echocardiogr 2017; ■:■-■.)

**Keywords:** Uncomplicated type 2 diabetes, Asymptomatic patients, Dobutamine stress echocardiography, Speckle-tracking imaging, Regional myocardial function, Epicardial adipose tissue

From the EA4278 LaPEC, Laboratory of Cardiovascular Pharm-Ecology, Avignon University (C.P., P.O., S.N., A.B., F.A.), and the Cardiology Department, Duffaut Hospital Center (O.B., F.A.), Avignon, France.

This study was funded by a grant from the French Society of Cardiology.

Conflicts of Interest: None.

Reprint requests: Falah Aboukhoudir, MD, University of Avignon, Faculty of Sciences, 301 rue Baruch de Spinoza, 84916 Avignon Cedex 9, France (E-mail: [faboukhoudir@ch-avignon.fr](mailto:faboukhoudir@ch-avignon.fr)).

0894-7317/\$36.00

Copyright 2018 by the American Society of Echocardiography.

<https://doi.org/10.1016/j.echo.2017.12.006>

Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is a worldwide epidemic that is increasing constantly.<sup>1</sup> The leading cause of morbidity and mortality, as well as the most frequent complication observed in patients with T2DM, is diabetic cardiomyopathy (DMCM).<sup>2</sup> DMCM develops independently from hypertension or coronary artery disease (CAD), and its pathogenesis is thought to begin shortly after the onset of T2DM, emphasizing the importance of early diagnosis.<sup>2</sup>

Largely on the basis of standard echocardiography, the earliest stages of DMCM have long been defined as a diastolic dysfunction with preserved systolic function, as evidenced by a normal left ventricular (LV) ejection fraction. However, the latter is not a sensitive marker for the detection of subclinical systolic dysfunction. The emergence of techniques for analyzing myocardial wall deformation that are sensitive to subtle myocardial impairment made it possible to reveal preclinical LV regional systolic abnormalities<sup>3-5</sup> in T2DM patients with normal

## Abbreviations

$\sigma_{ES}$	= Systolic meridional wall stress
<b>2D</b>	= Two-dimensional
<b>BMI</b>	= Body mass index
<b>BP</b>	= Blood pressure
<b>CAD</b>	= Coronary artery disease
<b>CRP<sub>us</sub></b>	= Ultrasensitive C-reactive protein
<b>CS</b>	= Circumferential strain
<b>DB</b>	= Dobutamine
<b>DMCM</b>	= Diabetic cardiomyopathy
<b>DSE</b>	= Dobutamine stress echocardiography
<b>DTI</b>	= Doppler tissue imaging
<b>EAT</b>	= Epicardial adipose tissue
<b>HR</b>	= Heart rate
<b>LS</b>	= Longitudinal strain
<b>LV</b>	= Left ventricular
<b>SI-DI</b>	= Strain imaging diastolic index
<b>STE</b>	= Speckle-tracking echocardiography
<b>T2DM</b>	= Type 2 diabetes mellitus

conventional echocardiography. However, this finding has not been uniformly reported,<sup>6,7</sup> especially in uncomplicated T2DM. Those discrepancies may likely arise from differences in study populations (e.g., glycemic control, presence of extracardiac complication and comorbidities, insulin therapy).

Most studies performing speckle-tracking echocardiography (STE) in patients with T2DM have focused on longitudinal deformation. However, because of myocardial fiber architecture and geometry, LV function results from a complex interplay between multidirectional (longitudinal, circumferential, and radial) deformations and torsional mechanics. Longitudinal strain (LS) is thus principally governed by the subendocardial layer, whereas midmyocardial and subepicardial fibers are mainly responsible for circumferential strain (CS) and torsional mechanics. Investigating all components of LV regional myocardial function is therefore essential to estimate the transmural impact of T2DM and to provide a pathophysiologic overview of the mechanisms of LV dysfunction.<sup>8</sup> However, current data regarding CS and rotational mechanics are noticeably sparse and conflicting, emphasizing the

need for further investigations.<sup>3-5,9</sup>

Most studies of T2DM have been conducted at rest, and consequently, it might be possible that resting deformation imaging is not sensitive enough to detect subtle dysfunction, especially in uncomplicated T2DM. Dobutamine stress echocardiography (DSE) is usually performed when CAD is suspected, allowing wall motion abnormalities undetectable at rest to be revealed.<sup>10</sup> In T2DM, DSE has already been used in previous studies using Doppler tissue imaging (DTI) and has enabled researchers to unveil LV longitudinal myocardial alterations that remained otherwise subtle at rest.<sup>11,12</sup> However, such an approach exhibits shortcomings. As a result of angle dependency, DTI restricts the evaluation of myocardial deformation to basal and mid segments of the left ventricle in its longitudinal axis only, failing to take into account the complex three-dimensional mechanics of myocardial wall motion.<sup>13</sup> The use of STE attenuates those limitations<sup>14</sup> and, more important, enables the assessment of CS and torsional mechanics, two key components of the myocardial adaptive response to increased workload.<sup>15-17</sup> Using STE during DSE could thus provide a more reliable and comprehensive assessment of the early alterations of the diabetic heart.

Among the different factors that have been linked to LV dysfunction in patients with metabolic diseases, growing evidence suggests that epicardial adipose tissue (EAT) may play a substantial role.<sup>18,19</sup> Because of its tight relationship with the myocardium, EAT actually

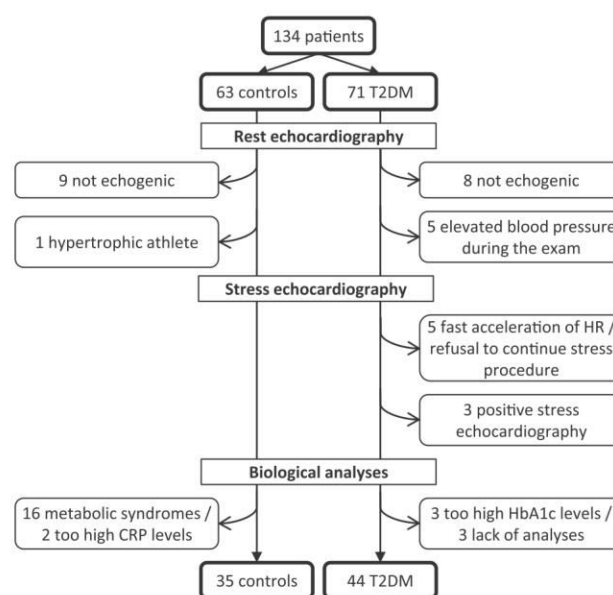


Figure 1 Flowchart of patient recruitment.

influences cardiomyocyte function, being cardioprotective in normal circumstances but becoming a source of proinflammatory cytokines and oxidative stress in a pathologic context.<sup>20,21</sup> However, to our knowledge, no previous study has explored the link between EAT and LV myocardial function in response to DSE in patients with T2DM.

Thus, our aims were, first, to comprehensively study LV longitudinal and circumferential deformation, as well as rotation and twist mechanics, in asymptomatic patients with uncomplicated T2DM at rest and, second, to evaluate whether DSE can unmask functional alterations that would remain subtle at rest. Finally, the third aim of this study was to assess the association between EAT and LV regional myocardial function during DSE.

## METHODS

## Study Population

Patients were prospectively recruited from our cardiology department from January 2015 to July 2016. The exclusion criteria for both populations included severe obesity, insulin therapy, LV ejection fraction < 55%, known cardiovascular diseases, and T2DM-related complications, including moderate to severe autonomic neuropathy, proliferative retinopathy, and nephropathy. An additional exclusion criterion was poor echogenicity. The control subjects were referred for routine checkups, and all had normal physical examination and echocardiographic findings. All subjects were free of epicardial CAD, attested by negative findings on high-dose DSE ( $40 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ) or coronary angiography when appropriate. Patients with hypertension but well-controlled blood pressure (BP) were included. After application of the inclusion and exclusion criteria, a total of 44 patients with T2DM and 35 healthy control subjects of similar age and sex were enrolled (see flowchart, Figure 1). The study was approved by the local human ethics committee (IRB-15/05.01), and all subjects gave written informed consent.

## Clinical and Biologic Assessments

Patients underwent medical examinations, during which ongoing treatments and existence of risk factors were noted. Blood samples were then collected, and fasting glycemia, glycated hemoglobin,

## HIGHLIGHTS

- Regional myocardial dysfunction is imperceptible at rest in patients with uncomplicated T2DM.
- DB stress reveals early regional myocardial dysfunction and can serve as a diagnostic tool.
- Cardiac functional reserve is lost in response to myocardial stress.
- Factors responsible for the blunted myocardial response to  $\beta$ -adrenergic stimulation are delineated.
- These findings enable better understanding of the central origin of exercise intolerance in patients with T2DM.

insulin, total cholesterol, high-density and low-density lipoprotein, triglycerides, ultra-sensitive C-reactive protein (CRP<sub>us</sub>), pro-brain natriuretic peptide, creatinine clearance, albumin, and thyroid-stimulating hormone serum levels were assayed using biochemical kits. Insulin resistance was estimated using homeostasis model assessment of insulin resistance.<sup>22</sup>

## Standard Echocardiography

Echocardiography was performed using commercially available ultrasound equipment (Vivid E95; GE Healthcare, Milwaukee, WI). All standard echocardiographic and Doppler parameters of LV systolic and diastolic function were measured according to recent guidelines.<sup>23,24</sup> LV volumes and ejection fraction were measured using the Simpson biplane method. LV mass was calculated using the Devereux formula and indexed to height (Cornell adjustment). Left atrial volume was calculated using the biplane method in four- and two-chamber views and indexed to body surface area. Pulsed-wave Doppler LV transmitral velocities (with the sample volume at the mitral leaflet tips), including early (E) and atrial (A) waves, were obtained in the apical four-chamber view. Color-coded DTI measures of myocardial systolic ( $s'$ ), early diastolic ( $e'$ ), and atrial ( $a'$ ) velocities were assessed at the mitral annular level in the apical four- and two-chamber views. The  $E/e'$  ratio, with  $e'$  calculated as the average of the septal and lateral velocities, was used as an index of LV filling pressure.<sup>24</sup>

Epicardial fat was identified as the echo-free space between the outer wall of the myocardium and the visceral layer of the pericardium, and its thickness was measured perpendicularly to the free wall of the right ventricle from both parasternal long- and short-axis views at end-systole.<sup>25</sup>

## Dobutamine Stress Echocardiography

Dobutamine (DB) was infused intravenously in incremental doses of 10, 20, 30, and 40  $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  in 3-min stages. After the 20  $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  stage of the protocol, atropine was added in 0.25-mg increments up to 1.5 mg when appropriate, thus allowing achievement of age-adjusted maximal heart rate (HR). The test was stopped when age-adjusted HR limit was reached, when severe hypertension (systolic BP  $\geq 250$  mm Hg or diastolic BP  $\geq 120$  mm Hg) or symptomatic reduction in systolic BP  $\geq 40$  mm Hg from baseline developed, or when ventricular arrhythmia occurred. At the end of DSE, 5 mg atenolol was administered to lower HR, and if needed, another 5 mg was given a few minutes later. Patients were then placed under ambulatory observation for 1 hour. No severe adverse effects were noticed. Beta-blocker intake was interrupted  $\geq 72$  hours before DSE.

At rest and at each step of the DSE protocol, two-dimensional (2D) cine loops (frame rate  $> 70$  frames/sec) of at least five cycles were recorded in the parasternal long- and short-axis (base, papillary muscles, and apex) views, as well as in the apical four- and two-chamber views for visual inspection of wall motion abnormalities. The 2D strain analysis was performed postprocessing (EchoPAC 201; GE Healthcare), only at rest and at stages corresponding to a target HR between 110 and 120 beats/min, which was in each case obtained for low DB doses (10 or 20  $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  depending on the subject). For each view, the three cardiac cycles displaying the best image quality were selected. LS and CS and strain rates, as well as rotations at the apex and base, were directly obtained from the six-segment model, as previously reported.<sup>14</sup> For each cardiac cycle, if more than two segments were not trackable after adjustment, the cardiac cycle was excluded from analysis. Of 6,464 and 6,121 segments, 6,316 (97.71%) and 5,761 (94.12%) were analyzable at rest and under low-dose DB, respectively. Twist mechanics were computed from apical and basal rotational data using dedicated software (Scilab, Paris, France).<sup>15</sup> The strain imaging diastolic index (SI-DI) was calculated using the formula proposed by Chiang *et al.*<sup>26</sup>:  $\text{SI-DI} = (a - b)/a$ , where  $a$  is strain value at aortic valve closure, and  $b$  is strain value at the third of diastole duration (Figure 2). This index is sensitive to rapid change and elevation of LV filling pressures, reflected by a decreased SI-DI.

Data from the three best cycles were averaged before statistical analysis, and  $\Delta$  values were calculated as the difference between data at low-dose DB and data at rest. BP and HR were continuously monitored, and systolic meridional wall stress ( $\sigma_{\text{ES}}$ ), an index of afterload, was calculated, using the following formula<sup>27</sup>:

$$\sigma_{\text{ES}} = \text{SBP} \times \left\{ \frac{\text{LVDs}}{\text{PWs} \times (1 + \text{PWs}/\text{LVDs})} \right\} \times 0.34,$$

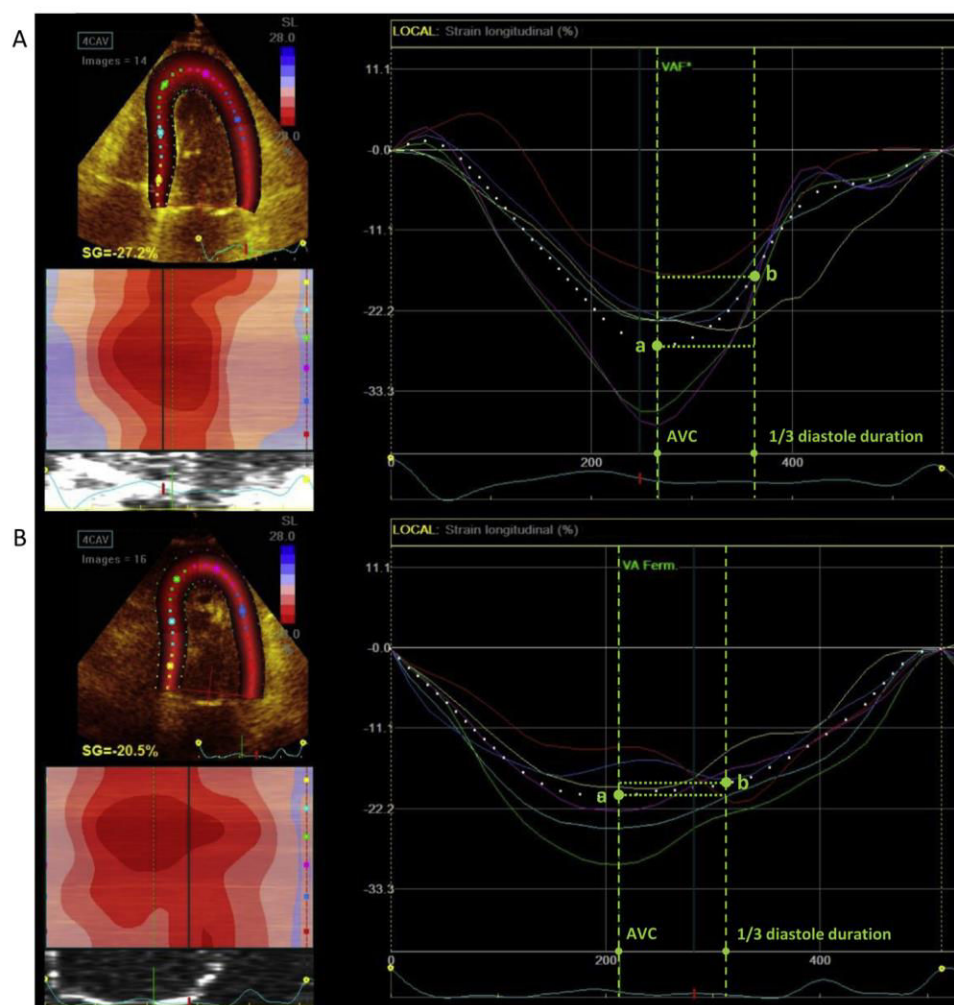
where SBP is systolic BP, LVDs is systolic LV diameter, and PWs is systolic posterior wall thickness.

LV end-diastolic volumes were also obtained as preload index.

We selected 15 subjects at random for the assessment of intra- and interobserver reproducibility of the main speckle-tracking echocardiographic indexes at rest and under low-dose DB. Measurements were made  $\geq 1$  week apart on the same echocardiographic images. Intra- and interobserver reliability was good, with concordance correlation coefficients of 0.93 and 0.83 for linear strain at rest and 0.95 and 0.85 during DSE, 0.98 and 0.97 for rotation at rest and 0.96 and 0.95 during DSE, and 0.91 and 0.82 for twist at rest and 0.90 and 0.88 during DSE. Intra- and interobserver reliability for EAT has been previously reported in our laboratory, with concordance correlation coefficients of 0.90 and 0.92, respectively, indicating good reproducibility of EAT measurements.<sup>18</sup>

## Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using IBM SPSS statistics version 20.0 (IBM, Armonk, NY). Values are expressed as mean  $\pm$  SD unless otherwise specified. Statistical significance was defined as a  $P$  value  $< .05$ . Normality was assessed using the Shapiro-Wilk test, and non-Gaussian biologic variables were log-transformed. Biologic and demographic variables and resting standard echocardiographic data were analyzed using a generalized linear model. The  $\chi^2$  test was used for categorical data. Data obtained from the 2D strain analysis were analyzed using a linear mixed-effect model with random intercept and age, sex, group, and conditions as fixed effects. In case of significant



**Figure 2** Examples of SI-DI in a control subject (**A**) and a patient with T2DM (**B**), under DB stress. AVC, Aortic valve closure.

interaction between group and conditions, a generalized linear model was used for group comparison at rest and low-dose DB, while a *t* test for paired samples assessed DB response within each group. Covariates such as loading indexes, hypertension, medical treatment, CRP<sub>us</sub>, and body mass index (BMI) were included in the different models when appropriate. Intergroup comparison for  $\Delta$  values was assessed using a generalized linear model. Pearson correlations were used to investigate the association between  $\Delta$ LS,  $\Delta$  apical CS,  $\Delta$  mid CS,  $\Delta$  apical rotation,  $\Delta$  basal rotation, and  $\Delta$  twist with clinical, biologic, and echocardiographic parameters. A multiple stepwise linear regression analysis was used to determine the independent predictors of  $\Delta$  values for each speckle-tracking echocardiographic variable, with  $P < .15$  in bivariate testing used as a requirement to enter the model.

## RESULTS

### Baseline Clinical and Echocardiographic Characteristics

The clinical data are presented in [Table 1](#). Populations were matched for sex, but patients with T2DM were slightly older than control subjects. BMI and waist circumference were significantly higher in the diabetic group. Concerning the lipid profile, triglycerides were increased but total cholesterol decreased, on account of reduced

high-density lipoprotein in patients with T2DM compared with control subjects. Fasting glycemia, glycated hemoglobin, insulin, and homeostasis model assessment of insulin resistance were significantly increased in the former. Noteworthy, CRP<sub>us</sub> levels were also substantially increased in the diabetic group.

Results of conventional echocardiography are summarized in [Table 2](#). LV internal dimensions did not differ between the two groups, while end-diastolic wall thickness and relative wall thickness were slightly, but significantly, increased in the patients with T2DM. No intergroup differences were noticed for indexed LV mass. LV ejection fraction was preserved in the diabetic group. The latter presented with reduced E/A ratio as well as larger left atrial volume index and E/e' ratio, indicative of global diastolic dysfunction. Of note, longitudinal systolic velocities by DTI were similar between the two groups, while early diastolic velocities were significantly lower in the patients with T2DM. EAT was markedly increased (+49%) in patients with T2DM compared with control subjects.

### STE at Rest and Under DB Infusion

Speckle-tracking echocardiographic data are presented in [Table 3](#). Systolic LS and LS rate did not differ between control subjects and patients with T2DM at rest, but differences were revealed under

**Table 1** Clinical characteristics

	Control subjects	Patients with T2DM
<b>Demographic characteristics</b>		
Male/female	17/18	26/18
Age (y)	52 ± 7	56 ± 6 <sup>†</sup>
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	24.2 ± 3.6	26.9 ± 3.2 <sup>†</sup>
Waist circumference (m)	0.80 ± 0.15	0.99 ± 0.12 <sup>‡</sup>
<b>Risk factors</b>		
Smoking	12 (34)	17 (39)
Hypertension	6 (17)	18 (41)*
Metabolic syndrome	0 (0)	31 (72) <sup>†</sup>
T2DM duration (y)	—	9.5 ± 6.9
<b>Biological parameters<sup>§</sup></b>		
Total cholesterol (g/L)	2.12 ± 0.43	1.92 ± 0.51 <sup>†</sup>
HDL cholesterol (g/L)	0.55 ± 0.11	0.45 ± 0.08 <sup>‡</sup>
LDL cholesterol (g/L)	1.32 ± 0.38	1.20 ± 0.43
Triglycerides (g/L)	1.14 ± 0.51	1.53 ± 0.70 <sup>†</sup>
Fasting glycemia (g/L)	0.90 ± 0.07	1.35 ± 0.31 <sup>‡</sup>
HbA <sub>1c</sub> (%)	5.4 ± 0.3	7.2 ± 1.1 <sup>‡</sup>
Insulin (mUI/L)	6.3 ± 2.8	14.1 ± 8.8 <sup>‡</sup>
HOMA-IR	1.4 ± 0.7	4.9 ± 3.5 <sup>‡</sup>
CRP <sub>us</sub> (g/L)	1.2 ± 0.7	3.0 ± 3.3 <sup>†</sup>
Pro-BNP (pg/mL)	6.8 ± 2.6	7.7 ± 5.9
Creatinine clearance (μmol/L)	91.5 ± 17.8	93.3 ± 19.4
Albumin (mg/L)	0.25 ± 0.54	1.72 ± 3.41 <sup>†</sup>
TSH (mUI/L)	2.08 ± 3.00	1.78 ± 1.15
<b>Medications</b>		
Antihypertensive drugs	6 (17)	15 (35)
Antidiabetic drugs	—	43 (100) <sup>‡</sup>
Antidyslipidemic drugs	5 (14)	13 (30)

HbA<sub>1c</sub>, Glycated hemoglobin; HDL, high-density lipoprotein; HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance; LDL, low-density lipoprotein; pro-BNP, pro-brain natriuretic peptide; TSH, thyroid-stimulating hormone.

Data are expressed as number (percentage) or as mean ± SD.

\**P* < .05, <sup>†</sup>*P* < .01, and <sup>‡</sup>*P* < .001 versus control subjects.

<sup>§</sup>Data were log-transformed before statistical analysis.

low-dose DB. Although LS increased in both populations in response to DB, improvements were significantly weaker in the diabetic group (Figure 3). Early diastolic LS rate and longitudinal SI-DI were reduced in the patients with T2DM regardless of conditions and were similarly affected by DB in both groups. CS as well as systolic and early diastolic CS rates at the apex were similar between control subjects and patients with T2DM at rest, but as for STE-derived parameters of longitudinal function, differences were noticed under DB stress conditions. Similar results were obtained at the papillary muscle level, except that systolic CS rate was significantly reduced at rest in the patients with T2DM. At the base, however, only slight differences in STE-derived indexes were noticed between the two groups, both at rest and under DB. Longitudinal as well as apical and mid circumferential SI-DI were significantly reduced in both control subjects and patients with T2DM, under DB infusion, whereas no change was noticed at the

**Table 2** Echocardiographic characteristics

	Control subjects	Patients with T2DM
<b>2D</b>		
LAV/BSA (mL/m <sup>2</sup> )	22.7 ± 7.4	26.7 ± 8.6*
LVEDV/BSA (mL/m <sup>2</sup> )	40.7 ± 3.7	39.2 ± 5.5
LVESV/BSA (mL/m <sup>2</sup> )	14.3 ± 3.6	13.3 ± 4.1
IVSd (mm)	8.0 ± 1.7	9.0 ± 1.5*
PWd (mm)	7.7 ± 1.3	8.9 ± 1.8 <sup>†</sup>
RWT	0.25 ± 0.04	0.28 ± 0.07*
LV mass/height (g/m <sup>2.7</sup> )	32.0 ± 10.0	35.7 ± 9.0
LVEF, Simpson method (%)	63.7 ± 7.9	64.3 ± 7.2
EAT (mm)	3.3 ± 1.1	6.4 ± 1.7 <sup>‡</sup>
<b>Pulsed-wave Doppler</b>		
E (cm/sec)	77.5 ± 16.4	78.5 ± 13.4
A (cm/sec)	75.5 ± 17.6	84.0 ± 15.6*
E/A ratio	1.08 ± 0.36	0.95 ± 0.20*
IVRT (msec)	80.3 ± 15.6	77.0 ± 19.4
<b>DTI parameters</b>		
s' (cm/sec)	9.0 ± 1.9	8.6 ± 2.0
e' (cm/sec)	9.9 ± 2.3	8.6 ± 1.7 <sup>†</sup>
a' (cm/sec)	10.3 ± 1.9	10.7 ± 2.2
E/e' ratio	8.0 ± 1.9	9.7 ± 2.3 <sup>†</sup>

BSA, Body surface area; IVRT, isovolumetric relaxation time; IVSd, end-diastolic interventricular septal thickness; LAV, left atrial volume; LVEDV, LV end-systolic volume; LVEF, LV ejection fraction; LVESV, LV end-systolic volume; PWd, end-diastolic posterior wall thickness; RWT, relative wall thickness.

Data are expressed as mean ± SD.

\**P* < .05, <sup>†</sup>*P* < .01, and <sup>‡</sup>*P* < .001 versus control subjects.

base. Intergroup differences were obtained at rest and during low-dose DB for longitudinal and apical-circumferential SI-DI, while no differences were shown for basal and mid circumferential SI-DI. Similar values of apical and basal rotations as well as twist and twist/untwist rates were obtained at rest between the two groups, but significant differences were revealed under DB infusion. The speckle-tracking echocardiographic indexes significantly increased in both groups in response to DB infusion, except apical rotation, which did not change in the diabetic population. The magnitude of the response to DB was, however, in each case significantly reduced for the latter (Figure 3). The intergroup differences under DB stress previously mentioned for LS, CS at the papillary muscle level, and torsional mechanics were still evident after accounting for, in addition to age and sex, other potential confounding factors, such as hypertension and BMI. Differences disappeared for apical CS and rotation when BMI and hypertension were introduced as covariates, respectively. All speckle-tracking echocardiographic variables were, however, not influenced by medical treatment. Furthermore, hemodynamic and loading conditions did not differ between the control subjects and patients with T2DM, whatever the conditions.

Results of the univariate and multivariate regression analysis are depicted in Table 4. For most of the speckle-tracking echocardiographic indexes, good correlations were obtained with metabolic markers of T2DM, insulin resistance, obesity, high-density lipoprotein, CRP<sub>us</sub>, and EAT. Stepwise multiple linear regression analysis revealed EAT,

**Table 3** Hemodynamic and speckle-tracking echocardiographic data

	Rest		DB		P
	Control subjects	Patients with T2DM	Control subjects	Patients with T2DM	
<b>Longitudinal function</b>					
LS (%)	-20.8 ± 2.3	-20.2 ± 2.7	-24.2 ± 2.5 <sup>¶</sup>	-21.2 ± 2.4 <sup>‡,¶</sup>	.004
LSRs (sec <sup>-1</sup> )	-1.18 ± 0.27	-1.17 ± 0.29	-2.20 ± 0.37 <sup>¶</sup>	-1.99 ± 0.34 <sup>‡,¶</sup>	.040
LSRed (sec <sup>-1</sup> )	1.41 ± 0.43	1.29 ± 0.33 <sup>‡</sup>	1.87 ± 0.53 <sup>¶</sup>	1.51 ± 0.40 <sup>‡,¶</sup>	.09
Longitudinal SI-DI (%)	42.6 ± 17.2	35.9 ± 13.6 <sup>†</sup>	23.3 ± 12.3 <sup>¶</sup>	17.3 ± 10.2 <sup>†,¶</sup>	.87
<b>Circumferential function</b>					
Apical CS (%)	-26.8 ± 3.3	-28.3 ± 5.5	-36.3 ± 5.3 <sup>¶</sup>	-32.3 ± 5.3 <sup>†,¶</sup>	.001
Apical CSRs (sec <sup>-1</sup> )	-1.64 ± 0.51	-1.71 ± 0.48	-3.75 ± 0.97 <sup>¶</sup>	-3.34 ± 0.84 <sup>†,¶</sup>	.040
Apical CSRRed (sec <sup>-1</sup> )	2.16 ± 0.68	2.28 ± 0.62	3.16 ± 0.99 <sup>¶</sup>	2.53 ± 0.79 <sup>†,§</sup>	.013
Apical SI-DI (%)	50.5 ± 18.0	40.7 ± 17.5 <sup>‡</sup>	29.6 ± 16.1 <sup>¶</sup>	20.2 ± 10.0 <sup>‡,¶</sup>	.72
Mid CS (%)	-21.4 ± 2.9	-21.6 ± 3.2	-28.0 ± 3.6 <sup>¶</sup>	-25.6 ± 3.2 <sup>†,¶</sup>	.01
Mid CSRs (sec <sup>-1</sup> )	-1.45 ± 0.35	-1.33 ± 0.30 <sup>†</sup>	-2.74 ± 0.63 <sup>¶</sup>	-2.48 ± 0.56 <sup>†,¶</sup>	.46
Mid CSRRed (sec <sup>-1</sup> )	1.79 ± 0.50	1.56 ± 0.37	2.52 ± 0.69 <sup>¶</sup>	1.93 ± 0.48 <sup>‡,¶</sup>	.03
Mid SI-DI (%)	42.4 ± 21.3	37.3 ± 17.5	33.6 ± 15.1 <sup>  </sup>	29.2 ± 13.2 <sup>  </sup>	.84
Basal CS (%)	-21.6 ± 2.7	-20.3 ± 2.7*	-25.3 ± 3.8 <sup>¶</sup>	-23.2 ± 3.6 <sup>†,¶</sup>	.51
Basal CSRs (sec <sup>-1</sup> )	-1.33 ± 0.33	-1.32 ± 0.26	-2.50 ± 0.54 <sup>¶</sup>	-2.37 ± 0.65 <sup>¶</sup>	.51
Basal CSRRed (sec <sup>-1</sup> )	1.78 ± 0.47	1.59 ± 0.47	2.33 ± 0.80 <sup>¶</sup>	2.10 ± 0.76 <sup>¶</sup>	.91
Basal SI-DI (%)	28.1 ± 21.1	26.0 ± 19.7	30.2 ± 15.5	25.9 ± 23.1	.81
<b>Rotation and twist mechanics</b>					
Apical rotation (°)	9.8 ± 4.8	10.8 ± 5.1	14.1 ± 6.3 <sup>¶</sup>	11.2 ± 4.4*	.019
Basal rotation (°)	-7.5 ± 2.4	-7.4 ± 2.8	-14.3 ± 3.9 <sup>¶</sup>	-12.2 ± 3.3 <sup>†,¶</sup>	.042
Twist (1°)	16.0 ± 6.1	17.2 ± 6.9	26.8 ± 8.3 <sup>¶</sup>	21.9 ± 5.9 <sup>†,¶</sup>	.009
Twist rate (°/sec)	99 ± 40	101 ± 42	235 ± 72 <sup>¶</sup>	194 ± 47 <sup>†,¶</sup>	.016
Early untwist rate (°/sec)	-104 ± 48	-102 ± 45	-240 ± 93 <sup>¶</sup>	-193 ± 60 <sup>†,§</sup>	.040
<b>Hemodynamics</b>					
HR (beats/min)	73 ± 8	76 ± 10	112 ± 7 <sup>¶</sup>	110 ± 5 <sup>¶</sup>	.19
SBP (mm Hg)	123 ± 12	126 ± 11	137 ± 11 <sup>¶</sup>	142 ± 16 <sup>¶</sup>	.68
DBP (mm Hg)	69 ± 10	72 ± 11	71 ± 10	72 ± 11	.59
σ <sub>ES</sub> (g/cm <sup>2</sup> )	77.5 ± 24.8	75.8 ± 26.1	51.2 ± 26.2 <sup>¶</sup>	43.3 ± 13.5 <sup>¶</sup>	.39
ED volume (mL)	70.9 ± 14.7	70.6 ± 18.7	67.1 ± 17.9	68.4 ± 15.2	.77

CSRRed, Early diastolic CS rate; CSRs, systolic CS rate; DBP, diastolic BP; ED, end-diastolic; LSRed, early diastolic LS rate; LSRs, systolic LS rate; SBP, systolic BP.

\*P < .05, †P < .01, and ‡P < .001 versus control subjects; §P < .05, ||P < .01, and ¶P < .001 versus rest.

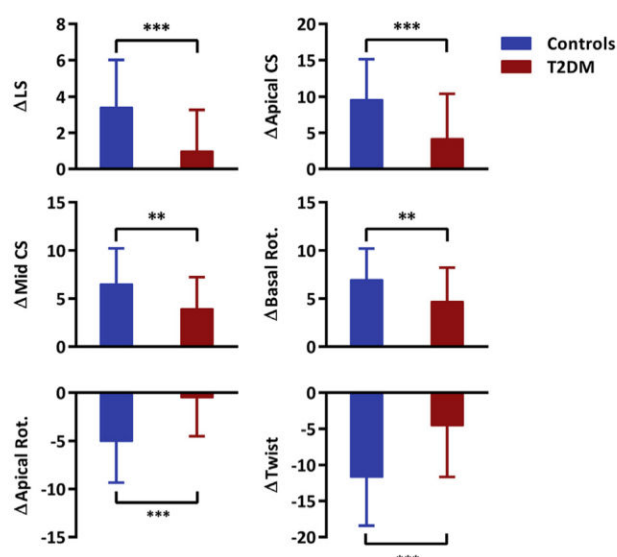
fasting glycemia, and obesity markers as major independent predictors of changes in speckle-tracking echocardiographic values in response to DB infusion.

## DISCUSSION

The present study is to our knowledge the first to comprehensively assess regional myocardial function under DB stress in asymptomatic patients with uncomplicated T2DM. The major finding was that low-dose DB unmasked linear deformations and twist mechanics abnormalities that were otherwise undetectable at rest. This study also revealed a loss of myocardial functional reserve in response to β-adrenergic challenge.

In the absence of CAD or hypertension, patients with T2DM usually present with alterations of global diastolic function but preserved global systolic function.<sup>3,5,7,9</sup> More recently, deformation imaging studies,

mostly conducted at rest and almost exclusively assessing longitudinal function, highlighted the presence of subtle early regional myocardial systolic dysfunction, although no consensus has been reached<sup>3-7,9</sup> that is consistent with our own resting LS and systolic LS rate data. Myocardial mechanics result from a complex interplay of multidirectional deformations and, accordingly, cannot be reduced to solely LS. Therefore, circumferential function as well as rotation and torsion mechanics must be considered for a comprehensive assessment of regional myocardial function, but very few studies are available in patients with T2DM, and their conclusions remain conflicting.<sup>3-5,9</sup> Discrepancies might be explained, at least in part, by factors involving patient selection, namely, age, T2DM duration, and control and presence of extracardiac complications. Indeed, several studies have linked poor glycemic control to an exacerbated cardiac dysfunction.<sup>4,28,29</sup> Of note, previous research in patients with T2DM free of CAD and T2DM-associated complications and with fairly



**Figure 3** Delta values from rest to DB. Rot., Rotation. \*\* $P < .01$  and \*\*\* $P < .001$  versus control group.

good glycemic control reported results similar to those obtained at rest in the present study.<sup>6,7,12</sup>

Resting deformation imaging might not be sensitive enough to detect subtle early regional systolic dysfunction at rest, and DSE could be helpful in revealing subclinical abnormalities, especially in asymptomatic patients with uncomplicated T2DM. DSE is widely used for the diagnosis of CAD because it enables the detection of wall motion abnormalities imperceptible at rest.<sup>10</sup> To our knowledge, data concerning LV regional myocardial function during DSE in patients with T2DM are available only for longitudinal deformations and are still limited to very few studies.<sup>6,11,12</sup> Among them, only one used STE,<sup>6</sup> while the other two used DTI-derived strain measured at the mitral annular level.<sup>11,12</sup> In line with our results, DTI-based studies demonstrated that DB, at both low and high doses, could unmask abnormalities of basal LS and systolic LS rate.<sup>11,12</sup> In contrast, Wierzbowska-Drabik *et al.*,<sup>6</sup> using STE, did not report any differences in global LV LS at high doses of DB between patients with T2DM and control subjects. Previous reports have clearly indicated that LV strain is highly sensitive to acute changes in loading conditions, which in the context of DB infusion is of particular importance.<sup>30</sup> A major weakness of the aforementioned studies is that they did not account for DB-induced changes in loading conditions, limiting the interpretation of their linear deformation imaging indexes. Part of the discrepancies between our data and those of Wierzbowska-Drabik *et al.* might very likely originate from the use of high DB doses in the previous study. In our study, even low-dose DB significantly impaired cardiac afterload, but patients with T2DM and control subjects were similarly affected. Furthermore, similar results were obtained when meridional wall stress was used as a covariate. In addition to confirming previous data regarding longitudinal function, the present study is the first to demonstrate that functional alterations under DB stress are multidirectional and affect all components of myocardial mechanics. In our patients, adaptive changes to low-dose DB in apical and mid CS, as well as systolic and early diastolic SR, were blunted. Such a response was also observed for rotation, systolic twist, and systolic and diastolic untwist rates, underpinning a loss of both systolic and diastolic functional reserve of the various myocardial wall layers.

This loss was particularly important for apical rotation, which was not enhanced as a result of the  $\beta$ -adrenergic stimulus. This result is of primary importance, because rotation and torsion mechanics are pivotal components of cardiac adaptation to increased workload. Of note, systolic torsion, due mainly to apical rotation, is a determining factor in effective early diastolic filling, by conditioning efficient LV uncoil, resulting in an apex-to-base pressure gradient and subsequent efficient suction.<sup>16,17</sup> This phenomenon is particularly critical at elevated HRs, when diastolic filling time is truncated,<sup>16,17</sup> and also at HRs corresponding to low DB doses, as demonstrated at 112 beats/min by Notomi *et al.*<sup>17</sup> The loss of adaptive responses to a moderate  $\beta$ -adrenergic challenge established here may therefore enable better understanding of the central origin of exercise intolerance frequently reported in T2DM.

### Underlying Mechanisms

After controlling for loading conditions, the depressed deformation imaging indexes under DB stress in our patients with T2DM strongly speak in favor of alterations in myocardial intrinsic contraction and relaxation properties.<sup>30</sup> Even if we cannot clearly establish the mechanisms underlying these alterations, univariate and multivariate correlation analyses allowed us to identify different contributors. Delta values of most speckle-tracking echocardiographic indexes correlated with markers of visceral adiposity, low-grade inflammation, insulin resistance, and chronic hyperglycemia, the independent predictors being visceral adiposity, dyslipidemia, and elevated fasting glycemia. The picture that emerges fits well with the commonly described processes of DMCM pathogenesis. Chronic hyperglycemia, hyperinsulinemia, and hyperlipidemia result in a large array of systemic and intracellular disturbances, such as alteration in substrate metabolism, insulin resistance, lipotoxicity, reactive oxygen species production, endoplasmic reticulum stress, calcium homeostasis impairment, and inflammation.<sup>2,31-33</sup> These disturbances occur early after the onset of T2DM and lead, among others, to transcriptional and posttranslational changes in the cytoskeletal and sarcomeric proteins, collectively resulting in early alteration of cardiomyocyte contractile and relaxation properties.<sup>2</sup> The alteration of the contractile apparatus and its constitutive proteins, such as titin, may also be one possible explanation to both systolic and diastolic dysfunctions, because the release of the energy stored by titin during contraction is a key mechanism allowing an effective uncoil of the LV.<sup>16,17</sup>

In the absence of epicardial CAD, the loss of functional reserve under DB in our patients with T2DM could also be the expression of microvascular dysfunction. Microvascular alterations are a hallmark of T2DM complications and have been shown to occur before macrovascular dysfunction in the diabetic heart.<sup>34</sup> Furthermore, coronary flow reserve, which reflects microvascular dysfunction, has been shown to be associated with LV function in patients with T2DM.<sup>35</sup> On the other hand, this defective microcirculation can lead to myocardial hypoxia in conditions of increased oxygen demand<sup>36</sup> and could thus affect myocardial performance during stress, explaining the loss of functional reserve observed in our patients.

Besides metabolic disturbances, epicardial fat appears as an additional contributor to the blunted DB response of most of the deformation imaging indexes, affecting more specifically longitudinal function and apical mechanics. Consistent with our results, increased EAT has already been reported in previous studies in patients with T2DM.<sup>37</sup> In direct contact with the underlying myocardial wall, EAT plays, in physiologic conditions, an important cardioprotective role, secreting anti-inflammatory cytokines and storing free fatty acids.<sup>38</sup> However, in a



**Table 4** Univariate and multivariate correlation analysis of changes in speckle-tracking echocardiographic indexes with clinical, biologic, and echocardiographic indexes

	Univariate															Multivariate																		
	ΔLS					Δ Apical CS					Δ Mid CS					Δ Apical rotation					Δ Basal rotation					Δ Twist								
	r	P	r	P	r	P	r	P	r	P	r	P	r	P	r	P	r	P	r	P	r	P	r	P	r	P	r	P	r	P	r	P	r	P
	β	β	β	β	β	β	β	β	β	β	β	β	β	β	β	β	β	β	β	β	β	β	β	β	β	β	β	β	β	β	β	β	β	β
Gender	-0.14	.21	-0.13	.26	0.26	.03	0.41	<.0001	-0.04	.74	0.27	.05	-0.04	.74	0.27	.05	0.34	.005	0.41	<.001	0.34	.005	0.41	<.001	0.15	.25	-0.06	.63	0.14	.26	0.27	.002		
Age	0.12	.28	0.2	.08	0.35	.004	-0.13	.25	0.08	.54	-0.18	.19	0.08	.48	0.08	.48	0.21	.008																
Hypertension	0.05	.63	-0.005	.96	0.19	.11	-0.12	.32	0.24	.07	-0.19	.14	0.08	.50	0.08	.50	0.08	.47	-0.14	.22	0.24	.07	-0.28	.03	0.15	.25	-0.06	.63	0.14	.26	0.27	.002		
Smoking	-0.04	.67	-0.14	.24	0.03	.75	-0.03	.77	0.23	.08	-0.07	.58	0.23	.08	-0.07	.58	-0.02	.47																
BMI	-0.21	.06	0.22	.06	0.27	.02	-0.31	.008	0.32	.01	-0.33	.01	0.12	.39	0.08	.50	0.08	.47	-0.14	.22	0.24	.07	-0.28	.03	0.15	.25	-0.06	.63	0.14	.26	0.27	.002		
WC	0.39	<.0001	0.25	.03	0.34	.005	-0.38	.001	0.27	.02	-0.31	.02	0.24	.04	0.05	.69	0.13	.34	-0.18	.12	0.12	.40	0.03	.88	0.15	.25	-0.06	.63	0.14	.26	0.27	.002		
HDL	-0.30	.008	0.08	.51	-0.28	.022	0.26	.03	-0.43	.001	0.29	.03	-0.12	.29			-0.28	.03	-0.04	.73	-0.43	.001	-0.03	.84	0.15	.25	-0.06	.63	0.14	.26	0.27	.002		
TG	0.20	.08	0.07	.54	0.18	.13	-0.19	.11	0.26	.045	0.20	.14	0.05	.63			-0.04	.75	-0.03	.78	0.16	.22	-0.01	.91	0.15	.25	-0.06	.63	0.14	.26	0.27	.002		
CRPus	0.24	.03	0.27	.02	0.24	.04	-0.28	.01	0.19	.14	-0.21	.12	0.07	.49	0.12	.31	-0.03	.83	-0.23	.03	0.08	.55	-0.09	.48	0.15	.25	-0.06	.63	0.14	.26	0.27	.002		
HbA <sub>1c</sub>	0.32	.005	0.32	.006	0.26	.03	-0.32	.007	0.13	.33	-0.24	.08	0.04	.72	0.12	.50	-0.36	.06	-0.04	.75	0.12	.40	0.03	.88	0.15	.25	-0.06	.63	0.14	.26	0.27	.002		
Glycemia	0.36	.001	0.43	<.001	0.41	.001	-0.38	.001	0.30	.02	-0.33	.01	0.14	.28	0.47	<.001	0.24	.04	-0.15	.24	0.22	.10	-0.32	.01	0.15	.25	-0.06	.63	0.14	.26	0.27	.002		
HOMA-IR	0.27	.017	0.37	.02	0.27	.02	-0.33	.006	0.20	.13	-0.33	.01	-0.02	.88	0.08	.61	-0.009	.96	-0.06	.62	-0.02	.86	0.02	.89	0.15	.25	-0.06	.63	0.14	.26	0.27	.002		
T2DM duration	0.17	.14	0.26	.02	0.08	.49	-0.24	.04	-0.002	.98	-0.13	.36	-0.18	.14	0.011	.93			-0.08	.50					0.15	.25	-0.06	.63	0.14	.26	0.27	.002		
SI-DI	0.28	.013	-0.19	.12	-0.13	.28	0.12	.33	0.15	.26	-	-	-0.12	.26	-0.04	.72									0.15	.25	-0.06	.63	0.14	.26	0.27	.002		
LVM	0.13	.24	0.12	.32	-0.03	.75	-0.23	.045	0.31	.02	0.18	.20					0.05	.64	0.19	.16					0.15	.25	-0.06	.63	0.14	.26	0.27	.002		
EAT	0.45	<.0001	0.25	.03	0.13	.29	-0.38	.001	0.20	.13	-0.28	.04	0.36	.002	0.005	.97			-0.28	.009	0.06	.67	-0.11	.45	0.15	.25	-0.06	.63	0.14	.26	0.27	.002		
r <sup>2</sup>													0.27	<.001	0.22	<.001	0.26	<.001	0.35	<.001	0.18	<.001	0.34	<.001	0.15	.25	-0.06	.63	0.14	.26	0.27	.002		

HbA<sub>1c</sub>, Glycated hemoglobin; HDL, high-density lipoprotein; HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance; LVM, LV mass; TG, triglyceride; WC, waist circumference.

pathologic context, EAT shifts to a proinflammatory secretory profile, which may exert deleterious effects on the underlying coronary vascular wall and cardiomyocytes.<sup>38</sup> Recent studies have demonstrated that EAT biopsies from patients with T2DM present an altered secretory profile and can induce contractile dysfunction in incubated rat cardiomyocytes by altering mitochondrial  $\beta$ -oxidation.<sup>39,40</sup> This fat depot has also been found to be associated with both CAD and microvascular alterations.<sup>41,42</sup> Thickened EAT may thus be in part responsible for the myocardial alterations observed in our T2DM population by creating a deleterious environment affecting coronary endothelium and cardiomyocyte function. To our knowledge, our study is the first to report such a link between EAT and speckle-tracking echocardiographic parameters during DB stress in patients with T2DM. Nevertheless, a previous study in patients with metabolic syndrome found that EAT was an independent predictor of LS, and another study, using three-dimensional STE, correlated EAT, assessed by magnetic resonance imaging, with systolic dysfunction in patients with low-risk chest pain.<sup>18,43</sup>

### Clinical Implications

From a clinical point of view, an early diagnosis of DMCM is of paramount importance, especially because the pathogenesis of this cardiopathy is thought to begin shortly after the onset of T2DM. It allows therapeutic intervention before the appearance of clinical signs of cardiac dysfunction, at a time when therapies can still potentially impede the progression of structural and more permanent degradations and prevent development toward heart failure. Factors affecting the development and progression of DMCM are, however, multiple and complex.<sup>44</sup> Not all patients with T2DM are affected by the same factors and to the same degree, resulting in marked variability in the clinical manifestation of this cardiopathy. In this context, if patients with T2DM usually present with diastolic dysfunction but preserved systolic function, not all of them manifest LV diastolic dysfunction,<sup>45</sup> especially asymptomatic subjects with good glycemic control and no extracardiac complications. Furthermore, even if not a single parameter but the combination of pulsed-wave Doppler and DTI indexes, together with left atrial remodeling,<sup>24</sup> is used to define diastolic dysfunction, the load dependency of some of these indexes limits the interpretation in terms of myocardial dysfunction. More sensitive methods are therefore needed to diagnose DMCM, especially when only subtle abnormalities are expected, as in the earliest stages of the disease. Our results then provide evidence of the utility of DSE in revealing myocardial abnormalities otherwise absent at rest in asymptomatic patients with T2DM with good glycemic control and no target organ damage. They highlight the need in such a population for a cardiac screening and regular follow-up.

Of note, the cardiac event rate has been reported to be similar in patients with T2DM with no CAD and in those without T2DM but with CAD.<sup>46</sup> In line with our data, in high-risk patients with T2DM free of CAD, Cortigiani *et al.*<sup>47</sup> recently demonstrated the usefulness of dual stress echocardiography, combining conventional wall motion analysis and Doppler-derived coronary flow velocity reserve during dipyridamole stress, in predicting future cardiac events.

### Study Limitations

Besides the usual limitations inherent to 2D STE, our study presents some additional shortcomings. First, the analysis under DB was performed at low doses and submaximal HR. This choice was made

with a view to compromise between time resolution and image quality for speckle-tracking echocardiographic analysis, as well as to avoid a negative impact of DB on loading conditions. However, it would be relevant to further investigate and confirm our results at higher HRs, achieved through a better physiologic stress such as physical exercise.

Second, the good feasibility of STE under DB stress in this study, in both apical and short-axis views, owes to the fact that only individuals with good echogenicity were included and that analyses were performed at low HRs. Although some previous studies reported the feasibility of STE at peak DB stress,<sup>48,49</sup> patients with less good acoustic windows were excluded beforehand. Indeed, considering the current technology offered by manufacturers, (1) the lack of temporal resolution and (2) the need for good spatial resolution and image quality for satisfactory speckle-tracking are limiting points at elevated HRs.

Finally, echocardiographic EAT thickness measurement is not a gold standard, because it does not take into account the three-dimensional shape and volume of this tissue, in contrast to magnetic resonance imaging. However, this approach is more easily implementable and affordable, and Iacobellis *et al.*<sup>25</sup> found a good correlation with magnetic resonance imaging. Moreover, the reproducibility of EAT measurements is good in our laboratory.<sup>18</sup>

### CONCLUSIONS

Collectively, our results clearly demonstrate the usefulness of DSE in detecting alterations of all components of myocardial mechanics that can remain barely detectable at rest in asymptomatic patients with uncomplicated T2DM. This should be kept in mind when setting up a preventive cardiac checkup for this kind of patient.

### ACKNOWLEDGMENTS

We warmly thank Jordan Loader for language editing.

### REFERENCES

1. Chen L, Magliano DJ, Zimmet PZ. The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus—present and future perspectives. *Nat Rev Endocrinol* 2012;8:228-36.
2. Waddingham MT, Edgley AJ, Tsuchimochi H, Kelly DJ, Shirai M, Pearson JT. Contractile apparatus dysfunction early in the pathophysiology of diabetic cardiomyopathy. *World J Diabetes* 2015;6:943-60.
3. Ng ACT, Delgado V, Bertini M, van der Meer RW, Rijzewijk LJ, Shanks 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.
4. Zhang X, Wei X, Liang Y, Liu M, Li C, Tang H. Differential changes of left ventricular myocardial deformation in diabetic patients with controlled and uncontrolled blood glucose: a three-dimensional speckle-tracking echocardiography-based study. *J Am Soc Echocardiogr* 2013;26:499-506.
5. Tadic M, Ilic S, Cuspidi C, Stojcevski B, Ivanovic B, Bukarica L, et al. Left ventricular mechanics in untreated normotensive patients with type 2 diabetes mellitus: a two- and three-dimensional speckle tracking study. *Echocardiography* 2015;32:947-55.
6. Wierzbowska-Drabik K, Hamala P, Kasprzak JD. Delayed longitudinal myocardial function recovery after dobutamine challenge as a novel

- presentation of myocardial dysfunction in type 2 diabetic patients without angiographic coronary artery disease. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging* 2015;16:676-83.
7. Cagnet T, Vervueren P-L, Derclé L, Bastié D, Richaud R, Berry M, et al. New concept of myocardial longitudinal strain reserve assessed by a dipyridamole infusion using 2D-strain echocardiography: the impact of diabetes and age, and the prognostic value. *Cardiovasc Diabetol* 2013;12:84.
  8. Mor-Avi V, Lang RM, Badano LP, Belohlavek M, Cardim NM, Derumeaux G, et al. Current and evolving echocardiographic techniques for the quantitative evaluation of cardiac mechanics: ASE/EAE consensus statement on methodology and indications: endorsed by the Japanese Society of Echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr* 2011;24:277-313.
  9. Karagöz A, Bezgin T, Kutlutürk I, Külahçioğlu S, Tanboğa IH, Güler A, et al. Subclinical left ventricular systolic dysfunction in diabetic patients and its association with retinopathy. *Herz* 2014;40:240-6.
  10. Innocenti F, Bartalucci F, Boni V, Vicidomini S, Mannucci E, Monami M, et al. Coronary artery disease screening in type II diabetic patients: prognostic value of rest and stress echocardiography. *Diabetes Metab Syndr Clin Res Rev* 2014;8:18-23.
  11. Govind S, Saha S, Brodin L-A, Ramesh SS, Arvind SR, Quintana M. Impaired myocardial functional reserve in hypertension and diabetes mellitus without coronary artery disease: Searching for the possible link with congestive heart failure in the Myocardial Doppler in Diabetes (MYDID) study II. *Am J Hypertens* 2006;19:851-7.
  12. Galderisi M, de Simone G, Innelly P, Turco A, Turco S, Capaldo B, et al. Impaired inotropic response in type 2 diabetes mellitus: a strain rate imaging study. *Am J Hypertens* 2007;20:548-55.
  13. Dandel M, Lehmkuhl H, Knosalla C, Suramelashvili N, Hetzer R. Strain and strain rate imaging by echocardiography—basic concepts and clinical applicability. *Curr Cardiol Rev* 2009;5:133-48.
  14. Edvardsen T, Helle-Valle T, Smiseth OA. Systolic dysfunction in heart failure with normal ejection fraction: speckle-tracking echocardiography. *Prog Cardiovasc Dis* 2006;49:207-14.
  15. Doucende G, Schuster I, Rupp T, Startun A, Dauzat M, Obert P, et al. Kinetics of left ventricular strains and torsion during incremental exercise in healthy subjects. *Circ Cardiovasc Imaging* 2010;3:586-94.
  16. Esch BT, Warburton DER. Left ventricular torsion and recoil: implications for exercise performance and cardiovascular disease. *J Appl Physiol* 2009;106:362-9.
  17. Notomi Y, Martin-Miklovic MG, Oryszak SJ, Shiota T, Deserranno D, Popovic ZB, et al. Enhanced ventricular untwisting during exercise. *Circulation* 2006;113:2524-33.
  18. Serrano-Ferrer J, Crendal E, Walther G, Vinet A, Dutheil F, Naughton G, et al. Effects of lifestyle intervention on left ventricular regional myocardial function in metabolic syndrome patients from the RESOLVE randomized trial. *Metabolism* 2016;65:1350-60.
  19. Park HE, Choi S-Y, Kim M. Association of epicardial fat with left ventricular diastolic function in subjects with metabolic syndrome: assessment using 2-dimensional echocardiography. *BMC Cardiovasc Disord* 2014;14:3.
  20. Iacobellis G, Bianco AC. Epicardial adipose tissue: emerging physiological, pathophysiological and clinical features. *Trends Endocrinol Metab* 2011;22:450-7.
  21. 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* 2010;14:2223-34.
  22. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985;28:412-9.
  23. Lang RM, Badano LP, Mor-Avi V, Filalo J, Armstrong A, Ernande L, 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.e14.
  24. Nagueh SF, Smiseth OA, Appleton CP, Byrd BF, Dokainish H, Edvardsen T, et al. 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.
  25. Iacobellis G, Ribaudo MC, Assael F, Vecchi E, Tiberti C, Zappaterreno A, et al. Echocardiographic epicardial adipose tissue is related to anthropometric and clinical parameters of metabolic syndrome: a new indicator of cardiovascular risk. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:5163-8.
  26. Chiang S-J, Daimon M, Ishii K, Kawata T, Miyazaki S, Hirose K, et al. Assessment of elevation of and rapid change in left ventricular filling pressure using a novel global strain imaging diastolic index. *Circ J* 2014;78:419-27.
  27. Jamal F, Strotmann J, Weidemann F, Kukulski T, D'hooge J, Bijmens B, et al. Noninvasive quantification of the contractile reserve of stunned myocardium by ultrasonic strain rate and strain. *Circulation* 2001;104:1059-65.
  28. Cassidy S, Hallsworth K, Thoma C, MacGowan GA, Hollingsworth KG, Day CP, et al. Cardiac structure and function are altered in type 2 diabetes and non-alcoholic fatty liver disease and associate with glycemic control. *Cardiovasc Diabetol* 2015;14:23.
  29. Leung M, Wong VW, Hudson M, Leung DY. Impact of improved glycemic control on cardiac function in type 2 diabetes mellitus. *Circ Cardiovasc Imaging* 2016;9:e003643.
  30. Murai D, Yamada S, Hayashi T, Okada K, Nishino H, Nakabachi M, et al. Relationships of left ventricular strain and strain rate to wall stress and their afterload dependency. *Heart Vessels* 2016;32:574-83.
  31. Battiprolu PK, Gillette TG, Wang ZV, Lavandero S, Hill JA. Diabetic Cardiomyopathy: mechanisms and therapeutic targets. *Drug Discov Today Dis Mech* 2010;7:e135-43.
  32. Jia G, DeMarco VG, Sowers JR. Insulin resistance and hyperinsulinaemia in diabetic cardiomyopathy. *Nat Rev Endocrinol* 2016;12:144-53.
  33. Varga ZV, Giricz Z, Liaudet L, Haskó G, Ferdinándy P, Pacher P. Interplay of oxidative, nitrosative/nitrative stress, inflammation, cell death and autophagy in diabetic cardiomyopathy. *Biochim Biophys Acta* 2015;1852:232-42.
  34. Cortigiani L, Rigo F, Gherardi S, Galderisi M, Bovenzi F, Sicari R. Prognostic meaning of coronary microvascular disease in type 2 diabetes mellitus: a transthoracic Doppler echocardiographic study. *J Am Soc Echocardiogr* 2014;27:742-8.
  35. Yonaha O, Matsubara T, Naruse K, Ishii H, Murohara T, Nakamura J, et al. Effects of reduced coronary flow reserve on left ventricular function in type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2008;82:98-103.
  36. Nahser PJ, Brown RE, Oskarsson H, Winniford MD, Rossen JD. Maximal coronary flow reserve and metabolic coronary vasodilation in patients with diabetes mellitus. *Circulation* 1995;91:635-40.
  37. Wang C-P, Hsu H-L, Hung W-C, Yu T-H, Chen Y-H, Chiu C-A, et al. Increased epicardial adipose tissue (EAT) volume in type 2 diabetes mellitus and association with metabolic syndrome and severity of coronary atherosclerosis. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2009;70:876-82.
  38. Matloch Z, Kotulák T, Haluzík M. The role of epicardial adipose tissue in heart disease. *Physiol Res* 2016;65:23-32.
  39. 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* 2012;126:2324-34.
  40. Blumensatt M, Fahlbusch P, Hilgers R, Bekaert M, Herzfeld de Wiza D, Akhyari P, et al. Secretory products from epicardial adipose tissue from patients with type 2 diabetes impair mitochondrial  $\beta$ -oxidation in cardiomyocytes via activation of the cardiac renin-angiotensin system and induction of miR-208a. *Basic Res Cardiol* 2017;112:2.
  41. Sade LE, Eroglu S, Bozbaş H, Özbiçer S, Hayran M, Haberal A, et al. Relation between epicardial fat thickness and coronary flow reserve in women with chest pain and angiographically normal coronary arteries. *Atherosclerosis* 2009;204:580-5.
  42. Tran T, Small G, Cocker M, Yam Y, Chow BJW. A single slice measure of epicardial adipose tissue can serve as an indirect measure of total epicardial adipose tissue burden and is associated with obstructive coronary artery disease. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging* 2014;15:423-30.

43. Ng ACT, Goo SY, Roche N, van der Geest RJ, Wang WYS. Epicardial adipose tissue volume and left ventricular myocardial function using 3-dimensional speckle tracking echocardiography. *Can J Cardiol* 2016;32:1485-92.
44. Fang ZY, Prins JB, Marwick TH. Diabetic cardiomyopathy: evidence, mechanisms, and therapeutic implications. *Endocr Rev* 2004;25:543-67.
45. Ernande L, Bergerot C, Rietzschel ER, De Buyzere ML, Thibault H, PignonBlanc PC, 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.e1.
46. Cortigiani L, Borelli L, Raciti M, Bovenzi F, Picano E, Molinaro S, et al. Prediction of mortality by stress echocardiography in 2835 diabetic and 11305 nondiabetic patients. *Circ Cardiovasc Imaging* 2015;8:e002757.
47. Cortigiani L, Gherardi S, Faggioni M, Bovenzi F, Picano E, Petersen C, et al. Dual-imaging stress echocardiography for prognostic assessment of high-risk asymptomatic patients with diabetes mellitus. *J Am Soc Echocardiogr* 2017;30:149-58.
48. Wierzbowska-Drabik K, Hamala P, Roszczyk N, Lipiec P, Plewka M, Kręcki R, et al. Feasibility and correlation of standard 2D speckle tracking echocardiography and automated function imaging derived parameters of left ventricular function during dobutamine stress test. *Int J Cardiovasc Imaging* 2014;30:729-37.
49. Joyce E, Hoogslag GE, Al Amri I, Debonnaire P, Katsanos S, Bax JJ, et al. Quantitative dobutamine stress echocardiography using speckle-tracking analysis versus conventional visual analysis for detection of significant coronary artery disease after ST-segment elevation myocardial infarction. *J Am Soc Echocardiogr* 2015;28:1379-89.e1.



---

## Étude II

---

### **Effet d'une supplémentation en Vitamine D<sub>3</sub> sur la fonction cardiaque dans le diabète de type 2 non-complicqué : approche translationnelle**

**Vitamin D<sub>3</sub> supplementation alleviates early left ventricular dysfunction in asymptomatic patients with uncomplicated type 2 diabetes: a comprehensive two-dimensional speckle tracking imaging study at rest and under dobutamine stress.**

F. Aboukhoudir, C. Philouze, O. Izem, S. Nottin, P. Obert.

*Article en cours de préparation, résultats préliminaires*

**Vitamin D<sub>3</sub> supplementation alleviates left ventricular dysfunction in a mouse model of diet-induced type 2 diabetes: potential involvement of cardiac lipotoxicity modulation.**

C. Philouze, A. Marziou, C. Couturier, J. Astier, C. Riva, C. Defoort, J.-C. Martin,  
J.-F. Landrier, P.Obert.

*Article en cours de préparation, résultats préliminaires*



**Vitamin D<sub>3</sub> supplementation alleviates early left ventricular dysfunction in asymptomatic patients with uncomplicated type 2 diabetes: a comprehensive two-dimensional speckle tracking imaging study at rest and under dobutamine stress.**

Falah Aboukhoudir<sup>ab</sup>, Clothilde Philouze<sup>a</sup>, Omar Izem<sup>a</sup>, Stéphane Nottin<sup>a</sup>, Philippe Obert<sup>a</sup>.

<sup>a</sup> EA4278 LaPEC, Laboratory of Cardiovascular Pharm-Ecology, Avignon University, Avignon, France

<sup>b</sup> Cardiology department, Duffaut Hospital Center, Avignon, France

**E-mail addresses:** [faboukhoudir@ch-avignon.fr](mailto:faboukhoudir@ch-avignon.fr), [clothilde.philouze@gmail.com](mailto:clothilde.philouze@gmail.com), [omar.izem@univ-avignon.fr](mailto:omar.izem@univ-avignon.fr), [stephane.nottin@univ-avignon.fr](mailto:stephane.nottin@univ-avignon.fr), [philippe.obert@univ-avignon.fr](mailto:philippe.obert@univ-avignon.fr).

**Corresponding authors:** Dr. F Aboukhoudir and Pr. P Obert. University of Avignon, Faculty of Sciences, 301 rue Baruch de Spinoza, 84916 Avignon Cedex 9, France. Email: [faboukhoudir@ch-avignon.fr](mailto:faboukhoudir@ch-avignon.fr), [philippe.obert@univ-avignon.fr](mailto:philippe.obert@univ-avignon.fr) , Tel: +33 4 90 16 29 49, Fax: +33 4 90 16 29 01



## ABSTRACT

**Background** – Hypovitaminosis D is highly prevalent in type 2 diabetic (T2DM) patients and is associated with the risk of cardiovascular disease. Previous studies in heart failure (HF) patients have demonstrated vitamin D supplementation efficiency in improving cardiac function. However, to date, no study assessed the potential of vitamin D supplementation in preventing the progression of diabetic cardiomyopathy (DMCM). We aimed therefore to evaluate the effectiveness of vitamin D<sub>3</sub> supplementation on early left ventricular dysfunction in asymptomatic and vitamin D deficient patients with uncomplicated T2DM, by performing a comprehensive two-dimensional speckle tracking imaging echocardiography at rest and under dobutamine (DB) stress.

**Methods** – Twenty asymptomatic patients with uncomplicated T2DM and 25(OH)D<75nM were prospectively recruited. After conventional echocardiography, regional myocardial function, including both linear deformations and rotation/torsion mechanics, was evaluated at rest and during low dose DB stress echocardiography, at baseline and after a 3-month cholecalciferol supplementation protocol.

**Results** – After treatment, T2DM patients successfully normalized their 25(OH)D levels. No significant changes after Vitamin D<sub>3</sub> supplementation were observed for conventional echocardiographic measurements, while improvements in response to DB stimulation were noticed for longitudinal strains (-21.5±2.9 vs. -23.0±3.0%, p=0.01), circumferential strains (-20.2±3.6 vs. -23.1±4.4%, p=0.04), apical rotations (14.8±4.4 vs. 21.2±7.2°, p=0.002), twists (24.7±4.4 vs. 31.2±8.0°, p=0.001) and twist/untwist rates (228±48 vs. 266±57°/s, p=0.02; 224±63 vs. 277±98°/s, p=0.01). Furthermore, significant correlations were obtained between delta changes after supplementation in 25(OH)D with apical rotations (r= 0.48, p=0.03) or twist (r=0.55, p=0.02) under DB infusion.



**Conclusions** – This study provides the first evidences of the potential of vitamin D supplementation as an efficient prophylactic strategy to alleviate the progression of myocardial dysfunction in asymptomatic patients with uncomplicated T2DM, at an early stage of DMCM.

**Keywords:** uncomplicated type 2 diabetes, asymptomatic patients, dobutamine stress echocardiography, speckle-tracking imaging, regional myocardial function, vitamin D.

**Abbreviations:** *CSR* circumferential strain rate, *CS* circumferential strain, *DB* dobutamine, *DMCM* diabetic cardiomyopathy, *EAT* epicardial adipose tissue, *GLM* generalized linear model, *LSR* longitudinal strain rate, *LS* longitudinal strain, *SI-DI* strain imaging diastolic index,  $\sigma ES$  meridional wall stress, *T2DM* type 2 diabetes.





## 1 INTRODUCTION

2 In the past 3 decades, type 2 diabetes mellitus (T2DM) global prevalence has grown  
3 dramatically, doubling since 1980 (Roglic, 2016). The leading cause of morbidity and mortality, as  
4 well as the most frequent complication observed in diabetic patients, is diabetic cardiomyopathy  
5 (DMCM) (Waddingham *et al.*, 2015). DMCM develops independently from hypertension or coronary  
6 artery disease (CAD) and its pathogenesis is thought to begin shortly after the onset of diabetes,  
7 emphasizing the importance of early diagnosis and prevention of its progression (Waddingham *et al.*,  
8 2015).

9 DMCM is defined by structural and functional alterations of the cardiac muscle, innervation  
10 and vascularization (Jia *et al.*, 2016). In T2DM patients, the typical clinical picture is characterized by  
11 a concentric hypertrophy, associated with a global diastolic dysfunction and a preserved left  
12 ventricular ejection fraction (LVEF) (Seferović & Paulus, 2015). However, some previous studies using  
13 deformation imaging techniques at rest have also highlighted subclinical alterations of regional  
14 systolic function, together with impaired regional diastolic function (Fang *et al.*, 2004; Nakai *et al.*,  
15 2009). Of note, these findings were not unanimously reported, likely due to the various patient  
16 selection criteria (Govind *et al.*, 2006; Cognet *et al.*, 2013; Cadeddu *et al.*, 2013; Wierzbowska-Drabik  
17 *et al.*, 2015; Philouze *et al.*, 2018). Indeed, the magnitude of regional myocardial impairment seems  
18 closely related to diabetes duration, glycemic control and to the presence of complications (Nakai *et al.*  
19 *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2013; Zhen *et al.*, 2015; Enomoto *et al.*, 2016). In uncomplicated diabetes,  
20 dobutamine (DB) stress echocardiography allowed unmasking regional myocardial function  
21 impairments remaining otherwise discrete at rest (Govind *et al.*, 2006; Cognet *et al.*, 2013; Philouze  
22 *et al.*, 2018). Myocardial performance results from a complex interplay between linear deformations  
23 and torsional mechanics (Sengupta *et al.* 2007). Most of the aforementioned studies assessed  
24 longitudinal deformations only, and little is known about circumferential deformations and  
25 rotational/torsional mechanics, two major components of myocardial function under stress



26 conditions (Notomi *et al.*, 2006; Esch & Warburton, 2009; Doucende *et al.*, 2010). Thus, a  
27 multidirectional evaluation of regional myocardial function seems to be of first importance in the  
28 context of stress echocardiography. Recently, Philouze *et al.* (2018) demonstrated no improvement  
29 in apical rotations following DB infusion, together with a blunted response of basal rotations, twist  
30 and twist/untwist rates as well as longitudinal (LS) and circumferential (CS) strains in asymptomatic  
31 patients with uncomplicated T2DM, compared to age- and sex-matched healthy controls (Philouze *et al.*  
32 *et al.*, 2018). If further studies are needed for a better understanding of the effects of T2DM on left  
33 ventricular myocardial mechanics, interventional studies are also required in an attempt to alleviate  
34 the aforementioned abnormalities.

35         Although mechanisms underlying the development of the DMCM are not fully understood  
36 yet, activation of the renin-angiotensin system and chronic metabolic disorders as well as  
37 inflammation have been implicated in the progression of macro- and microcirculation disorders  
38 (capillary rarefaction, endothelial dysfunction...), fibrosis and cardiomyocyte dysfunction (impaired  
39 metabolism, hypertrophy, calcium handling disturbances...) (Mandavia *et al.*, 2013; Jia *et al.*, 2016;  
40 Frati *et al.*, 2017). Beyond its classical role in skeletal health by controlling calcium and phosphorus  
41 metabolism, vitamin D has been shown to play a pivotal function in the regulation of cardiovascular  
42 homeostasis both in *in vitro* and *in vivo* studies. Indeed, by its regulating properties of calcium  
43 homeostasis, cell proliferation, renin-angiotensin system, immunity and inflammation, vitamin D has  
44 the potential to prevent the progression of myocardial hypertrophy, fibrosis and function impairment  
45 (Gardner *et al.*, 2013; Norman & Powell, 2014; Lee *et al.*, 2015). Interestingly, hypovitaminosis D is  
46 highly prevalent in T2DM patients, and low serum calcidiol has been associated both with the  
47 development of T2DM and diabetic complications, as well as with adverse cardiovascular events and  
48 cardiovascular mortality in the general and diabetic population (Afzal *et al.*, 2013; Heidari *et al.*,  
49 2015; Zhu *et al.*, 2017). Of note, in T2DM patients with no history of CAD, Chen *et al.* (2014) reported  
50 an independent association between vitamin D deficiency and impaired regional LS (Chen *et al.*,



51 2014). Interventional studies in the general population or in HF patients have already demonstrated  
52 the effectiveness of vitamin D supplementation in improving global and regional cardiac function,  
53 ventricular remodeling, inflammation and renin-angiotensin system activation (Schleithoff *et al.*,  
54 2006; Schrotten *et al.*, 2013; Sunbul *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2018). However, interventional studies in  
55 patients with T2DM have not considered heart function as primary endpoint and data regarding the  
56 efficiency of vitamin D supplementation in preventing the progression of DMCM in this population  
57 are still dramatically lacking.

58 Thus, the aim of the present study was to evaluate the impact of a 3-month vitamin D<sub>3</sub>  
59 supplementation on early left ventricular dysfunction in asymptomatic and vitamin D deficient  
60 patients with uncomplicated T2DM, by performing a comprehensive two-dimensional (2D) speckle  
61 tracking imaging echocardiography (STE) at rest and under DB stress.

## 62 **METHODS**

### 63 **Study population**

64 Vitamin D deficient (25(OH)D<75nM) T2DM patients were prospectively recruited from our  
65 cardiology department between February 2017 and October 2018 (see flow chart, figure 1). Exclusion  
66 criteria included severe obesity, poor glycemic control (HbA1c>9%), LVEF <55%, moderate to severe  
67 left ventricular hypertrophy (women: >109g/m<sup>2</sup> ; men: >132g/m<sup>2</sup>), known cardiovascular diseases  
68 and diabetes-related complications, including moderate to severe autonomic neuropathy,  
69 proliferative retinopathy and nephropathy. An additional exclusion criterion was poor echogenicity.  
70 All the subjects are free from epicardial CAD, attested by negative findings on a high-dose DB stress  
71 echocardiography (40 µg.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) or coronary angiography when appropriate. Patients with  
72 hypertension but well-controlled blood pressure (BP) were included. The study was approved by the  
73 local human ethics committee (IRB-18.01-01) and all the subjects gave written informed consent.



## 74 **Clinical and biological assessments**

75           At baseline and after the 3-month supplementation protocol, patients underwent a medical  
76 examination, during which ongoing treatments and existence of risk factors were noticed. Blood  
77 samples were then collected and fasting glycemia, glycated hemoglobin (HbA1c), insulin, calcidiol,  
78 parathyroid hormone (PTH), calcium, phosphorus, total cholesterol, high- and low-density  
79 lipoproteins (HDL, LDL), triglycerides (TG), ultra-sensitive C-reactive protein (CRP<sub>us</sub>), pro-brain  
80 natriuretic peptide (ProBNP), creatinine clearance, albumin and thyroid-stimulating hormone (TSH)  
81 serum levels were assayed using biochemical kits. Insulin resistance was estimated using the  
82 homeostasis model assessment-insulin resistance (HOMA-IR)(Matthews *et al.*, 1985).

## 83 **Standard echocardiography**

84           Echocardiography was performed at baseline and after the 3-month supplementation  
85 protocol using commercially available ultrasound equipment (Vivid E95™, GE Healthcare, USA). All  
86 standard echo and Doppler parameters of LV systolic and diastolic function were measured according  
87 to recent guidelines (Lang *et al.*, 2015*b*; Nagueh *et al.*, 2016). LV volumes and LVEF were measured  
88 using the Simpson's biplane method. LV mass (LVM) was calculated by the Devereux formula and  
89 indexed for height (Cornell adjustment). Left atrial (LA) volume was calculated by the biplane method  
90 in 4- and 2-chamber views, and indexed to body surface area (BSA). Pulsed-Doppler LV transmitral  
91 velocities (with the sample volume at the mitral leaflet tips), including early (E) and atrial (A) waves,  
92 were obtained in the apical 4-chamber view. Color-coded TDI measures of myocardial systolic (*s'*),  
93 early diastolic (*e'*) and atrial (*a'*) velocities were assessed at the mitral annulus level in the apical 4-  
94 and 2-chamber views. The E/*e'* ratio, with *e'* calculated as the average from septal and lateral  
95 velocities, was used as an index of LV filling pressure (Nagueh *et al.*, 2016).

96           Epicardial fat was identified as the echo free space between the outer wall of the  
97 myocardium and the visceral layer of the pericardium and its thickness was measured



98 perpendicularly to the free wall of the right ventricle from both parasternal long and short-axis views  
99 at end-systole (Iacobellis *et al.*, 2003).

#### 100 **Dobutamine stress echocardiography**

101 DB was infused intravenously in incremental doses of 10, 20, 30 and 40  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  during 3  
102 min stages. After the 20  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  stage of the protocol, atropine was added in 0.25 mg  
103 increments up to 1.5 mg when appropriate, allowing thus achievement of age-adjusted maximal  
104 heart rate (HR). The test was stopped when age-adjusted HR limit was reached, when severe  
105 hypertension (systolic BP  $\geq 250$  mmHg or diastolic BP  $\geq 120$  mm Hg) or symptomatic reduction in  
106 systolic BP  $\geq 40$  mmHg from baseline developed, or when ventricular arrhythmia occurred. At the end  
107 of stress protocol, 5 mg atenolol was administered to lower HR and, if needed, another 5 mg was  
108 given a few minutes later. Patients were then placed under ambulatory observation for 1 hour. No  
109 severe adverse effects were noticed. B-blockers intake was interrupted at least 72 hours prior to the  
110 DB stress echocardiography.

111 At rest and at each step of the stress protocol, 2D cine-loops (frame rate  $>70$  ips) of at least 5  
112 cycles were recorded in the parasternal long- and short-axis (base, papillary muscles and apex) views,  
113 as well as in the apical 4- and 2-chambers views for visual inspection of wall motion abnormalities.  
114 The 2D-strain analysis was performed post-processing (EchoPAC 201™ software, GE Healthcare,  
115 USA), only at rest and at stages corresponding to a target HR between 110 and 120 bpm, which was  
116 in each case obtained for low DB doses (10 or 20  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  depending on the subjects). For each view,  
117 the 3 cardiac cycles displaying the best image quality were selected. Longitudinal and circumferential  
118 strains and strain rates (SR), as well as rotations at the apex and base, were directly obtained from  
119 the 6 segment model, as previously reported (Edwardsen *et al.*, 2006). For each cardiac cycle, if more  
120 than 2 segments were not trackable after adjustment, the cardiac cycle was excluded from analysis.  
121 Twist mechanics was computed from apical and basal rotational data using dedicated software



122 (Scilab, Paris, France) (Doucende *et al.*, 2010). The strain imaging diastolic index (SI-DI), was  
 123 calculated from the formula proposed by Chiang *et al.* (Chiang *et al.*, 2014):  $SI-DI = (a-b)/a$  ; with a:  
 124 strain value at aortic valve closure and b: strain value at the third of diastole duration. This index is  
 125 sensitive to rapid change and elevation of LV filling pressures, reflected by a decreased SI-DI.

126 Data of the 3 best cycles were averaged before statistical analysis. BP and HR were  
 127 continuously monitored, and the systolic meridional wall stress ( $\sigma_{es}$ ), an index of afterload, was  
 128 calculated, using the following formula (Jamal *et al.*, 2001):

$$129 \quad \sigma_{es} = SBP * \left\{ \frac{LVDs}{PWS * (1 + PWS / LVDs)} \right\} * 0.34$$

130 with *SBP*: systolic blood pressure, *LVDs*: systolic LV diameter and *PWs*: systolic posterior wall  
 131 thickness.

132 LV end-diastolic volumes were also obtained as preload index.

### 133 **Vitamin D supplementation protocol**

134 Depending on their baseline circulating 25(OH)D level, patients were allocated to 1 of the 3  
 135 supplementation protocols:

- 136 • 75>25(OH)D≥50 nM: 2 doses of 100 000 UI cholecalciferol, every 15 days
- 137 • 50>25(OH)D≥25 nM: 3 doses of 100 000 UI cholecalciferol, every 23 days
- 138 • 25(OH)D>25 nM: 4 doses of 100 000 UI cholecalciferol, every 15 days

139 A dosage of serum 25(OH)D was performed 2 months after the beginning of the  
 140 supplementation protocol, in order to confirm its normalization. If the 75 nM cut-off value was not  
 141 reached, supplementation was further maintained with a daily 1 000 UI dose. Three months after  
 142 baseline assessment, the post-supplementation evaluation was performed. In order to avoid



143 confounding factors, no change in treatments or lifestyle was allowed at inclusion and during follow-  
144 up.

#### 145 **Statistical analysis**

146 Statistical analysis was performed using IBM SPSS statistics 20.0™ software (IBM Corp., USA).  
147 Values are expressed as mean±SD, otherwise specified. Statistical significance was defined as p  
148 value<0.05. Normality was assessed using Shapiro-Wilk test and non-Gaussian biological variables  
149 were log-transformed. The effect of Vitamin D supplementation on biological, demographic variables  
150 as well as resting standard echocardiography and STE parameters at rest and under DB conditions  
151 was tested using a linear mixed-effect model with random intercept and pre-/post-supplementation  
152 (“time”) as fixed effects. The same model was also used to compare DB infusion with resting data at  
153 baseline and post-supplementation. Pearson correlations were used to investigate the association  
154 between delta ( $\Delta$ ) changes in STE parameters with clinical and biological variables.

### 155 **RESULTS**

#### 156 **Clinical and echocardiographic characteristics**

157 Baseline clinical data are presented table 1. After supplementation, all patients normalized  
158 their serum 25(OH)D levels, while no changes were noticed for all anthropological or biological  
159 measures of interest (see figure2).

160 Results of conventional echocardiography at baseline and after supplementation are  
161 summarized in table 2. No significant changes in standard echocardiographic indexes were observed  
162 after supplementation, while a tendency ( $p=0.06$ ) was observed for isovolumic relaxation time.  
163 Epicardial adipose tissue thickness decreased significantly ( $p<0.001$ ) after vitamin D supplementation



## 164 STE at rest and under DB infusion

165 STE data are presented in table 3, together with hemodynamic indexes. At rest, no change  
166 was observed after vitamin D supplementation for all STE indexes. However, improvements were  
167 noticed post-supplementation under DB infusion for LS (+6.9%), LS systolic (+7.1%) and diastolic  
168 (+10.6%) SR, CS (+11.4%) and circumferential systolic SR (+14.2%) as well as apical rotation (+14.3%),  
169 twist (+12.6%) and twist/untwist rate (+16.6 and +23.6%, respectively). The figure 3 depicts apical  
170 rotation and twist profiles at rest and under DB infusion at baseline and after the 3-month  
171 cholecalciferol supplementation protocol. As shown, the largest increase following supplementation  
172 was observed for apical rotations (+47.9%), which did not significantly respond to DB stimulation at  
173 baseline but were significantly enhanced under DB stress after vitamin D supplementation.  
174 Furthermore, significant correlations were obtained between  $\Delta$  changes after supplementation in  
175 25(OH)D with apical rotation ( $r= 0.48$ ,  $p=0.03$ ) as well as twist ( $r=0.55$ ,  $p=0.02$ ) under DB infusion.  
176 Regarding hemodynamic parameters, no effect of vitamin D supplementation was noticed on HR and  
177 BP at rest and under DB stress, except for diastolic BP which was significantly enhanced with DB.  
178 Similarly, regardless of conditions, vitamin D supplementation did not significantly alter end-diastolic  
179 volume and end-systolic meridional wall stress. At baseline and after treatment, DB infusion  
180 significantly enhanced all STE parameters and hemodynamic variables when compared to resting  
181 condition, except for diastolic BP and apical rotations under DB at baseline.

## 182 DISCUSSION

183 To our knowledge, the present study is the first one to assess the impact of cholecalciferol  
184 supplementation on myocardial mechanics, at rest and under DB stress, in a population of  
185 asymptomatic patients with uncomplicated T2DM.

186 Vitamin D deficiency is today a major health issue. In the general population,  
187 epidemiological studies have clearly established significant associations between vitamin D





188 deficiency with adverse cardiovascular events and cardiovascular mortality (Wang *et al.*, 2008, 2012;  
189 Zhu *et al.*, 2017). Vitamin D deficiency has also been linked to several cardiovascular risk factors such  
190 as hypertension, dyslipidemia and T2DM (Chiu *et al.*, 2004; Afzal *et al.*, 2013; Norman & Powell,  
191 2014; Abbasi *et al.*, 2015). A high prevalence of hypovitaminosis D has been previously reported in  
192 T2DM patients (Fernández-Juárez *et al.*, 2013; Alcobierre *et al.*, 2015; Usluogullari *et al.*, 2015; Reddy  
193 *et al.*, 2015) and prospective longitudinal studies have shown that higher baseline vitamin D levels  
194 reduced the risk of incident T2DM (Pittas *et al.*, 2006). Furthermore, low serum calcidiol is associated  
195 with the risk of diabetic complications (Alcobierre *et al.*, 2015; Maser *et al.*, 2015; Jung *et al.*, 2016).  
196 As in the general population, large-scale prospective observational studies have also demonstrated  
197 that low baseline levels of 25(OH)D were associated with the incidence of cardiovascular disease and  
198 mortality in T2DM patients (Cigolini *et al.*, 2006; Joergensen *et al.*, 2010; Heidari *et al.*, 2015). Of  
199 note, recent findings in T2DM patients with no history of CAD revealed that vitamin D deficiency is  
200 independently associated with impaired regional myocardial function (Chen *et al.*, 2014), suggesting  
201 that hypovitaminosis D maybe implicated in the pathogenesis of DMCM. Whether there is a cause-  
202 and-effect relationship remains however unclear, and interventional studies are needed to asses  
203 whether vitamin D supplementation could improve cardiac health in T2DM patients.

204           From a cardiovascular perspective, interventional studies in T2DM patients have for the most  
205 part investigated the vascular system, with conflicting results being reported (Sugden *et al.*, 2008;  
206 Witham *et al.*, 2010; Beveridge *et al.*, 2015, 2018) and to the best of our knowledge no data is to day  
207 available on regional myocardial function and cardiac remodeling. The results from the present study  
208 demonstrate for the first time that vitamin D supplementation in asymptomatic and vitamin D  
209 deficient patients with uncomplicated T2DM is able to improve LV myocardial mechanics. Whereas  
210 our 3-month cholecalciferol supplementation protocol did not affect STE indexes at rest, significant  
211 improvements were obtained under DB stress for longitudinal and circumferential deformations as  
212 well as apical rotations and twist mechanics. Of note, significant univariate correlations were noticed



213 between  $\Delta$  changes post-supplementation in 25(OH)D with apical rotations ( $r= 0.48$ ,  $p=0.03$ ) or twist  
214 ( $r=0.55$ ,  $p=0.02$ ) under DB infusion. Our results contrast with those of Sunbul *et al.* (2015) who  
215 recently demonstrated improvements in LS and CS at rest in vitamin D deficient patients free from  
216 cardiovascular risk factors consecutive to 12 weeks of a high-dose vitamin D supplementation  
217 protocol (Sunbul *et al.*, 2015). The discrepancies with our data might potentially originate from the  
218 cholecalciferol dosage applied in their study, which was higher than ours. Indeed, it seems that the  
219 efficiency of vitamin D supplementation in improving cardiac function could be dose-dependent  
220 (Zhao *et al.*, 2018). A former study from our laboratory in a similar population of asymptomatic  
221 patients with uncomplicated T2DM highlighted the usefulness of stress echocardiography to unmask  
222 regional myocardial abnormalities that were otherwise absent at rest (Philouze et al, 2018). The  
223 findings of the present study underpin the importance of multidirectional assessment of regional  
224 myocardial mechanics by 2D-STE under DB stress, and its usefulness in revealing subtle  
225 improvements induced by Vitamin D supplementation that were not evident at rest. This  
226 methodology seems therefore to be particularly well suitable for the assessment of early  
227 prophylactic intervention strategies, such as vitamin D supplementation. The enhancement in  
228 circumferential function and torsional mechanics consecutive to a  $\beta$ -adrenergic challenge, together  
229 with a restoration of apical rotational response, is of first importance considering the pivotal role of  
230 those components of myocardial mechanics in increasing cardiac pumping efficiency in response to  
231 increased workload (Notomi *et al.*, 2006; Esch & Warburton, 2009; Doucende *et al.*, 2010). Apical  
232 rotations are the major driving force of systolic torsion, a critical determinant of LV filling efficiency.  
233 Indeed, torsion determines LV untwist, which further conditions atrioventricular pressure gradient  
234 and subsequent suction, a phenomenon critical at mid-range and elevated HR, when filling time is  
235 truncated (Notomi *et al.*, 2006; Esch & Warburton, 2009). Impaired rotational and torsional  
236 mechanics response to moderate  $\beta$ -adrenergic challenge may be involved in the development of  
237 exercise intolerance frequently reported in T2DM patients (Philouze et al, 2018), and its



238 improvement, by vitamin D supplementation such as in the present study, may help alleviating this  
239 phenomenon. Further studies will be needed to resolve this question.

240 No changes in left ventricular morphology and global systolic and diastolic function were  
241 observed consecutive to our intervention. However, it should be emphasized that baseline global  
242 systolic function and LV morphology were not pathological in our population, because reduced LVEF  
243 (<55%) and LV hypertrophy were exclusion criteria. Our findings are in line with Sunbul *et al.* (2015)  
244 who also failed to show significant changes in conventional echocardiographic parameters in their  
245 patients free from cardiovascular risk factors who benefited from a 12-week high-dose vitamin D  
246 supplementation. It would seem that beneficial effects can be obtained in individuals with more  
247 depressed function and pathological remodeling at baseline, such as in HF patients. Indeed, a meta-  
248 analysis of 7 randomized controlled trials (n=465 HF patients, including 235 cases in the vitamin D  
249 group and 230 cases in the control group) by Zhao et al (2018) demonstrated that vitamin D  
250 supplementation was able to improve LV remodeling and cardiac function, and that the  
251 supplementation (especially with high doses) was more effective at reducing LV dilation and  
252 increasing global systolic function in those with reduced LVEF compared to those without LVEF  
253 impairment.

254 The present study was not designed to resolve the underlying mechanisms responsible for  
255 the improvements of myocardial mechanics under DB stress by cholecalciferol. Based on previous  
256 both clinical and experimental studies, some hypotheses can however be put forward. In accordance  
257 with our results, a recent meta-analysis of randomized controlled trials evaluating the effects of  
258 vitamin D supplementation on glycemic control in T2DM patients showed little evidence of beneficial  
259 effects, at least in those with fairly good glycemic control (Krul-Poel *et al.*, 2015). Similar results have  
260 been shown on traditional cardiovascular risk markers, such as abdominal obesity and hyperlipidemia  
261 (Tabesh *et al.*, 2015) agreeing with our data, and other factors are therefore very likely to contribute  
262 to the favorable effects observed here. Beyond its traditionally recognized influence on skeletal



263 health, vitamin D exerts a large spectrum of biological actions, regulating cell proliferation and  
264 differentiation, angiogenesis, apoptosis, oxidative stress, and inflammation as well as hormonal  
265 status including the renin-angiotensin-aldosterone system, factors which likely interact with the  
266 pathogenesis of diabetes cardiovascular complications. Prior clinical studies have reported favorable  
267 effects of vitamin D supplementation on inflammatory profile (decrease in pro-inflammatory tumor  
268 necrosis factor  $\alpha$  and increase in anti-inflammatory interleukin 10), aldosterone serum levels and  
269 plasma renin activity in HF patients (Schleithoff *et al.*, 2006; Schrotten *et al.*, 2013; Boxer *et al.*, 2014).  
270 Beneficial effects on inflammatory profile have also been documented in T2DM patients (Yu et al  
271 2017 review RCT). Similar results were observed in a rat model of streptozotocin-induced type 1  
272 diabetes, in which a 4-week 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> subcutaneous treatment decreased cardiac inflammatory  
273 cytokine expression (Lee *et al.*, 2014a). Considering that renin-angiotensin system activation and  
274 inflammation are two major driving forces in the pathophysiology of DMCM, their modulation by  
275 vitamin D could participate in the alleviation of regional myocardial dysfunction. Further studies will  
276 be needed to validate this hypothesis in T2DM patients and rodent models. Cardiac adiposity is  
277 recognized today as an actor involved in the pathogenesis of cardiometabolic disease and growing  
278 evidence suggest that epicardial fat might play a pivotal role (Iacobellis *et al.*, 2004; Corradi *et al.*,  
279 2004; Sade *et al.*, 2009; Kazlauskaitė *et al.*, 2010; Serrano-Ferrer *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017). This  
280 fat pad, directly in contact with the surface of the myocardium and coronary vessels, grows and shifts  
281 to an adverse pro-inflammatory secretory profile in T2DM (Wang *et al.*, 2009; Iacobellis, 2015), thus  
282 directly impacting cardiomyocyte as well as vascular endothelial and smooth muscle function (Sade  
283 *et al.*, 2009; Greulich *et al.*, 2012; Blumensatt *et al.*, 2017). In patients with CAD, increased activation  
284 of inflammatory pathways of EAT has been linked to systemic and myocardial vitamin D deficiencies  
285 (Dozio *et al.*, 2014). Furthermore, a recent study from our laboratory in uncomplicated diabetes  
286 identified EAT thickness as a major independent contributor to the blunted response of regional  
287 myocardial function to DB stress (Philouze *et al.*, 2018). In the present work, EAT significantly



288 decreased after cholecalciferol supplementation, agreeing with the data from Sunbul et al. (2015). Of  
289 note, a significant relationship was obtained between  $\Delta$  changes post-supplementation in EAT with  
290 twist ( $r=-0.49$ ,  $p=0.03$ ) under DB infusion. Weak and non-significant relationships were obtained  
291 however with  $\Delta$  changes in apical rotations ( $r= -0.30$ ,  $p=0.21$ ), LS ( $r= 0.33$ ,  $p=0.16$ ) or CS ( $r= 0.28$ ,  
292  $p=0.25$ ) under DB, on account maybe of a too small sample size, nevertheless questioning inference  
293 of causality. Further large-scale interventional studies will be needed to resolve the contribution of  
294 the reduction in epicardial fat to the improvements in myocardial mechanics.

### 295 **Clinical implication**

296 From a clinical point of view, our work underlies the importance of serum calcidiol dosage  
297 and, in case of deficiency, ensuing supplementation in asymptomatic patients with uncomplicated  
298 T2DM. Indeed, our findings suggest that vitamin D supplementation could be an efficient  
299 prophylactic strategy to alleviate the progression of myocardial dysfunction in those patients, at least  
300 at the earliest stages of DMCM, prior any clinical manifestations. On the other hand, this work also  
301 support the usefulness of 2D-STE under DB stress in evaluating the subtle changes in myocardial  
302 regional function induced by non- pharmacological intervention, that were otherwise undetectable  
303 at rest.

### 304 **Study limitations**

305 Beyond the classical limitations of 2D-STE, this work exhibit several shortcomings. First of all,  
306 the number of participant is here limited and a larger cohort is needed to confirm our results.  
307 Secondly, this is not a double-blinded, randomized, placebo-controlled trial. Such studies must be  
308 conducted in order to further support our findings. Finally, our study was not designed to resolve the  
309 underlying mechanisms responsible for the observed effects of vitamin D supplementation on  
310 myocardial function, and further experimental and clinical studies are therefore needed.



311 **Conclusion**

312           This study provides the first evidences of the potential of vitamin D supplementation as an  
313 efficient prophylactic strategy to impede the progression of myocardial dysfunction in asymptomatic  
314 patients with uncomplicated T2DM, at least at an early stage of DMCM.

315 **ACKNOWLEDGMENTS**

316           Authors warmly thank Antoine Grandperrin for his contribution to the creation of figures.

317 **SOURCES OF FUNDING**

318           None.

319 **DISCLOSURES**

320           Authors have no conflict of interest to disclose.

**REFERENCES**

- Abbasi F, Blasey C, Feldman D, Caulfield MP, Hantash FM & Reaven GM (2015). Low Circulating 25-Hydroxyvitamin D Concentrations Are Associated with Defects in Insulin Action and Insulin Secretion in Persons with Prediabetes. *J Nutr* **145**, 714–719.
- Afzal S, Bojesen SE & Nordestgaard BG (2013). Low 25-Hydroxyvitamin D and Risk of Type 2 Diabetes: A Prospective Cohort Study and Metaanalysis. *Clinical Chemistry* **59**, 381–391.
- Alcubierre N, Valls J, Rubinat E, Cao G, Esquerda A, Traveset A, Granado-Casas M, Jurjo C & Mauricio D (2015). Vitamin D Deficiency Is Associated with the Presence and Severity of Diabetic Retinopathy in Type 2 Diabetes Mellitus. *J Diabetes Res*; DOI: 10.1155/2015/374178.
- Beveridge LA et al. (2015). Effect of Vitamin D Supplementation on Blood Pressure. *JAMA Intern Med* **175**, 745–754.
- Beveridge LA et al. (2018). Effect of Vitamin D Supplementation on Markers of Vascular Function: A Systematic Review and Individual Participant Meta-Analysis. *J Am Heart Assoc*; DOI: 10.1161/JAHA.117.008273.
- Blumensatt M, Fahlbusch P, Hilgers R, Bekaert M, Herzfeld de Wiza D, Akhyari P, Ruige JB & Ouwens DM (2017). Secretory products from epicardial adipose tissue from patients with type 2 diabetes impair mitochondrial  $\beta$ -oxidation in cardiomyocytes via activation of the cardiac renin-angiotensin system and induction of miR-208a. *Basic Res Cardiol* **112**, 2.
- Boxer RS, Hoit BD, Schmotzer BJ, Stefano GT, Gomes A & Negrea L (2014). The Effect of Vitamin D on Aldosterone and Health Status in Patients with Heart Failure. *J Card Fail* **20**, 334–342.



- Cadeddu C, Nocco S, Piano D, Deidda M, Cossu E, Baroni MG & Mercurio G (2013). Early impairment of contractility reserve in patients with insulin resistance in comparison with healthy subjects. *Cardiovasc Diabetol* **12**, 66.
- Chen Y, Zhao C-T, Zhen Z, Wong A, Tse HF & Yiu KH (2014). Association of myocardial dysfunction with vitamin D deficiency in patients with type 2 diabetes mellitus. *Journal of Diabetes and its Complications* **28**, 286–290.
- Chiang S-J, Daimon M, Ishii K, Kawata T, Miyazaki S, Hirose K, Ichikawa R, Miyauchi K, Yeh M-H, Chang N-C & Daida H (2014). Assessment of Elevation of and Rapid Change in Left Ventricular Filling Pressure Using a Novel Global Strain Imaging Diastolic Index. *Circulation Journal* **78**, 419–427.
- Chiu KC, Chu A, Go VLW & Saad MF (2004). Hypovitaminosis D is associated with insulin resistance and  $\beta$  cell dysfunction. *Am J Clin Nutr* **79**, 820–825.
- Cigolini M, Iagulli MP, Miconi V, Galiotto M, Lombardi S & Targher G (2006). Serum 25-Hydroxyvitamin D3 Concentrations and Prevalence of Cardiovascular Disease Among Type 2 Diabetic Patients. *Diabetes Care* **29**, 722–724.
- Cognet T, Vervueren P-L, Dercle L, Bastié D, Richaud R, Berry M, Marchal P, Gautier M, Fouilloux A, Galinier M, Carrié D, Massabuau P, Berry I & Lairez O (2013). New concept of myocardial longitudinal strain reserve assessed by a dipyridamole infusion using 2D-strain echocardiography: the impact of diabetes and age, and the prognostic value. *Cardiovascular Diabetology* **12**, 84.
- Corradi D, Maestri R, Callegari S, Pastori P, Goldoni M, Luong TV & Bordi C (2004). The ventricular epicardial fat is related to the myocardial mass in normal, ischemic and hypertrophic hearts. *Cardiovascular Pathology* **13**, 313–316.





- Doucende G, Schuster I, Rupp T, Startun A, Dautat M, Obert P & Nottin S (2010). Kinetics of Left Ventricular Strains and Torsion During Incremental Exercise in Healthy Subjects. *Clinical Perspective. Circulation: Cardiovascular Imaging* **3**, 586–594.
- Edvardsen T, Helle-Valle T & Smiseth OA (2006). Systolic Dysfunction in Heart Failure with Normal Ejection Fraction: Speckle-Tracking Echocardiography. *Progress in Cardiovascular Diseases* **49**, 207–214.
- Enomoto M, Ishizu T, Seo Y, Kameda Y, Suzuki H, Shimano H, Kawakami Y & Aonuma K (2016). Myocardial dysfunction identified by three-dimensional speckle tracking echocardiography in type 2 diabetes patients relates to complications of microangiopathy. *Journal of Cardiology* **68**, 282–287.
- Esch BT & Warburton DER (2009). Left ventricular torsion and recoil: implications for exercise performance and cardiovascular disease. *Journal of Applied Physiology* **106**, 362–369.
- Fang ZY, Leano R & Marwick TH (2004). Relationship between longitudinal and radial contractility in subclinical diabetic heart disease. *Clinical Science* **106**, 53–60.
- Fernández-Juárez G, Luño J, Barrio V, de Vinuesa SG, Praga M, Goicoechea M, Lahera V, Casas L & Oliva J (2013). 25 (OH) Vitamin D Levels and Renal Disease Progression in Patients with Type 2 Diabetic Nephropathy and Blockade of the Renin-Angiotensin System. *Clin J Am Soc Nephrol* **8**, 1870–1876.
- Frati G, Schirone L, Chimenti I, Yee D, Biondi-Zoccai G, Volpe M & Sciarretta S (2017). An overview of the inflammatory signalling mechanisms in the myocardium underlying the development of diabetic cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* **113**, 378–388.



Gardner DG, Chen S & Glenn DJ (2013). Vitamin D and the heart. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **305**, R969–R977.

Govind S, Saha S, Brodin L-A, Ramesh SS, Arvind SR & Quintana M (2006). Impaired myocardial functional reserve in hypertension and diabetes mellitus without coronary artery disease: Searching for the possible link with congestive heart failure in the myocardial Doppler in diabetes (MYDID) study II. *Am J Hypertens* **19**, 851–857; discussion 858.

Greulich S, Maxhera B, Vandenplas G, Wiza DH de, Smiris K, Mueller H, Heinrichs J, Blumensatt M, Cuvelier C, Akhyari P, Ruige JB, Ouwens DM & Eckel J (2012). Secretory Products From Epicardial Adipose Tissue of Patients With Type 2 Diabetes Mellitus Induce Cardiomyocyte Dysfunction. *Circulation* **126**, 2324–2334.

Heidari B, Nargesi AA, Hafezi-Nejad N, Sheikhabahaei S, Pajouhi A, Nakhjavani M & Esteghamati A (2015). Assessment of serum 25-hydroxy vitamin D improves coronary heart disease risk stratification in patients with type 2 diabetes. *American Heart Journal* **170**, 573-579.e5.

Iacobellis G (2015). Local and systemic effects of the multifaceted epicardial adipose tissue depot. *Nature Reviews Endocrinology* **11**, 363–371.

Iacobellis G, Ribaldo MC, Assael F, Vecci E, Tiberti C, Zappaterreno A, Di Mario U & Leonetti F (2003). Echocardiographic Epicardial Adipose Tissue Is Related to Anthropometric and Clinical Parameters of Metabolic Syndrome: A New Indicator of Cardiovascular Risk. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **88**, 5163–5168.

Iacobellis G, Ribaldo MC, Zappaterreno A, Iannucci CV & Leonetti F (2004). Relation between epicardial adipose tissue and left ventricular mass. *The American Journal of Cardiology* **94**, 1084–1087.



- Jamal F, Strotmann J, Weidemann F, Kukulski T, D'hooge J, Bijmens B, Werf FV de, Scheerder ID & Sutherland GR (2001). Noninvasive Quantification of the Contractile Reserve of Stunned Myocardium by Ultrasonic Strain Rate and Strain. *Circulation* **104**, 1059–1065.
- Jia G, DeMarco VG & Sowers JR (2016). Insulin resistance and hyperinsulinaemia in diabetic cardiomyopathy. *Nat Rev Endocrinol* **12**, 144–153.
- Joergensen C, Gall M-A, Schmedes A, Tarnow L, Parving H-H & Rossing P (2010). Vitamin D Levels and Mortality in Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* **33**, 2238–2243.
- Jung C-H, Kim K-J, Kim B-Y, Kim C-H, Kang SK & Mok J-O (2016). Relationship between vitamin D status and vascular complications in patients with type 2 diabetes mellitus. *Nutrition Research* **36**, 117–124.
- Kazlauskaitė R, Doukky R, Evans A, Margeta B, Ruchi A, Fogelfeld L & Kelly RF (2010). Predictors of diastolic dysfunction among minority patients with newly diagnosed type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* **88**, 189–195.
- Krul-Poel YHM, Westra S, Boekel E ten, Wee MM ter, Schoor NM van, Wijland H van, Stam F, Lips PTAM & Simsek S (2015). Effect of Vitamin D Supplementation on Glycemic Control in Patients With Type 2 Diabetes (SUNNY Trial): A Randomized Placebo-Controlled Trial. *Diabetes Care* **38**, 1420–1426.
- Lang RM, Badano LP, Mor-Avi V, Afilalo J, Armstrong A, Ernande L, Flachskampf FA, Foster E, Goldstein SA, Kuznetsova T, Lancellotti P, Muraru D, Picard MH, Rietzschel ER, Rudski L, Spencer KT, Tsang W & Voigt J-U (2015). Recommendations for Cardiac Chamber Quantification by Echocardiography in Adults: An Update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *Journal of the American Society of Echocardiography* **28**, 1-39.e14.



- Lee T-I, Kao Y-H, Chen Y-C, Tsai W-C, Chung C-C & Chen Y-J (2014). Cardiac metabolism, inflammation, and peroxisome proliferator-activated receptors modulated by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in diabetic rats. *International Journal of Cardiology* **176**, 151–157.
- Lee T-W, Lee T-I, Chang C-J, Lien G-S, Kao Y-H, Chao T-F & Chen Y-J (2015). Potential of vitamin D in treating diabetic cardiomyopathy. *Nutrition Research* **35**, 269–279.
- Mandavia CH, Aroor AR, DeMarco VG & Sowers JR (2013). Molecular and Metabolic Mechanisms of Cardiac Dysfunction in Diabetes. *Life Sci* **92**, 601–608.
- Maser RE, Lenhard MJ & Pohlig RT (2015). Vitamin D Insufficiency Is Associated With Reduced Parasympathetic Nerve Fiber Function In Type 2 Diabetes. *Endocr Pract* **21**, 174–181.
- Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF & Turner RC (1985). Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* **28**, 412–419.
- Nagueh SF, Smiseth OA, Appleton CP, Byrd BF, Dokainish H, Edvardsen T, Flachskampf FA, Gillebert TC, Klein AL, Lancellotti P, Marino P, Oh JK, Popescu BA & Waggoner AD (2016). 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. *Journal of the American Society of Echocardiography* **29**, 277–314.
- Nakai H, Takeuchi M, Nishikage T, Lang RM & Otsuji Y (2009). Subclinical left ventricular dysfunction in asymptomatic diabetic patients assessed by two-dimensional speckle tracking echocardiography: correlation with diabetic duration. *European Heart Journal - Cardiovascular Imaging* **10**, 926–932.



Norman PE & Powell JT (2014). Vitamin D and Cardiovascular Disease. *Circulation Research* **114**, 379–393.

Notomi Y, Martin-Miklovic MG, Oryszak SJ, Shiota T, Deserranno D, Popovic ZB, Garcia MJ, Greenberg NL & Thomas JD (2006). Enhanced Ventricular Untwisting During Exercise. *Circulation* **113**, 2524–2533.

Philouze C, Obert P, Nottin S, Benamor A, Barthez O & Aboukhoudir F (2018). Dobutamine Stress Echocardiography Unmasks Early Left Ventricular Dysfunction in Asymptomatic Patients with Uncomplicated Type 2 Diabetes: A Comprehensive Two-Dimensional Speckle-Tracking Imaging Study. *Journal of the American Society of Echocardiography* **31**, 587–597.

Pittas AG, Dawson-Hughes B, Li T, Dam RMV, Willett WC, Manson JE & Hu FB (2006). Vitamin D and Calcium Intake in Relation to Type 2 Diabetes in Women. *Diabetes Care* **29**, 650–656.

Reddy GB, Sivaprasad M, Shalini T, Satyanarayana A, Seshacharyulu M, Balakrishna N, Viswanath K & Sahay M (2015). Plasma vitamin D status in patients with type 2 diabetes with and without retinopathy. *Nutrition* **31**, 959–963.

Roglic G (2016). *Global report on diabetes*. World Health Organization. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

Sade LE, Eroglu S, Bozbaş H, Ozbiçer S, Hayran M, Haberal A & Müderrisoğlu H (2009). Relation between epicardial fat thickness and coronary flow reserve in women with chest pain and angiographically normal coronary arteries. *Atherosclerosis* **204**, 580–585.

Schleithoff SS, Zittermann A, Tenderich G, Berthold HK, Stehle P & Koerfer R (2006). Vitamin D supplementation improves cytokine profiles in patients with congestive heart failure: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Am J Clin Nutr* **83**, 754–759.



Schroten NF, Ruifrok WPT, Kleijn L, Dokter MM, Silljé HH, Lambers Heerspink HJ, Bakker SJL, Kema IP, van Gilst WH, van Veldhuisen DJ, Hillege HL & de Boer RA (2013). Short-term vitamin D3 supplementation lowers plasma renin activity in patients with stable chronic heart failure: An open-label, blinded end point, randomized prospective trial (VitD-CHF trial). *American Heart Journal* **166**, 357-364.e2.

Seferović PM & Paulus WJ (2015). Clinical diabetic cardiomyopathy: a two-faced disease with restrictive and dilated phenotypes. *European Heart Journal* **36**, 1718–1727.

Serrano-Ferrer J, Crendal E, Walther G, Vinet A, Dutheil F, Naughton G, Lesourd B, Chapier R, Courteix D & Obert P (2016). Effects of lifestyle intervention on left ventricular regional myocardial function in metabolic syndrome patients from the RESOLVE randomized trial. *Metabolism* **65**, 1350–1360.

Sugden JA, Davies JI, Witham MD, Morris AD & Struthers AD (2008). Vitamin D improves endothelial function in patients with Type 2 diabetes mellitus and low vitamin D levels. *Diabetic Medicine* **25**, 320–325.

Sunbul M, Bozbay M, Mammadov C, Cincin A, Atas H, Ozsenel EB, Sari I & Basaran Y (2015). Effect of vitamin D deficiency and supplementation on myocardial deformation parameters and epicardial fat thickness in patients free of cardiovascular risk. *Int J Cardiovasc Imaging* **31**, 765–772.

Tabesh M, Azadbakht L, Faghihimani E, Tabesh M & Esmailzadeh A (2015). Effects of Calcium Plus Vitamin D Supplementation on Anthropometric Measurements and Blood Pressure in Vitamin D Insufficient People with Type 2 Diabetes: A Randomized Controlled Clinical Trial. *Journal of the American College of Nutrition* **34**, 281–289.



- Usluogullari CA, Balkan F, Caner S, Ucler R, Kaya C, Ersoy R & Cakir B (2015). The relationship between microvascular complications and vitamin D deficiency in type 2 diabetes mellitus. *BMC Endocr Disord*; DOI: 10.1186/s12902-015-0029-y.
- Waddingham MT, Edgley AJ, Tsuchimochi H, Kelly DJ, Shirai M & Pearson JT (2015). Contractile apparatus dysfunction early in the pathophysiology of diabetic cardiomyopathy. *World J Diabetes* **6**, 943–960.
- Wang C-P, Hsu H-L, Hung W-C, Yu T-H, Chen Y-H, Chiu C-A, Lu L-F, Chung F-M, Shin S-J & Lee Y-J (2009). Increased epicardial adipose tissue (EAT) volume in type 2 diabetes mellitus and association with metabolic syndrome and severity of coronary atherosclerosis. *Clinical Endocrinology* **70**, 876–882.
- Wang L, Song Y, Manson JE, Pilz S, März W, Michaëlsson K, Lundqvist A, Jassal SK, Barrett-Connor E, Zhang C, Eaton CB, May HT, Anderson JL & Sesso HD (2012). Circulating Levels of 25Hydroxy-Vitamin D and Risk of Cardiovascular Disease: A Meta-Analysis of Prospective Studies. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes* **5**, 819–829.
- Wang TJ, Pencina MJ, Booth SL, Jacques PF, Ingelsson E, Lanier K, Benjamin EJ, D’Agostino RB, Wolf M & Vasan RS (2008). Vitamin D Deficiency and Risk of Cardiovascular Disease. *Circulation* **117**, 503–511.
- Wang Z, Zhang Y, Liu W & Su B (2017). Evaluation of Epicardial Adipose Tissue in Patients of Type 2 Diabetes Mellitus by Echocardiography and its Correlation with Intimal Medial Thickness of Carotid Artery. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **337**, a236.
- Wierzbowska-Drabik K, Hamala P & Kasprzak JD (2015). Delayed longitudinal myocardial function recovery after dobutamine challenge as a novel presentation of myocardial dysfunction in



- type 2 diabetic patients without angiographic coronary artery disease. *European Heart Journal - Cardiovascular Imaging* **16**, 676–683.
- Witham MD, Dove FJ, Dryburgh M, Sugden JA, Morris AD & Struthers AD (2010). The effect of different doses of vitamin D3 on markers of vascular health in patients with type 2 diabetes: a randomised controlled trial. *Diabetologia* **53**, 2112–2119.
- Zhang X, Wei X, Liang Y, Liu M, Li C & Tang H (2013). Differential Changes of Left Ventricular Myocardial Deformation in Diabetic Patients with Controlled and Uncontrolled Blood Glucose: A Three-Dimensional Speckle-Tracking Echocardiography–Based Study. *Journal of the American Society of Echocardiography* **26**, 499–506.
- Zhao J-D, Jia J-J, Dong P-S, Zhao D, yang X-M, Li D-L & Zhang H-F (2018). Effect of vitamin D on ventricular remodelling in heart failure: a meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ Open*; DOI: 10.1136/bmjopen-2017-020545.
- Zhen Z, Chen Y, Shih K, Liu J-H, Yuen M, Wong DS-H, Lam KS-L, Tse H-F & Yiu K-H (2015). Altered myocardial response in patients with diabetic retinopathy: an exercise echocardiography study. *Cardiovasc Diabetol*; DOI: 10.1186/s12933-015-0281-5.
- Zhu K, Knuiman M, Divitini M, Hung J, Lim EM, Cooke BR & Walsh JP (2017). Serum 25-hydroxyvitamin D as a predictor of mortality and cardiovascular events: A 20-year study of a community-based cohort. *Clinical Endocrinology* **88**, 154–163.





## TABLES

Table 1. Baseline clinical characteristics.

<b>Demographic characteristics</b>	
Gender M/F	9/11
Age (years)	56.7±7
Weight (kg)	75.8±13
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )	27.9±4.9
Waist circumference (cm)	101.8±15.2
<b>Risk factors</b>	
Smoking <i>n</i> (%)	1 (5)
Hypertension <i>n</i> (%)	12 (60)
Metabolic syndrome <i>n</i> (%)	17 (85)
Diabetes duration (years)	11.30/5.63
<b>Biological parameters <sup>§</sup></b>	
Total cholesterol (g/L)	1.63±0.53
HDL cholesterol (g/L)	0.47±0.12
LDL cholesterol (g/L)	1.10±0.45
Triglycerides (g/L)	1.31±0.57
Fasting glycemia g/L	1.50±0.32
HbA1c %	8.01±1.81
Insulin (mUI/L)	11.29±8.13
HOMA-IR	4.26±3.00
CRP <sub>us</sub> (g/L)	3.36±3.64
Pro-BNP (pg/mL)	19.75±28.72
Creatinine clearance (μmol/L)	92.62±20.61
Albumin (mg/L)	44.55±3.25
Calcium (mM)	2.40±0.11
Phosphorus (mM)	1.14±0.21
PTH (pM)	5.34±2.06
25(OH)D (nM)	32.76±13.71
TSH (mUI/L)	1.73±1.03
<b>Medications</b>	
Antidiabetic drugs <i>n</i> (%)	19 (95)
Insulin <i>n</i> (%)	2 (10)
Antihypertensive drugs <i>n</i> (%)	12 (60)
Antidyslipidemic drugs <i>n</i> (%)	12 (60)
Aspirin <i>n</i> (%)	4 (20)



*CRP*<sub>us</sub>: ultra-sensitive c-reactive protein; *HbA1c*: glycated hemoglobin; *HDL*: high-density lipoprotein; *HOMA-IR*: homeostasis model assessment of insulin resistance; *LDL*: low-density lipoprotein; M/F: males or females; *Pro-BNP*: pro-brain natriuretic peptide; *PTH*: parathyroid hormone; *TSH*: thyroid stimulating hormone.

**Table 2.** Echocardiographic characteristics.

	Baseline	Post-supplementation	P value
<b>2D/TM</b>			
LAV BSA (ml/m <sup>2</sup> )	25.8±10.5	23.6±7.3	0.36
LVEDV BSA (ml/m <sup>2</sup> )	36.2±11.0	37.5±11.1	0.71
LVESV BSA (ml/m <sup>2</sup> )	12.9±4.8	13.7±5.5	0.94
IVSd (mm)	8.2±1.5	8.1±1.0	0.81
PWd (mm)	7.9±1.4	7.9±1.4	0.97
LVmass (g)	127±40	145±49	0.12
LV mass/height (g/m <sup>2.7</sup> )	32.5±8.6	37.5±8.6	0.06
LVEF Simpson (%)	67.5±5.5	68.5±6.1	0.59
EAT (mm)	<b>6.0±2.4</b>	<b>4.8±2.3</b>	<b>0.001</b>
<b>Pulsed Doppler</b>			
E (cm/s)	79.9±18.2	78.8±13.4	0.84
A (cm/s)	83.3±18.6	84.4±15.3	0.89
E/A	0.99±0.31	0.95±0.19	0.52
IVRT (ms)	76.3±16.3	67.1±12.6	0.06
<b>TDI parameters</b>			
s' (cm/s)	7.6±1.2	7.4±1.4	0.59
e' (cm/s)	8.6±2.1	8.4±2.0	0.55
a' (cm/s)	9.9±1.8	9.7±1.7	0.62
E/e' Lat	9.7±2.9	9.7±2.5	0.45

LAV: left atrial volume indexed; LV-ED/-ESV: end-systolic/end-diastolic left ventricle volume indexed; BSA: body surface area; IVSd: end-diastolic interventricular septum thickness; PWd: end-diastolic posterior wall thickness; RWT: relative wall thickness; LVEF: left ventricle ejection fraction; EAT: epicardial adipose tissue; E: mitral flux early diastolic wave; A: mitral flux late diastolic wave; IVRT: isovolumetric relaxation time; s': systolic mitral annulus tissue velocity; e': early diastolic mitral annulus tissue velocity, a': late diastolic mitral annulus tissue velocity.


**Table 3.** Hemodynamic and speckle tracking echocardiography data.

	Baseline		Post-supplementation		P value	
	Rest	DB	Rest	DB	Rest	DB
<b>Longitudinal function</b>						
GLS (%)	-19.3±3.0	-21.5±2.9**	-20.7±3.0	<b>-23.0±3.0***</b>	0.20	<b>0.01</b>
GLSRs (s <sup>-1</sup> )	-1.08±0.27	-2.09±0.34***	-1.15±0.24	<b>-2.24±0.42**</b>	0.48	<b>0.04</b>
GLSRed (s <sup>-1</sup> )	1.21±0.34	1.51±0.31***	1.38±0.37	<b>1.67±0.29***</b>	0.16	<b>0.05</b>
Longitudinal SI-DI (%)	40.1±15.1	19.2±9.2***	45.5±12.0	22.2±14.6***	0.36	0.50
<b>Circumferential</b>						
Mid CS (%)	-19.0±3.5	-20.2±3.6*	-20.3±3.9	<b>-23.1±4.4**</b>	0.12	<b>0.04</b>
Mid CSRs (s <sup>-1</sup> )	-1.12±0.25	-2.18±0.39***	-1.22±0.25	<b>-2.49±0.49***</b>	0.26	<b>0.05</b>
Mid CSRed (s <sup>-1</sup> )	1.28±0.37	1.60±0.47***	1.48±0.44	1.80±0.54***	0.10	0.25
Mid SI-DI (%)	41.4±17.8	30.1±11.4*	46.2±18.4	29.7±10.7**	0.48	0.92
<b>Rotations and Twist mechanics</b>						
Basal rotations (°)	-7.3±3.0	-11.2±2.9***	-8.1±3.9	-11.7±3.8***	0.28	0.52
Apical rotations (°)	13.4±4.8	14.8±4.4	15.6±7.2	<b>21.2±7.2***</b>	0.27	<b>0.002</b>
Twist (1/°)	19.6±4.9	24.7±4.4**	22.1±7.8	<b>31.2±8.0***</b>	0.18	<b>0.001</b>
Twist rate (°/s)	117±27	228±48***	121±37	<b>266±57***</b>	0.73	<b>0.02</b>
Early UntwistR (°/s)	-116±30	-224±63***	-125±44	<b>-277±98***</b>	0.35	<b>0.01</b>
<b>Hemodynamics</b>						
HR (bpm)	74±10	110±5***	73±10	111 ±5***	0.74	0.51
SBP (mmHg)	133±11	139±10**	128±11	142 ±11**	0.15	0.35
DBP (mmHg)	75±10	70±14	77±9	<b>81 ±10**</b>	0.67	<b>0.01</b>
σ <sub>es</sub> (g/cm <sup>2</sup> )	76.6±21.0	52.7±17.7***	72.6±28.9	44.5 ±20.6***	0.79	0.21
ED volume (ml)	68.1±24.1	81.2±29.0*	72.9±28.2	81.6 ±24.4	0.20	0.95

DB: dobutamine; CS: circumferential strain; CSRed: early diastolic circumferential strain rate; CSRs: systolic circumferential strain rate; ED: end-diastolic; GLS: global longitudinal strain; HR: heart rate; LSRed: early diastolic longitudinal strain rate; LSRs: systolic longitudinal strain rate; Mid: papillary muscles level; SBP/DBP: systolic/diastolic blood pressure; SI-DI: strain imaging diastolic index; UntwistR: untwist rate; σ<sub>es</sub>: end-systolic meridional wall stress. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 vs. rest.



FIGURES

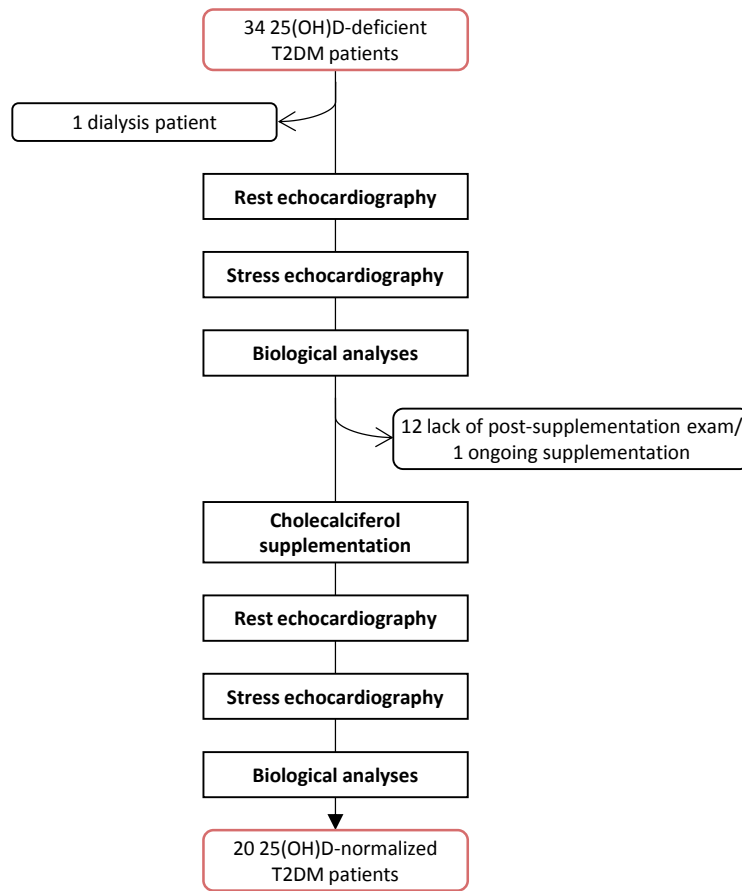


Figure 1. Flow chart of patient's recruitment. T2DM: type 2 diabetic; HR: heart rate.

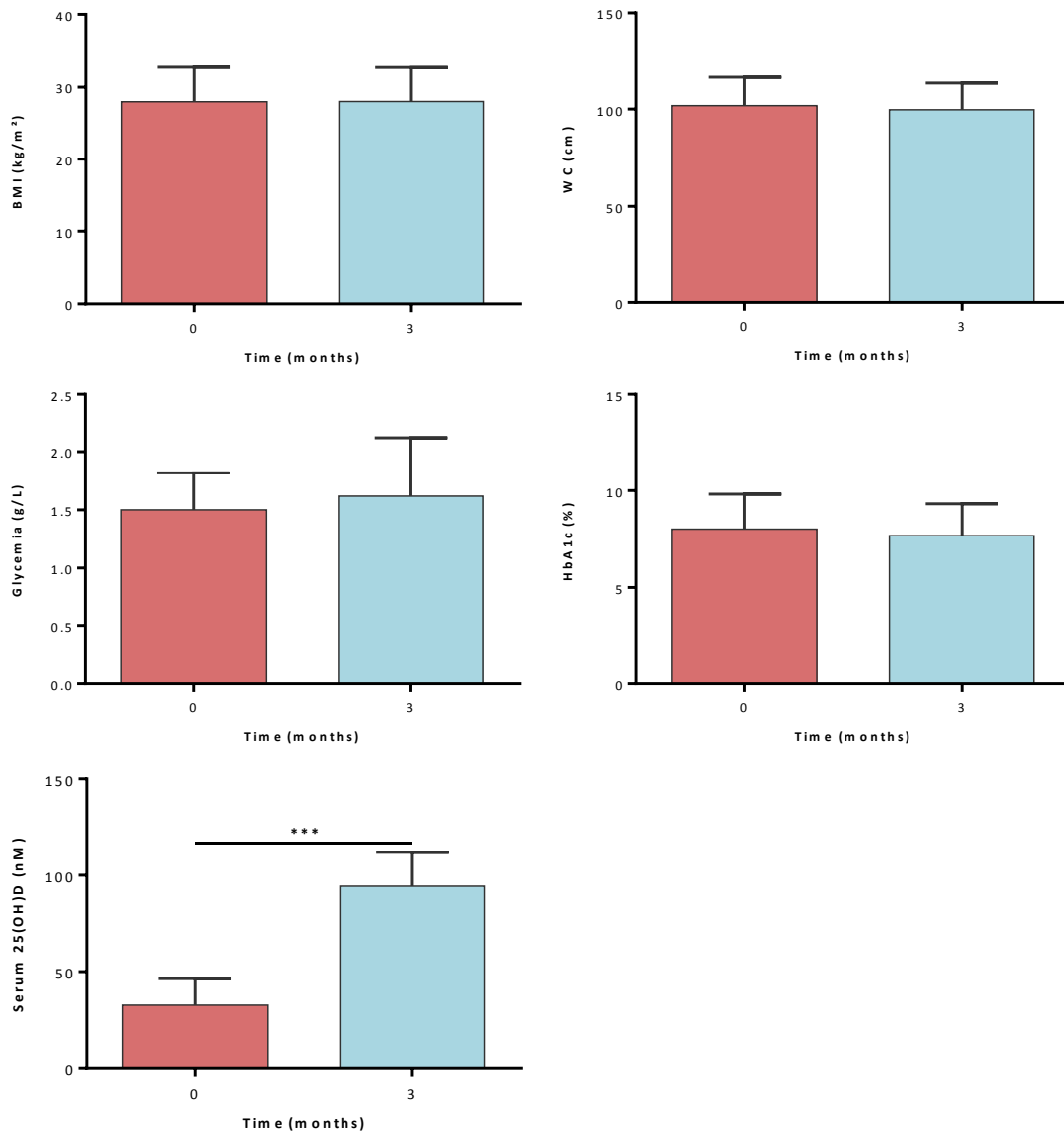


Figure 2. Anthropological and biological indexes, at baseline and after a three-month cholecalciferol supplementation.

BMI: body mass index, HbA1c: glycated hemoglobin, WC: waist circumference. \*\*\*p<0.001

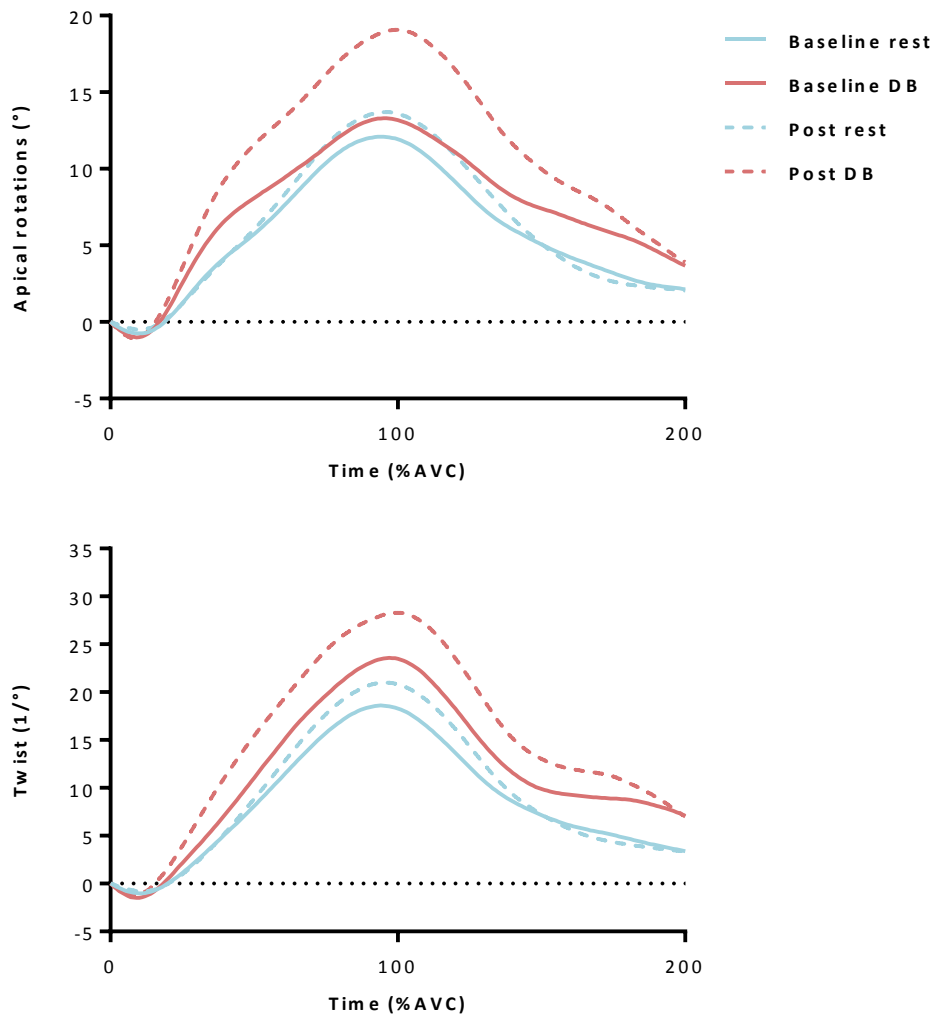


Figure 3. Apical rotation and twist profiles at rest and under dobutamine stress, at baseline and after a three-month cholecalciferol supplementation protocol. AVC: aortic valve closure, DB: dobutamine.







**Vitamin D<sub>3</sub> supplementation alleviates left ventricular dysfunction in a mouse model of diet-induced type 2 diabetes: potential involvement of cardiac lipotoxicity modulation.**

Clothilde Philouze<sup>a</sup>, Jean-Charles Martin<sup>b</sup>, Catherine Riva<sup>a</sup>, Alexandra Marziou<sup>a,b</sup>, Charlène Couturier<sup>b</sup>, Thierry Berton<sup>b</sup>, Julien Astier<sup>b</sup>, Catherine Defoort<sup>b</sup>, Jean-François Landrier<sup>b</sup>, Philippe Obert<sup>a</sup>.

<sup>a</sup> EA4278 LaPEC, Laboratory of Cardiovascular Pharm-Ecology, Avignon University, Avignon, France

<sup>b</sup> Team 1, UMR 1260 INSERM/INRA/AMU Nutrition and Cardiovascular Research Center (C2VN), Aix-Marseille University, Marseille, France

**E-mail addresses:** [clothilde.philouze@gmail.com](mailto:clothilde.philouze@gmail.com), [jean-charles.martin@univ-amu.fr](mailto:jean-charles.martin@univ-amu.fr),  
[catherine.riva@univ-avignon.fr](mailto:catherine.riva@univ-avignon.fr), [alexandra.marziou@gmail.com](mailto:alexandra.marziou@gmail.com), [charlene.couturier@univ-amu.fr](mailto:charlene.couturier@univ-amu.fr),  
[julien.astier@univ-amu.fr](mailto:julien.astier@univ-amu.fr), [catherine.defoort@univ-amu.fr](mailto:catherine.defoort@univ-amu.fr), [jean-francois.landrier@univ-amu.fr](mailto:jean-francois.landrier@univ-amu.fr),  
[philippe.obert@univ-avignon.fr](mailto:philippe.obert@univ-avignon.fr).

**Corresponding author:** Pr. P Obert. University of Avignon, Faculty of Sciences, 301 rue Baruch de Spinoza, 84916 Avignon Cedex 9, France. Email: [philippe.obert@univ-avignon.fr](mailto:philippe.obert@univ-avignon.fr) , Tel: +33 4 90 16 29 49, Fax: +33 4 90 16 29 01



## ABSTRACT

**Background** – Hypovitaminosis D is highly prevalent in type 2 diabetic (T2DM) patients and has been associated with cardiovascular diseases. Previous studies in rodent models of streptozotocin-induced type 1 diabetes have demonstrated that vitamin D supplementation could improve cardiac function and impede adverse remodeling. However, studies in diet-induced T2DM models are still dramatically lacking. Among the various pathophysiological processes involved in diabetic cardiomyopathy (DMCM) development, lipotoxicity triggers myocardial impairments by disturbing a broad range of intracellular processes. However, no data is available regarding the effects of a vitamin D supplementation on cardiac lipid profile. We aimed therefore to evaluate the effectiveness of vitamin D<sub>3</sub> supplementation, in secondary prevention, on cardiac remodeling and function, as well as lipid profile, in a mouse model of diet-induced T2DM.

**Methods** – Mice were fed a high fat and sucrose (HFS) diet for 10 weeks. Afterwards, HFS diet was maintained for 15 more weeks and 2 groups were formed, with (DM+D) and without (DM) cholecalciferol supplementation. A control (CTRL) group was fed with normal chow all along the study protocol. Glucose homeostasis, using insulin tolerance tests, and cardiac function by echocardiography including deformation imaging, were assessed at baseline and at the 10<sup>th</sup> and 24<sup>th</sup> weeks of the protocol. Animals were sacrificed at the 10<sup>th</sup> and 25<sup>th</sup> weeks for plasma and cardiac sample analysis. Cardiac lipid profile was characterized by liquid chromatography tandem mass spectrometry.

**Results** – After 10 weeks of HFS diet, DM mice exhibited pre-diabetes, mild LV hypertrophy (LVM +13% vs. CTRL, p<0.05) and impaired longitudinal strain (LS -20% vs. CTRL, p<0.001), but preserved myocardial circumferential as well as global diastolic and systolic cardiac functions. After 15 more weeks of HFS diet, DM animals presented with type 2 diabetes, concentric cardiac hypertrophy (LVM +31% vs. CTRL, p<0.001) and impaired regional (LS -28% and CS -18% vs. CTRL, p<0.001) and global



(fractional shortening, FS -16% vs. CTRL,  $p < 0.001$ ) cardiac function. Cholecalciferol supplementation had no effect on glucose homeostasis, but improved cardiac remodeling (LVM -12% vs. DM,  $p < 0.001$ ) and regional (LS +37% and CS + 27% vs. DM,  $p < 0.001$ ) as well as global (FS +16% vs. DM,  $p < 0.001$ ) cardiac function. After 25 weeks of protocol, DM mice exhibited increased myocardial levels of ceramides (Cer. +23% vs. CTRL,  $p < 0.01$ ) and diacylglycerol (DAG +18% vs. CTRL,  $p < 0.001$ ), both of which were normalized by vitamin D<sub>3</sub> supplementation (Cer. -11% vs. DM,  $p < 0.05$ ; DAG -25%,  $p < 0.01$  vs. DM).

**Conclusions** – This work brought to light the beneficial effects of cholecalciferol supplementation, in secondary prevention, on cardiac remodeling and function in a mouse model of diet-induced T2DM. Those cardioprotective effects may be, at least in part, explained on account of the modulation of myocardial levels of lipotoxic species such as ceramides and DAG by vitamin D.

**Keywords:** diet-induced type 2 diabetes, echocardiography, strain, regional myocardial function, vitamin D, cardiac lipid profile, lipotoxicity, liquid chromatography tandem mass spectrometry.

**Abbreviations:** *Cer.* ceramides, *CS* circumferential strain, *CTRL* control group, *DAG* diacylglycerols, *DM* diabetic group, *DMCM* diabetic cardiomyopathy, *DM+D* cholecalciferol-supplemented diabetic group, *EF* ejection fraction, *FS* fractional shortening, *HFS* high fat and sucrose, *LVM* left ventricle mass, *LS* longitudinal strain, *RWT* relative wall thickness, *TG* triglycerides, *T2DM* type 2 diabetes.



## 1 INTRODUCTION

2           Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is a global pandemic whose prevalence is increasing  
3 worldwide, with an expectation of 642 million diabetic patients by 2040 (International Diabetes  
4 Federation, 2017b). The leading cause of morbidity and mortality, as well as the most frequent  
5 complication observed in T2DM patients, is diabetic cardiomyopathy (DMCM) (Waddingham *et al.*,  
6 2015). The pathophysiological process is thought to set up as soon as the onset of diabetes,  
7 emphasizing the importance of early diagnosis and therapeutic intervention (Waddingham *et al.*,  
8 2015).

9           The etiology of DMCM is not fully understood yet but growing evidence suggest a pivotal role  
10 of cardiac lipotoxicity (Ouwens *et al.*, 2005; van der Meer *et al.*, 2008; Hammer *et al.*, 2008).  
11 Transgenic models designed to increase myocardial lipid content have consistently reported  
12 impairments in cardiac function, especially as a result of increased cytotoxic derived, such as  
13 ceramides and diacylglycerols (Christoffersen *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2009; Glenn *et al.*, 2011). A  
14 major concern with genetically modified models is however the induction of massive lipid storage at  
15 non-physiological levels. Various high fat diets (HFD) have been employed in rodent models and  
16 recapitulate faithfully the etiology of and risk factors associated with T2DM in humans. It is however  
17 still unclear whether HFD is sufficient to induce cardiac dysfunction in rodents. While some studies  
18 reported depressed global systolic function estimated from left ventricular (LV) shortening fraction  
19 (FS) and/or ejection fraction (EF) in mice or rats (Park *et al.*, 2005; Ouwens *et al.*, 2007; Nagarajan *et al.*,  
20 2013; Ternacle *et al.*, 2017), others did not (Rennison *et al.*, 2009; Calligaris *et al.*, 2013; Brainard  
21 *et al.*, 2013; Roberts *et al.*, 2015). Discrepancies may partly arise from regimen duration, longitudinal  
22 studies having reported adverse effects on cardiac function consecutive to long-term HFD only (Park  
23 *et al.*, 2005; Ternacle *et al.*, 2017), although this is not unanimous (Calligaris *et al.*, 2013). Other  
24 reasons come very likely from the fact that only indexes of global systolic function (e.g. FS and/or EF)  
25 were measured, the latter being often depressed only at an advanced stage of cardiac disease.



26 Deformation imaging is able to reveal subtle regional myocardial abnormalities at an early stage  
27 before overt cardiac dysfunction. Recently, Ternacle *et al.* (2017) reported impairments of radial  
28 systolic strain rate assessed by tissue Doppler imaging in mice on HFD, as early as the 5<sup>th</sup> week, when  
29 LVEF and FS were still normal. Longitudinal (LS) and circumferential (CS) strains are major  
30 components of LV myocardial mechanics and chamber performance. In TD2M patients, alteration in  
31 longitudinal function usually precedes that of circumferential one, at time when radial strains are  
32 generally not affected (Ng *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2013). To our knowledge, no data is today  
33 available on LS and CS in the time course of HFD in rodent models. To what extent HFD is able to  
34 major cardiac lipid content and how this affect myocardial function is also poorly documented in  
35 rodents. Hankiewicz *et al.* (2010) fed transgenic mice predisposed to cardiac steatosis and wild type  
36 littermates with a high-fat regimen for 2 weeks. Alterations in radial strains by MRI occurred only in  
37 the transgenic model, on account of major intramyocardial lipid accumulation. Of note, HFD was  
38 maintained on a very short-term period and further studies over long-time exposure are needed,  
39 especially in non-genetically modified models.

40 Beyond its canonical role in skeletal health through calcium and phosphorus metabolism  
41 regulation, *in vitro* and *in vivo* studies have demonstrated that vitamin D can exert major effects on  
42 cardiovascular physiological processes. By its regulating properties of calcium homeostasis, cell  
43 proliferation, renin-angiotensin system, immunity and inflammation, vitamin D has indeed the  
44 potential to prevent the progression of myocardial hypertrophy, fibrosis and dysfunction (Xiang *et al.*  
45 *et al.*, 2005; Rahman *et al.*, 2007; Tishkoff *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2016). Of note,  
46 hypovitaminosis D is highly prevalent in T2DM patients, and low serum calcidiol has been associated  
47 with the development of T2DM, as well as with adverse cardiovascular events and depressed  
48 regional myocardial function in the diabetic population (Afzal *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2014; Heidari  
49 *et al.*, 2015; Zhu *et al.*, 2017). In experimental animals, our understanding of the specific vitamin D-  
50 induced cardiac effect originates mainly from transgenic mice (e.g. vitamin D receptor knockout



51 mice) (Green *et al.*, 2006; Tishkoff *et al.*, 2008) or in the context of diabetes from streptozotocin-  
52 induced type 1 diabetic rats (Lee *et al.*, 2014b; Wang *et al.*, 2014a; Wei *et al.*, 2017; Zeng *et al.*,  
53 2017). In the diet-induced T2DM model, only one study is to our knowledge currently available and  
54 examined the effect of vitamin D supplementation on cardiac remodeling (Mazzone *et al.*, 2018). The  
55 authors demonstrated that vitamin D dietary supplementation for 6-months could prevent cardiac LV  
56 hypertrophy and reduce fibrosis. However, irrespective of the absence of functional data, the latter  
57 study investigated the effects of primary prevention, since rats from the treated group were  
58 supplemented from the beginning of the protocol. Data regarding the efficiency of vitamin D  
59 supplementation in impeding the progression of DMCM in secondary prevention in a T2DM  
60 phenotype are then still dramatically lacking, as well as data regarding the effects of vitamin D  
61 supplementation on cardiac lipid profile.

62 Therefore, the first aim of this study was to assess the impact of cholecalciferol  
63 supplementation, in secondary prevention, on cardiac remodeling, as well as global and regional  
64 function, in a mouse model of diet-induced T2DM. The second aim was to characterize the effect of  
65 this intervention on myocardial lipid profile.

## 66 **METHODS**

### 67 **Animals**

68 Six-week old male C57Bl/6Jrj mice were purchased from Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle,  
69 France). Animals were housed in a room under controlled conditions (temperature  $21\pm 1^\circ\text{C}$ , humidity  
70 level  $60\pm 10\%$ , 12h light/dark cycle). All procedures meet European parliamentary guidelines  
71 2010/63/EU (N°CEEA-00322.03) and were approved by the local ethics committee (approval number  
72 2017071209197796-OBERT).



### 73 **Experimental groups and protocol**

74 At 10 weeks of age, mice were randomly assigned into either the control (CTRL) group or the  
75 diabetic (DM) group. The CTRL mice were fed with standard rodent chow (A04, SAFE Diets, Augy,  
76 France) and tap water for 25 weeks. The DM group was fed with high fat dough (60% of energy  
77 intake from fat) (HF230, SAFE Diets, Augy, France) and 10% sucrose-added tap water for 10 weeks  
78 (HFS diet) to induce type 2 diabetes. After this 10-week HFS diet, mice of the DM group were  
79 subdivided and either kept on with the HFS diet for the 15 following weeks or were assigned to a  
80 third group (DM+D group) fed with the HFS diet supplemented with 15,000 IU/kg cholecalciferol  
81 (customized HF230, SAFE Diet, Augy, France) for the 15 following weeks.

82 Mice follow-up included weekly weighing, as well as glucose homeostasis assessment and  
83 echocardiography at baseline, at the 10<sup>th</sup> week (before supplementation starts) and at the 24<sup>th</sup> week.  
84 Animals were sacrificed at the 10<sup>th</sup> and 25<sup>th</sup> weeks of the protocol for biochemical assessments (see  
85 “Animals sacrifice” subsection).

### 86 **Glucose homeostasis**

87 Glucose homeostasis and diabetic state were evaluated by fasting glycemia (at baseline and  
88 at the 10<sup>th</sup> and 24<sup>th</sup> weeks of protocol) and intra-peritoneal insulin tolerance test (IPITT) (at the 10<sup>th</sup>  
89 and 24<sup>th</sup> weeks of protocol). Mice were fasted for 6 hours (8 a.m.-2 p.m.) before assessments. Fasting  
90 glycemia was measured using commercially available glucose meter (CareSens N™, Dinno Santé,  
91 Bussy-Saint-Georges, France) from a blood drop obtained by slight incision of the locally anesthetized  
92 tail (lidocaine Biogaran, Colombes, France). IPITT was then initiated by intraperitoneal injection of 1  
93 IU/kg insulin and glycemia was measured 10, 30, 60, 90 and 120 minutes after injection. Area under  
94 curve (AUC) was calculated.



## 95 **Echocardiography**

96 Echocardiographic assessment was performed using a Vevo 3100™ imaging system (Fujifilm  
97 VisualSonics, Toronto, Canada) equipped with the MX550D™ probe (22-55 MHz). Images were  
98 analyzed post-processing using the VevoLab™ software and strain analysis was performed with the  
99 VevoStrain™ software (Fujifilm VisualSonics, Toronto, Canada).

100 Mice anesthesia was induced with 4% isoflurane (IsoFlo™, Zoetis, Parsippany, United-States)  
101 in medical air mix (22% O<sub>2</sub>, 78% N<sub>2</sub>) (Air Liquide, Paris, France), ventilated at 1L/min, and then  
102 maintained with 1.5% isoflurane after effective sleep. Animals were placed in a supine position on a  
103 heating pad and their body temperature was monitored throughout the exam, as well as theirs  
104 breathing rate and electrocardiogram.

105 End-diastolic and end-systolic LV diameters (LVDD and LVDs, respectively) as well as anterior  
106 and posterior wall thicknesses (AW and PW, respectively) were measured from M-mode  
107 echocardiograms on a parasternal long-axis (PSLAX) view. Ejection fraction, fractional shortening  
108 ( $FS=100 \times [(LVDD-LVDs)/LVDD]$ ), relative wall thickness ( $RWT= (AW+PW)/LVDD$ ) and LV mass  
109 ( $LVM=1,053 \times [(LVDD+PWd+AWd)^3-LVDD^3]$ ) were then calculated. Early (E) and late (A) mitral inflow  
110 peak velocities were obtained from an apical view using pulsed Doppler and E/A ratio was calculated.

111 Two-dimensional cine loops were recorded in PSLAX and parasternal short-axis (PSAX, at the  
112 papillary muscle level) views for strain and strain rate (SR) analysis in longitudinal and circumferential  
113 dimensions, respectively.

114 All measurements were averaged from the 3 cardiac cycles displaying the best image quality.

## 115 **Animals sacrifice**

116 Mice were sacrificed after an overnight fasting. Animals were firstly anesthetized with 4%  
117 isoflurane in medical air mix. Total blood volume was sampled by intracardiac puncture on





118 heparinized syringe (S-Monovette® 1,2mL Hep-Li, Sarstedt, Nümbrecht, Germany) and centrifuged  
119 for 10 min at 3,000g and 4°C, plasma was then aliquoted and stored at -80°C before analysis. Mice  
120 were then dislocated and heart was quickly harvested and washed in a cold Krebs solution (NaCl  
121 118,29 mM, KCl 4,70 mM, MgSO<sub>4</sub> 1,2 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, glucose 11,10 mM, CaCl<sub>2</sub>  
122 1,25 mM). After weighing, heart was either fixed in formaline (Merck KGaA, Darmstedt, Germany) or  
123 snap frozen in liquid nitrogen (Air Liquide, Paris, France) after ventricles dissection. Adipose tissues  
124 and spleen were then weighed and tibia length was measured. Spleen hypertrophy, an indicator of  
125 major systemic inflammation, was used as exclusion criterion. The cardiac mass/tibia length ratio was  
126 calculated and used as an index of cardiac hypertrophy. Formaline fixed samples were washed in  
127 saline phosphate buffer (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> et 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 24h after  
128 sacrifice, and then stored at 4°C in 70% ethanol.

### 129 **Blood analyses**

130 Plasma triglycerides (TG), Ca<sup>2+</sup> and glucose were assayed using colorimetric kits (BIOLABO,  
131 Maizy, France), as were non-esterified fatty acids (NEFA) (RANDOX, Crumlin, United-Kingdom).  
132 Insulin was measured using the mouse ultrasensitive Insulin ELISA kit (ALPCO, Salem, United-States),  
133 and cholecalciferol as well as calcidiol were assayed using liquid chromatography tandem mass  
134 spectrometry (Hypersil GOLD® C18 column, Orbitrap™ Q Exactive™ Plus system and Xcalibur™  
135 software, ThermoFisher Scientific, Waltham, United-States), as previously described (Bonnet *et al.*,  
136 2018). The homeostasis model assessment of insulin resistance index was then calculated (HOMA-IR  
137 = glycemia x plasma insulin /22.5).

### 138 **Cardiac lipid profile**

139 Cardiac lipids were firstly extracted by double methyl tert-butyl ether (MTBE) extraction from  
140 a 20mg LV sample. Briefly, samples were grounded in liquid nitrogen and then added with 0.2 mL  
141 saline phosphate buffer, 1.5mL methanol, 5mL MTBE and 1.25mL deionized water. After 1h stirring



142 and 10 min centrifugation at 1000 rpm and 10°C, the upper, lipid phase was removed and reserved.  
143 Then the second extraction was carried out on the lower phase of the liquid, with 2 mL of a  
144 methanol/MTBE/H<sub>2</sub>O mixture (10/3/2.5, v/v/v). After a 10 min stirring and another centrifugation,  
145 the upper phase was pipetted and added to the previously removed phase. Finally, a dry extract was  
146 obtained after evaporation.

147 After addition of 200µl of a CHCl<sub>3</sub>/methanol/H<sub>2</sub>O (60/30/4.5, v/v/v) mixture to the dry  
148 extract, cardiac lipid profile semi-quantitative analysis was performed by liquid chromatography  
149 tandem mass spectrometry (Accucore™ 02 C18 column, Orbitrap™ Q Exactive™ Plus system and  
150 Xcalibur™ software, ThermoFisher Scientific, Waltham, United-States). The analyses were carried on  
151 with an injection volume of 2µL and the flow-rate was set to 0.4mL/min. The mobile phase was  
152 composed of A (acetonitrile (ACN)/H<sub>2</sub>O, 60/40 + 0.1% HCOOH + 10mM ammonium formate (AF)) and  
153 D (isopropyl alcohol/ACN, 90/10 + 0.1% HCOOH + 10mM AF), column-reconditioning phase was B  
154 (ACN 100, 0.1% AF).

155 A quantitative assay of cardiac TG was also performed using a colorimetric kit (BIOLABO,  
156 Maizy, France), after addition of 25µL of NP-40 4% to the dry extract.

### 157 **Fibrosis**

158 Upcoming protocol.

### 159 **Statistical analysis**

160 Statistical analysis was performed using IBM SPSS statistics 20.0™ software (IBM Corp., USA).  
161 Values are expressed as mean±SEM, otherwise specified. Statistical significance was defined as p  
162 value<0.05 and Normality was assessed using Shapiro-Wilk test. The effects of HFS diet and vitamin D  
163 supplementation on follow-up biological and echocardiographic variables were tested using a linear  
164 mixed-effect model (GLM) with group and time (e.g. baseline, 10<sup>th</sup> and 25<sup>th</sup> weeks of protocol) as



165 fixed effects. In case of significant interaction between time and group, analyses were further  
166 conducted within each group using GLM, with Bonferroni post-hoc test. At each time period, a  
167 generalized linear model was use for group comparison. Heart rate (HR) was introduced as covariate,  
168 when appropriate.

## 169 RESULTS

### 170 Vitamin D supplementation does not impede HFS diet-induced metabolic abnormalities and 171 increase in visceral fat mass.

172 Mice weight increased significantly during follow-up in the 3 groups, but gains were more  
173 pronounced for DM compared to CTRL groups ( $p < 0.001$ ). After 10 weeks of HFS diet, mice exhibited  
174 increased visceral fat (epididymal fat mass: +249%,  $p < 0.001$ , figure 1A) as well as altered insulin  
175 sensitivity, as reflected by significantly higher HOMA-IR and IPITT AUC values in DM than CTRL mice,  
176 although fasting glycemia only tended ( $p = 0.064$ ) to increase (figure 1B). TG significantly increased  
177 also in DM mice compared to CTRL littermates but no inter-group differences were noticed for  
178 plasma NEFA (figure 1C). After 25 weeks of HFS diet, mice displayed a well-established type 2  
179 diabetic profile, characterized by fasting hyperglycemia and impaired insulin sensitivity, as evidenced  
180 by dramatic increases in HOMA-IR and IPITT AUC (figure 1B). However, plasma TG and NEFA did not  
181 differ between DM and CTRL mice (figure 1C).

182 Fifteen weeks of cholecalciferol supplementation in mice fed a HFS diet had no impact on the  
183 aforementioned changes in body weight, visceral fat mass or glucose homeostasis indexes in DM  
184 mice (figure 1A & B), except for plasma NEFA which were significantly reduced in DM+D mice  
185 compared to both CTRL and DM littermates (figure 1C). Vitamin D<sub>3</sub> supplementation efficiently  
186 increased cholecalciferol and 25(OH)D<sub>3</sub> plasma levels, without altering Ca<sup>2+</sup> levels compared to the  
187 DM mice (figure 1D).



188 **Vitamin D supplementation in DM mice alleviates cardiac remodeling and regional myocardial**  
189 **dysfunction.**

190 From GLM analysis, a significant interaction between time and group was obtained for all  
191 cardiac remodeling and function variables; their evolution throughout the protocol is further detailed  
192 below. Of note, no inter-group differences were noticed at baseline (figures 2 and 3).

193 Regarding cardiac remodeling, LVM increased significantly after 10 weeks of HFS diet  
194 compared to baseline for all groups (DM +36%,  $p<0.01$ ; DM+D +27%,  $p<0.01$ ; figure 2A). At the 10<sup>th</sup>  
195 week, DM animals exhibited a slight, but significant, increment in LVM compared to CTRL (+13%,  
196  $p<0.05$ , figure 2A). In contrast, no differences were noticed for heart weight/tibia length ratio (figure  
197 2B). RWT did not change from baseline to 10 weeks for both groups, and was not affected by the HFS  
198 regimen (figure 2A). Global systolic and diastolic (figure 3A and B) function did not differ between  
199 mice fed a HFS or normal chow diet for 10 weeks and no differences with baseline values were  
200 noticed for the 2 groups. However, the 2D-strain analysis revealed as early as the 10<sup>th</sup> week a  
201 significant impairment in longitudinal regional myocardial function, as revealed by reduced LS of 21%  
202 compared to the CTRL group and of 14% compared to baseline ( $p<0.05$ , figure 3C). In contrast,  
203 circumferential function appeared well preserved (figure 3C).

204 After 25 weeks of HFS diet, the DM mice presented with concentric hypertrophy,  
205 characterized by increased LVM and heart weight/tibia length ratio, associated with a majored RWT  
206 (+42% vs. CTRL mice and +39% vs. 10<sup>th</sup> week,  $p<0.001$ ) (Figure 2A & B). Of note, CTRL mice also  
207 exhibited increased LVM at the end of follow-up (+21 % compared to baseline,  $p<0.05$ ) (figure 2A).  
208 Consecutive to 25 weeks of HFS diet, DM mice presented with reduced FS ( $p<0.001$ ) when compared  
209 to CTRL littermates, while no differences were reported for EF (Figure 3A). The same results were  
210 obtained for global diastolic function, with similar E/A values between DM and CTRL mice. Opposite  
211 to global indexes, major impairments in regional myocardial function were however noticed. Indeed,



212 LS were further depressed and CS were now significantly reduced in DM mice compared to CTRL  
213 ones (Figure 3C). Furthermore, longitudinal as well as circumferential systolic and diastolic SR were  
214 also significantly impaired in DM mice at the 25<sup>th</sup> week, indicative of both regional LV systolic and  
215 diastolic abnormalities (Figure 3D).

216 Fifteen weeks of cholecalciferol supplementation significantly affected cardiac remodeling  
217 and reduced hypertrophy in mice fed a HFS diet. The heart weight/tibia length ratio was indeed at an  
218 intermediate level compared to the 2 other groups, being significantly different neither from that of  
219 the CTRL nor the DM animals (figure 2B). Furthermore, even if LVM was higher in DM+D compared to  
220 CTRL mice ( $p<0.001$ ), it was also significantly reduced ( $p<0.001$ ) when compared to DM counterparts  
221 at the 25<sup>th</sup> week of follow-up (figure 2A). Interestingly, the DM+D mice did not exhibit a concentric  
222 pattern, in contrast to their DM littermates (figure 2A). Fifteen weeks of vitamin D supplementation  
223 not only improved E/A ratio ( $P<0.05$ ) but restored FS as well as LV deformation imaging indexes  
224 (figure 3A, C, D).

#### 225 **Cholecalciferol supplementation reduces cardiac lipotoxicity in DM mice.**

226 At the 10<sup>th</sup> week of protocol, DM mice exhibited significantly increased myocardial levels of  
227 ceramides (+39%,  $p<0.01$ ) and other sphingolipids (+45%,  $p<0.001$ ), as well as cholesteryl esters  
228 (+65%,  $p<0.001$ ) compared to their CTRL littermates (figure 4A). In contrast, DAG levels appeared to  
229 be decreased (-19%,  $p<0.01$ ). No changes were observed regarding the prenols and  
230 glycerophospholipids subclasses, nor the TG.

231 After 25 weeks of HFS diet, the increases in cholesteryl esters, ceramides and other  
232 sphingolipids were sustained (figure 4B). Opposite to the 10<sup>th</sup> week, DAG levels raised now at  
233 significantly higher levels in DM compared to CTRL mice (+18% vs. CTRL,  $p<0.001$ ). TG, prenols and  
234 glycerophospholipids levels remained unchanged.



235 Cholecalciferol supplementation in mice fed a HFS diet normalized DAG and ceramides (-25%  
236 and -11% vs. DM,  $p < 0.001$  and  $p < 0.01$ , respectively), and decreased cholesterol levels, although the  
237 latter was not significantly increased in the DM group compared to the CTRL one (figure 4B).  
238 Cholecalciferol had however no effect on other sphingolipids or cholesteryl esters.

## 239 DISCUSSION

240 The two major findings from the present work are 1) the cardioprotective effects of vitamin  
241  $D_3$  in secondary prevention in T2DM with nascent cardiomyopathy and 2) the potential regulating  
242 effect of cholecalciferol on myocardial levels of two major lipotoxic species, ceramides and DAG.  
243 Figure 5 summarizes the main findings of this study.

244 Understanding the early phases of DMCM is of paramount importance in order to prevent  
245 the progression to adverse remodeling and overt cardiac dysfunction. To this end, experimental  
246 models have been developed and have pointed out a pivotal role of cardiac adiposity, and more  
247 specifically of the two major lipotoxic species ceramides and DAG (Christoffersen *et al.*, 2003; Liu *et al.*,  
248 2009; Glenn *et al.*, 2011). In the present study, a diet-induced diabetes model was preferred to  
249 transgenic models for it replicates the etiology of T2DM and its associated risks factors in a more  
250 physiological way. In such models, whether high-fat diet induces cardiac dysfunction remains  
251 conflicting (Park *et al.*, 2005; Ouwens *et al.*, 2007; Rennison *et al.*, 2009; Nagarajan *et al.*, 2013;  
252 Calligaris *et al.*, 2013; Brainard *et al.*, 2013; Roberts *et al.*, 2015; Ternacle *et al.*, 2017), on account  
253 likely to differences in regimen duration as well as in methodologies to evaluate cardiac function.  
254 Moreover, to what extent high-fat diet is able to major cardiac lipid content and impact cardiac lipid  
255 profile and how this may affect cardiac function remains poorly documented. The originality of  
256 present study was to concomitantly investigate cardiac remodeling, function and lipid profile in the  
257 time-course of T2DM development. Indeed, in our model, 10 weeks of HFS diet induced a pre-  
258 diabetic state, characterized by a blunted insulin sensibility and moderate hyperglycemia, associated



259 with general and visceral obesity. After 25 weeks of HFS diet, T2DM was however well-established, as  
260 reflected by marked hyperglycemia and pronounced insulin resistance. At the pre-diabetic state, DM  
261 mice presented with no frank cardiac hypertrophy and preserved global function. However,  
262 underpinning the precocity of DMCM onset, an early-stage regional myocardial dysfunction was  
263 noticed, as evidenced by decreased LS. Of note, circumferential function appeared at this stage not  
264 depressed. In contrast, after 25 weeks of HFS regimen, MD mice displayed adverse cardiac  
265 remodeling, characterized by LV concentric hypertrophy, together with mild alteration of systolic  
266 global function (e.g. slightly reduced FS: -6% vs CTRL, but preserved EF) but major impairments in  
267 both systolic and diastolic longitudinal as well as circumferential myocardial function. Our  
268 observations regarding global systolic function are line with previous studies in similar rodent  
269 models, which for the most part did not demonstrate impairments after short-term high-fat regimen  
270 (Park et al., 2005; Roberts et al., 2015; Ternacle et al., 2017). Results after long-term HFS regimen are  
271 more controversial, nevertheless some previous studies reported also preserved or only mildly  
272 decreased function, agreeing with our data (Calligaris *et al.*, 2013; Brainard *et al.*, 2013). To the best  
273 of our knowledge, only Ternacle *et al.* (Ternacle *et al.*, 2017) performed conventional and  
274 deformation imaging echocardiography in mice in the time-course of a long-term high-fat regimen. In  
275 accordance with our data, only regional myocardial was affected in the early stage (5<sup>th</sup> week), as  
276 reflected by significantly reduced TDI-derived radial strain rate, while FS and or EF were normal.  
277 Radial function was further depressed at 20 weeks, and mice displayed LV hypertrophy along with  
278 reduced EF, the latter observation contrasting with our findings. To our knowledge, the present study  
279 is then the first to report altered regional systolic function with preserved EF in a mouse model of  
280 long-term diet-induced T2DM. Interestingly, the evolution of mice cardiac functional impairments we  
281 observed during the time-course of T2DM development is similar with findings from clinical studies.  
282 Indeed, the decreased LS with preserved CS and EF we found in our pre-diabetic animals was  
283 previously reported in asymptomatic T2DM patients with a fairly well-controlled glycemia (Zhang *et*



284 *al.*, 2013). And similarly to our T2DM mice after 25 weeks of protocol, cardiac concentric hypertrophy  
285 associated with blunted both LS and CS but preserved EF is a typical pattern in patients exhibiting  
286 more advanced T2DM and poor glycemic control (Nakai *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2013; Tadic *et al.*,  
287 2015; Seferović & Paulus, 2015; Enomoto *et al.*, 2016).

288 Cardiac adiposity after such a high-fat diet protocol is frequently evaluated through  
289 myocardial lipid droplets or TG quantification, and data are sparser regarding cardiac lipid profile  
290 characterization, and more specifically DAG and ceramides. An increase in cardiac lipid droplets or TG  
291 content following an high-fat diet protocol in mice has previously been observed (Liu *et al.*, 2011;  
292 Roberts *et al.*, 2015), however, this finding is not unanimously reported and it would seem that TG  
293 levels are found to be increased only transiently after the first weeks of diet (Zhang *et al.*, 2011;  
294 Harasim *et al.*, 2015). The stability of myocardial TG levels we observed at both the 10<sup>th</sup> and 25<sup>th</sup>  
295 weeks of regimen is indeed in line with previous studies (Zhang *et al.*, 2011; Aurich *et al.*, 2013).  
296 Regarding other lipid species, after 10 weeks of HFS diet, our results are in line with a previous study  
297 performed using liquid chromatography tandem mass spectrometry (Park *et al.*, 2013) regarding  
298 ceramides and other sphingolipids, however, they stand out regarding DAG levels, which are found  
299 to be unexpectedly decreased. Because the aforementioned work also used a diet with 60% kcal from  
300 fat, the discrepancy with our results may originate from the different times of evaluation: 10 weeks  
301 in the present study versus 16 weeks for Park *et al.*. After 25 weeks of regimen, our results are  
302 indeed in accordance with theirs, indicating an important evolution of DAG levels in the time course  
303 of the protocol, underlying the importance of taking into account the time of measurement when  
304 interpreting such results. Even if we cannot clearly establish a link between myocardial lipid profile  
305 and regional myocardial dysfunction in the present study, we can nevertheless suspect an  
306 involvement of the increased levels of lipotoxic species in the etiology of the observed impairments.  
307 Indeed, if previous studies had reported a link between myocardial TG accumulation and altered  
308 cardiac function, it rather seems that TG accumulation is not deleterious *per se*. Indeed, as





309 demonstrated by Hankiewicz *et al.*, cardiac systolic function alterations occur in case of major  
310 intramyocardial lipid accumulation (Hankiewicz *et al.*, 2010). Up to a certain threshold, this  
311 phenomenon would in fact be protective by allowing a decrease in cytosolic levels of lipotoxic  
312 species such as ceramides and diacylglycerols (DAG), as demonstrated in transgenic mouse models or  
313 *in vitro* assays (Listenberger *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2009; Hankiewicz *et al.*, 2010). As a matter of fact,  
314 both ceramides and DAG accumulation have been linked to decreased cardiac function in previous  
315 studies. In a mouse model of DGAT1 overexpression, Liu *et al.* found significant correlations between  
316 cardiac systolic and diastolic functions, assessed by cardiac catheterization, and DAG and ceramides  
317 myocardial levels (Liu *et al.*, 2009). On the other hand, Park *et al.* demonstrated that a decrease in  
318 ceramides levels was implicated in the cardiac function improvement observed in a mouse model of  
319 APPL1 overexpression (Park *et al.*, 2013). In a former study, the same team had previously  
320 demonstrated in another transgenic model (LpL<sup>GPI</sup>) that pharmacological inhibition of ceramides  
321 synthesis led to an improvement of cardiac function (Park *et al.*, 2008). At the cardiomyocyte level,  
322 this disturbances could originate from the deleterious effects exerted by these lipotoxic species on  
323 insulin signaling, mitochondrial function, calcium (Ca<sup>2+</sup>) handling and sarcomeric contractility, among  
324 others (Battiprolu *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011; Parra *et al.*, 2013; Simon *et al.*, 2014).

325 In the present study, 15 weeks of cholecalciferol supplementation did not impede the  
326 progression from prediabetes to overt T2DM and had no impact on mice obesity. Of note, the  
327 significant decrease in plasma NEFA levels that was observed can lead us to wonder about a potential  
328 beneficial effect of vitamin D on adipose tissue insulin sensitivity, but the study was not designed to  
329 resolve this question and no hypothesis can thus be stated here. To our knowledge, the only study  
330 assessing the cardiac effects of dietary supplementation with vitamin D in a model of diet-induced  
331 diabetes is the one recently published by Mazzone *et al.* (Mazzone *et al.*, 2018). In their experiment,  
332 Vitamin D supplementation alleviated the LV hypertrophy reported in mice fed a western regimen, in  
333 line with our own data. Any comparison with our study has to be made with cautious as those



334 authors evaluated the effects of vitamin D supplementation in primary prevention, not secondary  
335 prevention, as we did. Nevertheless, altogether these results speak in favor of cardiac anti-  
336 hypertrophic effect of vitamin D. Of note, in our study, together with the alleviation of cardiac  
337 hypertrophy, cholecalciferol abrogated the development of a concentric phenotype. Such anti-  
338 hypertrophic effects of vitamin D have been also previously reported in type 1 diabetes models (Lee  
339 *et al.*, 2014a; Wei *et al.*, 2017) or vitamin D receptor knock-out models (VDR KO) and have been  
340 linked to a decrease in renin expression by some authors, although this statement is not unanimous  
341 (Xiang *et al.*, 2005; Simpson *et al.*, 2007). On the other hand, VDR KO animals exhibit increased  
342 metalloproteinases (MMP) 1/2 activity, together with decreased tissue inhibitors of  
343 metalloproteinases (TIMP) 1/3, indicating a role for VDR in regulating extracellular matrix turnover  
344 (Rahman *et al.*, 2007). But vitamin D can also exert direct anti-hypertrophic effects on the  
345 cardiomyocyte, as reported by Chen *et al.* (Chen *et al.*, 2011). Indeed, those authors demonstrated  
346 an inhibition of the calcineurin/nuclear factor of activated T cells (NFAT) pathway, classically  
347 associated with pathological cardiac remodeling, by VDR (Chen *et al.*, 2011).

348         Because Mazzone *et al.* did not evaluate cardiac function, the present study is then, to our  
349 knowledge, the first one to report the beneficial effects of vitamin D supplementation on cardiac  
350 function in a rodent model of diet-induced T2DM. Indeed, we observed preserved, and even  
351 ameliorated, cardiac function indexes in our model. As a matter of fact, FS, as well as CS, were  
352 preserved in DM+D mice. But the major result was observed for LS, which were decreased after 10  
353 weeks diet and completely restored after cholecalciferol supplementation. Taken together, these  
354 results bring to light a cardioprotective effect of vitamin D supplementation in T2DM. If further  
355 experimental studies will be needed to decipher the mechanisms underlying those beneficial effects,  
356 some previous studies, performed in isolated cardiomyocytes from VDR KO or wild type mice, give us  
357 some insights (Green *et al.*, 2006; Tishkoff *et al.*, 2008). Indeed, those previous works reported  
358 positive inotropic and lusitropic effects of calcitriol infusion on rat cardiomyocytes, through non-



359 genomic VDR-mediated signalization cascade and cardiac troponin I and phospholamban  
360 phosphorylation (Green *et al.*, 2006; Tishkoff *et al.*, 2008). In type 1 diabetic rodent models,  
361 beneficial effects of calcitriol supplementation have also previously been reported. Indeed, the team  
362 led by Y.-J. Chen reported a restoration of FS and EF in STZ diabetic rats after 4 weeks of daily  
363 calcitriol subcutaneous injection, associated with increased peroxisome proliferator activated  
364 receptors (PPARs) and decreased inflammation and expression of receptors for advanced glycation  
365 end-products (RAGE) (Lee *et al.*, 2014b, 2014a). Another team further confirmed those results in a  
366 similar rat model, by reporting ameliorated EF, FS and E/A ratio after calcitriol injections (Wei *et al.*,  
367 2017). Wei *et al.* associated those beneficial effects with an enhancement of autophagy by inhibition  
368 of  $\beta$ -catenin/TCF4/GSK-3 $\beta$ /mTOR pathway (Wei *et al.*, 2017). Although we cannot here confirm nor  
369 exclude the involvement of the aforementioned processes in the alleviation of cardiac function  
370 impairments we observed, the characterization of cardiac lipid profile we carried out put forward a  
371 brand new insight in the potentially involved processes. As a matter of fact, the second major novel  
372 finding of the present study is the modulation of the myocardial levels of some lipid species by  
373 cholecalciferol. Indeed, levels of the two lipotoxic species ceramides and DAG were found to be  
374 normalized after the 15 weeks of supplementation protocol. This observation is of major interest  
375 because, as previously mentioned, those two lipid forms have been shown to exert adverse effects  
376 on a broad range of cardiomyocyte intracellular processes and have been linked to alterations of  
377 both systolic and diastolic cardiac function (Park *et al.*, 2008, 2013; Liu *et al.*, 2009; Battiprolu *et al.*,  
378 2010; Zhang *et al.*, 2011; Parra *et al.*, 2013; Simon *et al.*, 2014). The modulation of their myocardial  
379 levels by vitamin D could then be involved in the impediment of cardiac alterations progression, and  
380 further studies will be needed to decipher the potential mechanisms underlying this phenomenon, as  
381 well as its link to the cardiac phenotype observed in the supplemented animals.



382 **Conclusion**

383 In a T2DM mouse model exhibiting nascent cardiomyopathy, this work brought to light the  
384 beneficial effects of cholecalciferol supplementation, in secondary prevention, on cardiac remodeling  
385 and function. Moreover, we reported for the first time that in such a model, vitamin D could  
386 modulate the myocardial levels of lipotoxic species such as ceramides and DAG, a phenomenon that  
387 could potentially be involved in the observed cardioprotective effects of this vitamin. Further  
388 experimental studies will be needed to confirm these findings and explore the mechanisms  
389 underlying the cardiac effects of vitamin D; and clinical trials will have to be carried out to assess the  
390 clinical relevance of vitamin D supplementation regarding cardiac health in T2DM patients.

391 **ACKNOWLEDGMENTS**

392 This work was supported by the Platform 3A, funded by the European Regional Development  
393 Fund, the French Ministry of Research Higher Education and Innovation, the Provence-Alpes-Côte-  
394 d'Azur region, the Departmental Council of Vaucluse and the Urban Community of Avignon.

395 Authors warmly thank Asma Djaffal for her contribution in echocardiograms analysis.

396 **SOURCES OF FUNDING**

397 None.

398 **DISCLOSURES**

399 Authors have no conflict of interest to disclose.



## REFERENCES

- Afzal S, Bojesen SE & Nordestgaard BG (2013). Low 25-Hydroxyvitamin D and Risk of Type 2 Diabetes: A Prospective Cohort Study and Metaanalysis. *Clinical Chemistry* **59**, 381–391.
- Aurich A-C, Niemann B, Pan R, Gruenler S, Issa H, Silber R-E & Rohrbach S (2013). Age-dependent effects of high fat-diet on murine left ventricles: role of palmitate. *Basic Research in Cardiology*; DOI: 10.1007/s00395-013-0369-6.
- Battiprolu PK, Gillette TG, Wang ZV, Lavandero S & Hill JA (2010). Diabetic Cardiomyopathy: Mechanisms and Therapeutic Targets. *Drug Discov Today Dis Mech* **7**, e135–e143.
- Bonnet L, Karkeni E, Couturier C, Astier J, Dalifard J, Defoort C, Svilar L, Martin J-C, Tourniaire F & Landrier J-F (2018). Gene Expression Pattern in Response to Cholecalciferol Supplementation Highlights Cubilin as a Major Protein of 25(OH)D Uptake in Adipocytes and Male Mice White Adipose Tissue. *Endocrinology* **159**, 957–966.
- Brainard RE, Watson LJ, DeMartino AM, Brittian KR, Readnow RD, Boakye AA, Zhang D, Hoetker JD, Bhatnagar A, Baba SP & Jones SP (2013). High Fat Feeding in Mice Is Insufficient to Induce Cardiac Dysfunction and Does Not Exacerbate Heart Failure. *PLoS One*; DOI: 10.1371/journal.pone.0083174.
- Calligaris SD, Lecanda M, Solis F, Ezquer M, Gutiérrez J, Brandan E, Leiva A, Sobrevia L & Conget P (2013). 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**, e60931.



- Chen S, Law CS, Grigsby CL, Olsen K, Hong T-T, Zhang Y, Yeghiazarians Y & Gardner DG (2011). Cardiomyocyte-Specific Deletion of the Vitamin D Receptor Gene Results in Cardiac Hypertrophy. *Circulation* **124**, 1838–1847.
- Chen Y, Zhao C-T, Zhen Z, Wong A, Tse HF & Yiu KH (2014). Association of myocardial dysfunction with vitamin D deficiency in patients with type 2 diabetes mellitus. *Journal of Diabetes and its Complications* **28**, 286–290.
- Christoffersen C, Bollano E, Lindegaard MLS, Bartels ED, Goetze JP, Andersen CB & Nielsen LB (2003). Cardiac Lipid Accumulation Associated with Diastolic Dysfunction in Obese Mice. *Endocrinology* **144**, 3483–3490.
- Enomoto M, Ishizu T, Seo Y, Kameda Y, Suzuki H, Shimano H, Kawakami Y & Aonuma K (2016). Myocardial dysfunction identified by three-dimensional speckle tracking echocardiography in type 2 diabetes patients relates to complications of microangiopathy. *Journal of Cardiology* **68**, 282–287.
- Glenn DJ, Wang F, Nishimoto M, Cruz MC, Uchida Y, Holleran WM, Zhang Y, Yeghiazarians Y & Gardner DG (2011). A Murine Model of Isolated Cardiac Steatosis Leads to Cardiomyopathy. *Hypertension* **57**, 216–222.
- Green JJ, Robinson DA, Wilson GE, Simpson RU & Westfall MV (2006). Calcitriol modulation of cardiac contractile performance via protein kinase C. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **41**, 350–359.
- Hammer S, Snel M, Lamb HJ, Jazet IM, van der Meer RW, Pijl H, Meinders EA, Romijn JA, de Roos A & Smit JWA (2008). Prolonged Caloric Restriction in Obese Patients With Type 2 Diabetes



- Mellitus Decreases Myocardial Triglyceride Content and Improves Myocardial Function. *Journal of the American College of Cardiology* **52**, 1006–1012.
- Hankiewicz JH, Banke NH, Farjah M & Lewandowski ED (2010). Early Impairment of Transmural Principal Strains in the Left Ventricular Wall After Short-Term, High-Fat Feeding of Mice Predisposed to Cardiac Steatosis. *Circ Cardiovasc Imaging* **3**, 710–717.
- Harasim E, Stępek T, Konstantynowicz-Nowicka K, Baranowski M, Górski J & Chabowski A (2015). Myocardial Lipid Profiling During Time Course of High Fat Diet and its Relationship to the Expression of Fatty Acid Transporters. *Cellular Physiology and Biochemistry* **37**, 1147–1158.
- Heidari B, Nargesi AA, Hafezi-Nejad N, Sheikhabahaei S, Pajouhi A, Nakhjavani M & Esteghamati A (2015). Assessment of serum 25-hydroxy vitamin D improves coronary heart disease risk stratification in patients with type 2 diabetes. *American Heart Journal* **170**, 573-579.e5.
- International Diabetes Federation (2017). IDF Diabetes Atlas.
- Kim IM, Norris KC & Artaza JN (2016). Chapter Twelve - Vitamin D and Cardiac Differentiation. In *Vitamins & Hormones*, ed. Litwack G, Vitamin D Hormone, pp. 299–320. Academic Press.
- Lee T-I, Kao Y-H, Chen Y-C, Tsai W-C, Chung C-C & Chen Y-J (2014a). Cardiac metabolism, inflammation, and peroxisome proliferator-activated receptors modulated by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in diabetic rats. *International Journal of Cardiology* **176**, 151–157.
- Lee T-W, Kao Y-H, Lee T-I, Chang C-J, Lien G-S & Chen Y-J (2014b). Calcitriol modulates receptor for advanced glycation end products (RAGE) in diabetic hearts. *Int J Cardiol* **173**, 236–241.
- Listenberger LL, Han X, Lewis SE, Cases S, Farese RV, Ory DS & Schaffer JE (2003). Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**, 3077–3082.



- Liu L, Shi X, Bharadwaj KG, Ikeda S, Yamashita H, Yagyu H, Schaffer JE, Yu Y-H & Goldberg IJ (2009). DGAT1 Expression Increases Heart Triglyceride Content but Ameliorates Lipotoxicity. *J Biol Chem* **284**, 36312–36323.
- Liu L, Yu S, Khan RS, Ables GP, Bharadwaj KG, Hu Y, Huggins LA, Eriksson JW, Buckett LK, Turnbull AV, Ginsberg HN, Blaner WS, Huang L-S & Goldberg IJ (2011). DGAT1 deficiency decreases PPAR expression and does not lead to lipotoxicity in cardiac and skeletal muscle. *J Lipid Res* **52**, 732–744.
- Mazzone G, Morisco C, Lembo V, D’Argenio G, D’Armiento M, Rossi A, Giudice CD, Trimarco B, Caporaso N & Morisco F (2018). Dietary supplementation of vitamin D prevents the development of western diet-induced metabolic, hepatic and cardiovascular abnormalities in rats. *United European Gastroenterol J* **6**, 1056–1064.
- van der Meer RW, Rijzewijk LJ, Diamant M, Hammer S, Schar M, Bax JJ, Smit JWA, Romijn JA, de Roos A & Lamb HJ (2008). The ageing male heart: myocardial triglyceride content as independent predictor of diastolic function. *European Heart Journal* **29**, 1516–1522.
- Nagarajan V, Gopalan V, Kaneko M, Angeli V, Gluckman P, Richards AM, Kuchel PW & Velan SS (2013). Cardiac function and lipid distribution in rats fed a high-fat diet: in vivo magnetic resonance imaging and spectroscopy. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **304**, H1495–H1504.
- Nakai H, Takeuchi M, Nishikage T, Lang RM & Otsuji Y (2009). Subclinical left ventricular dysfunction in asymptomatic diabetic patients assessed by two-dimensional speckle tracking echocardiography: correlation with diabetic duration. *European Heart Journal - Cardiovascular Imaging* **10**, 926–932.





- Ng ACT, Delgado V, Bertini M, van der Meer RW, Rijzewijk LJ, Shanks M, Nucifora G, Smit JWA, Diamant M, Romijn JA, de Roos A, Leung DY, Lamb HJ & Bax JJ (2009). Findings from Left Ventricular Strain and Strain Rate Imaging in Asymptomatic Patients With Type 2 Diabetes Mellitus. *The American Journal of Cardiology* **104**, 1398–1401.
- Ouwens DM, Boer C, Fodor M, de Galan P, Heine RJ, Maassen JA & Diamant M (2005). Cardiac dysfunction induced by high-fat diet is associated with altered myocardial insulin signalling in rats. *Diabetologia* **48**, 1229–1237.
- Ouwens DM, Diamant M, Fodor M, Habets DDJ, Pelsers MMAL, El Hasnaoui M, Dang ZC, van den Brom CE, Vlasblom R, Rietdijk A, Boer C, Coort SLM, Glatz JFC & Luiken JJFP (2007). Cardiac contractile dysfunction in insulin-resistant rats fed a high-fat diet is associated with elevated CD36-mediated fatty acid uptake and esterification. *Diabetologia* **50**, 1938–1948.
- Park M, Wu D, Park T, Choi C, Li R-K, Cheng KKY, Xu A & Sweeney G (2013). APPL1 transgenic mice are protected from high-fat diet-induced cardiac dysfunction. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **305**, E795–E804.
- Park S-Y, Cho Y-R, Kim H-J, Higashimori T, Danton C, Lee M-K, Dey A, Rothermel B, Kim Y-B, Kalinowski A, Russell KS & Kim JK (2005). Unraveling the Temporal Pattern of Diet-Induced Insulin Resistance in Individual Organs and Cardiac Dysfunction in c57bl/6 Mice. *Diabetes* **54**, 3530–3540.
- Park T-S, Hu Y, Noh H-L, Drosatos K, Okajima K, Buchanan J, Tuinei J, Homma S, Jiang X-C, Abel ED & Goldberg IJ (2008). Ceramide is a cardiotoxin in lipotoxic cardiomyopathy. *Journal of Lipid Research* **49**, 2101–2112.



- Parra V, Moraga F, Kuzmicic J, López-Crisosto C, Troncoso R, Torrealba N, Criollo A, Díaz-Elizondo J, Rothermel BA, Quest AFG & Lavandero S (2013). Calcium and mitochondrial metabolism in ceramide-induced cardiomyocyte death. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1832**, 1334–1344.
- Rahman A, Hershey S, Ahmed S, Nibbelink K & Simpson RU (2007). Heart extracellular matrix gene expression profile in the vitamin D receptor knockout mice. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **103**, 416–419.
- Rennison JH, McElfresh TA, Chen X, Anand VR, Hoit BD, Hoppel CL & Chandler MP (2009). Prolonged Exposure to High Dietary Lipids is not Associated with Lipotoxicity in Heart Failure. *J Mol Cell Cardiol* **46**, 883–890.
- Roberts NW, González-Vega M, Berhanu TK, Mull A, García J & Heydemann A (2015). Successful metabolic adaptations leading to the prevention of high fat diet-induced murine cardiac remodeling. *Cardiovasc Diabetol*; DOI: 10.1186/s12933-015-0286-0.
- Seferović PM & Paulus WJ (2015). Clinical diabetic cardiomyopathy: a two-faced disease with restrictive and dilated phenotypes. *European Heart Journal* **36**, 1718–1727.
- Simon JN, Chowdhury SAK, Warren CM, Sadayappan S, Wiczorek DF, Solaro RJ & Wolska BM (2014). Ceramide-mediated depression in cardiomyocyte contractility through PKC activation and modulation of myofilament protein phosphorylation. *Basic Research in Cardiology*; DOI: 10.1007/s00395-014-0445-6.
- Simpson RU, Hershey SH & Nibbelink KA (2007). Characterization Of Heart Size And Blood Pressure In The Vitamin D Receptor Knockout Mouse. *J Steroid Biochem Mol Biol* **103**, 521–524.



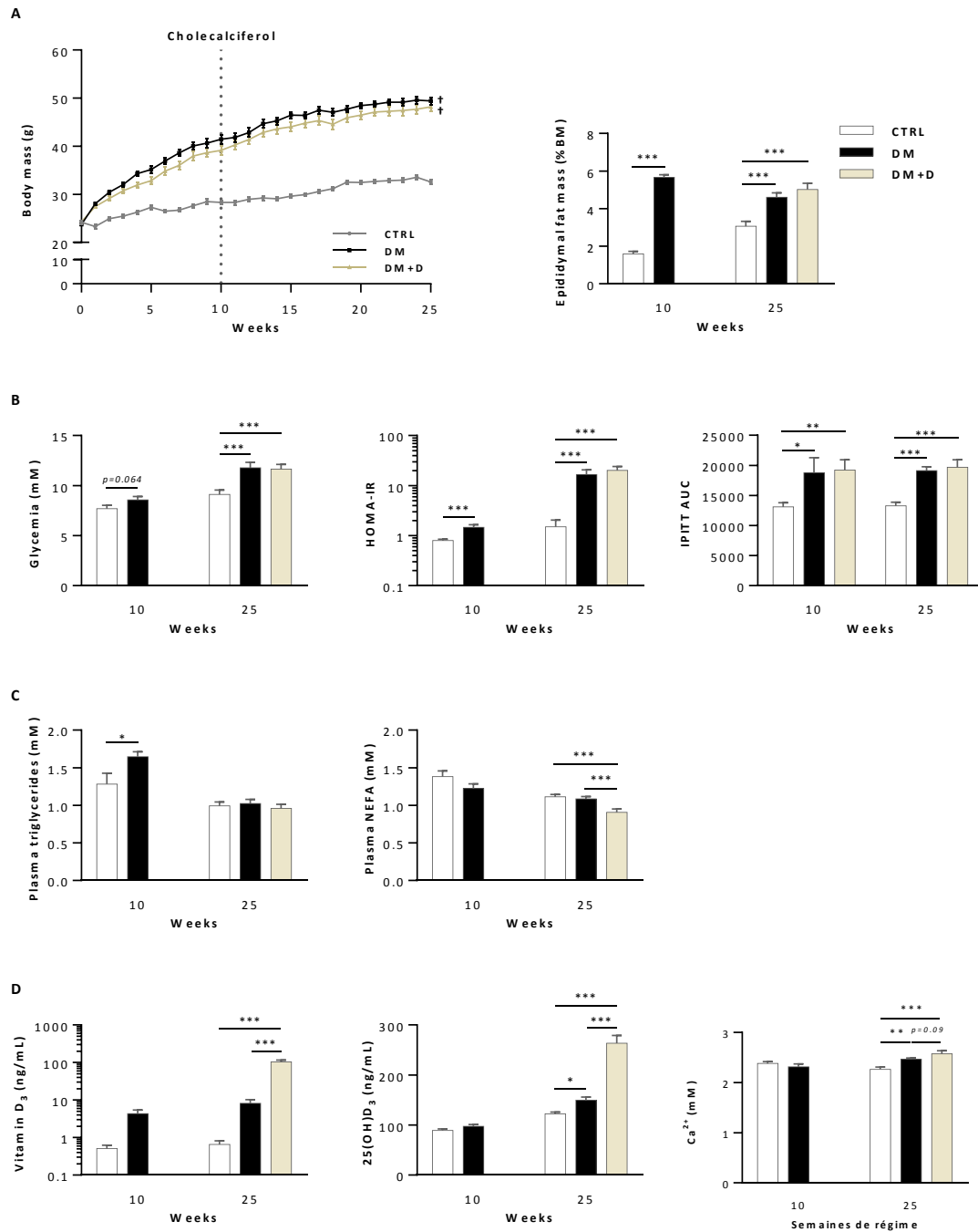
- Tadic M, Ilic S, Cuspidi C, Stojcevski B, Ivanovic B, Bukarica L, Jozika L & Celic V (2015). Left Ventricular Mechanics in Untreated Normotensive Patients with Type 2 Diabetes Mellitus: A Two- and Three-dimensional Speckle Tracking Study. *Echocardiography* **32**, 947–955.
- Ternacle J, Wan F, Sawaki D, Surenaud M, Pini M, Mercedes R, Ernande L, Audureau E, Dubois-Rande J-L, Adnot S, Hue S, Czibik G & Derumeaux G (2017). Short-term high-fat diet compromises myocardial function: a radial strain rate imaging study. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging* **18**, 1283–1291.
- Tishkoff DX, Nibbelink KA, Holmberg KH, Dandu L & Simpson RU (2008). Functional Vitamin D Receptor (VDR) in the T-Tubules of Cardiac Myocytes: VDR Knockout Cardiomyocyte Contractility. *Endocrinology* **149**, 558–564.
- Waddingham MT, Edgley AJ, Tsuchimochi H, Kelly DJ, Shirai M & Pearson JT (2015). Contractile apparatus dysfunction early in the pathophysiology of diabetic cardiomyopathy. *World J Diabetes* **6**, 943–960.
- Wang L, Yuan T, Du G, Zhao Q, Ma L & Zhu J (2014). The impact of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on the expression of connective tissue growth factor and transforming growth factor- $\beta$ 1 in the myocardium of rats with diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice* **104**, 226–233.
- Wei H, Qu H, Wang H, Ji B, Ding Y, Liu D, Duan Y, Liang H, Peng C, Xiao X & Deng H (2017). 1,25-Dihydroxyvitamin-D3 prevents the development of diabetic cardiomyopathy in type 1 diabetic rats by enhancing autophagy via inhibiting the  $\beta$ -catenin/TCF4/GSK-3 $\beta$ /mTOR pathway. *J Steroid Biochem Mol Biol*; DOI: 10.1016/j.jsbmb.2017.02.007.
- Xiang W, Kong J, Chen S, Cao L-P, Qiao G, Zheng W, Liu W, Li X, Gardner DG & Li YC (2005). Cardiac hypertrophy in vitamin D receptor knockout mice: role of the systemic and cardiac renin-



- angiotensin systems. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **288**, E125–E132.
- Zeng X, Yu X, Xiao S, Yao H & Zhu J (2017). Effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on pathological changes in rats with diabetic cardiomyopathy. *Lipids Health Dis*; DOI: 10.1186/s12944-017-0498-2.
- Zhang L, Ussher JR, Oka T, Cadete VJJ, Wagg C & Lopaschuk GD (2011). Cardiac diacylglycerol accumulation in high fat-fed mice is associated with impaired insulin-stimulated glucose oxidation. *Cardiovasc Res* **89**, 148–156.
- Zhang X, Wei X, Liang Y, Liu M, Li C & Tang H (2013). Differential Changes of Left Ventricular Myocardial Deformation in Diabetic Patients with Controlled and Uncontrolled Blood Glucose: A Three-Dimensional Speckle-Tracking Echocardiography–Based Study. *Journal of the American Society of Echocardiography* **26**, 499–506.
- Zhu K, Knuiman M, Divitini M, Hung J, Lim EM, Cooke BR & Walsh JP (2017). Serum 25-hydroxyvitamin D as a predictor of mortality and cardiovascular events: A 20-year study of a community-based cohort. *Clinical Endocrinology* **88**, 154–163.



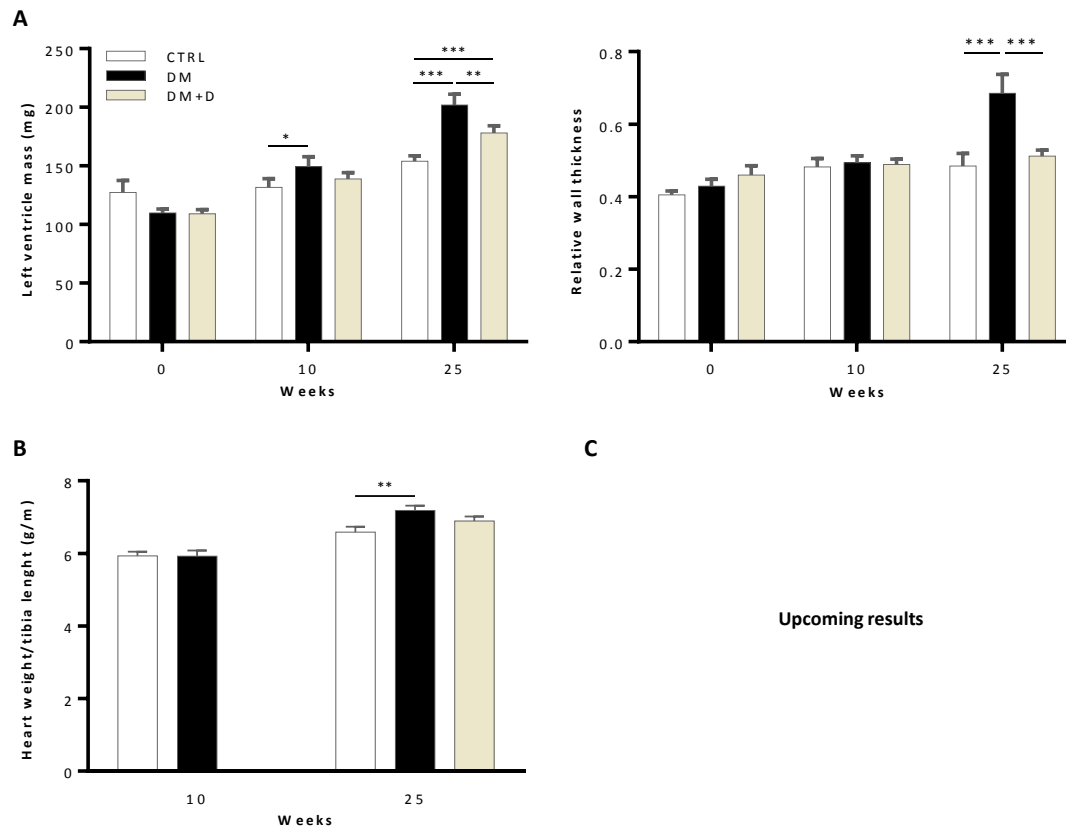
FIGURES



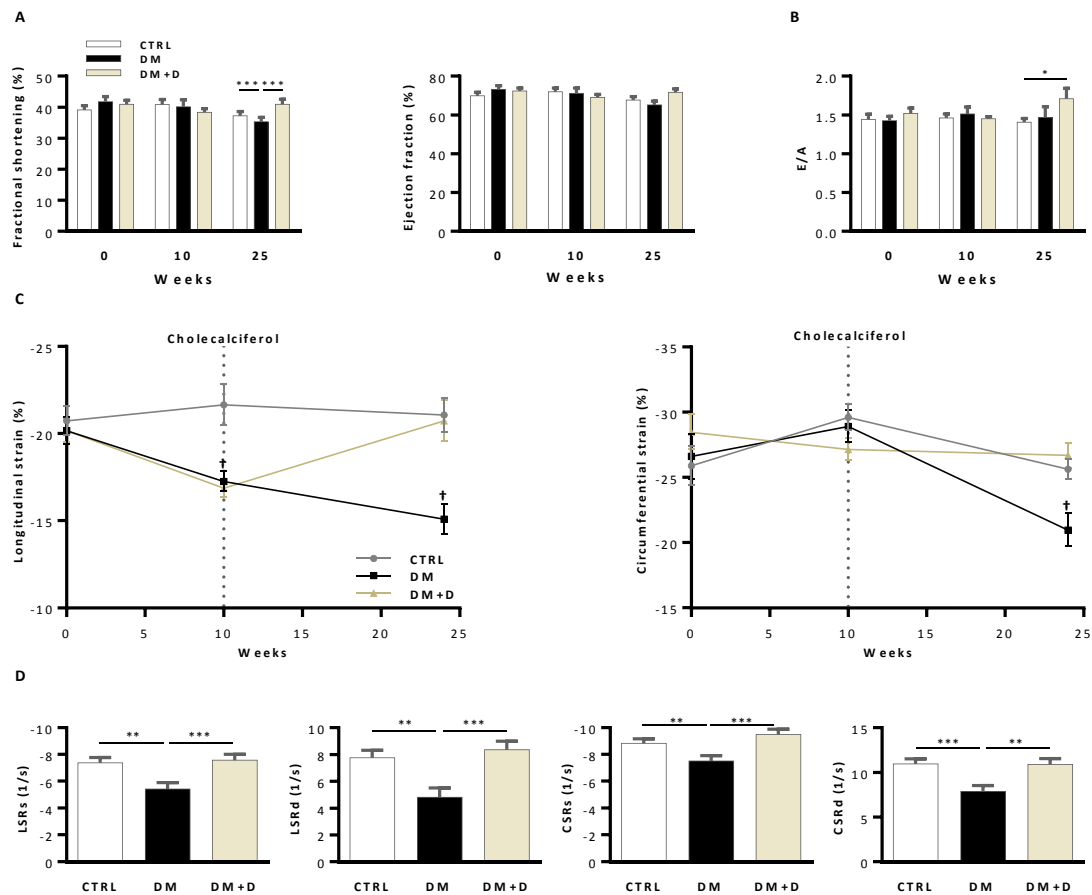
**Figure 1. Characterization of the DM mouse model and effect of cholecalciferol supplementation on the model phenotype.** CTRL: control group, DM: type 2 diabetic mice, DM+D: vitamin D-supplemented DM mice. **A) Mice BM evolution throughout the protocol and epididymal (visceral) adipose pad mass, indexed to BM, at the 10<sup>th</sup> and 25<sup>th</sup> weeks of protocol.** BM: body mass. † $p < 0.001$  vs. CTRL. **B) Glucose homeostasis assessment at the 10<sup>th</sup> and 25<sup>th</sup> weeks of protocol**



by fasting glycemia, HOMA-IR and IPITT. *AUC*: area under curve, *HOMA-IR*: homeostasis model assessment of insulin resistance, *IPITT*: intraperitoneal insulin tolerance test. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . C) Plasma lipemia at the 10<sup>th</sup> and 25<sup>th</sup> weeks of protocol. *NEFA*: non-esterified free fatty acids. \*\*\* $p < 0.001$ . D) Plasma free vitamin D<sub>3</sub> and 25(OH)D<sub>3</sub>, and calcium. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ .



**Figure 2. Cardiac remodeling (and fibrosis) and effect of cholecalciferol supplementation.** CTRL: control group, DM: type 2 diabetic mice, DM+D: vitamin D-supplemented DM mice. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . **A)** Echocardiographic follow-up of cardiac remodeling. **B)** Cardiac hypertrophy appraisal by heart weight/tibia length ratio at the 10<sup>th</sup> and 25<sup>th</sup> weeks of protocol. **C)** Upcoming characterization of myocardial fibrosis at the 10<sup>th</sup> and 25<sup>th</sup> weeks of protocol.



**Figure 3. Cardiac function and effect of cholecalciferol supplementation.** CTRL: control group, DM: type 2 diabetic mice, DM+D: vitamin D-supplemented DM mice. **A) Global systolic function appraised by fractional shortening and ejection fraction, throughout the protocol.** \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ . **B) Global diastolic function assessed by E/A ratio, throughout the protocol.** \* $p < 0.05$ . **C) Longitudinal and circumferential strains evolution throughout the protocol.** † $p < 0.001$  vs. CTRL. **D) Longitudinal and circumferential systolic and diastolic strain rates, at the 25<sup>th</sup> week of protocol.** Values are expressed as marginal means  $\pm$  SEM. CSR<sub>s/d</sub>: systolic/-diastolic circumferential strain rate, LSR<sub>s/d</sub>: systolic/-diastolic longitudinal strain rate. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ .



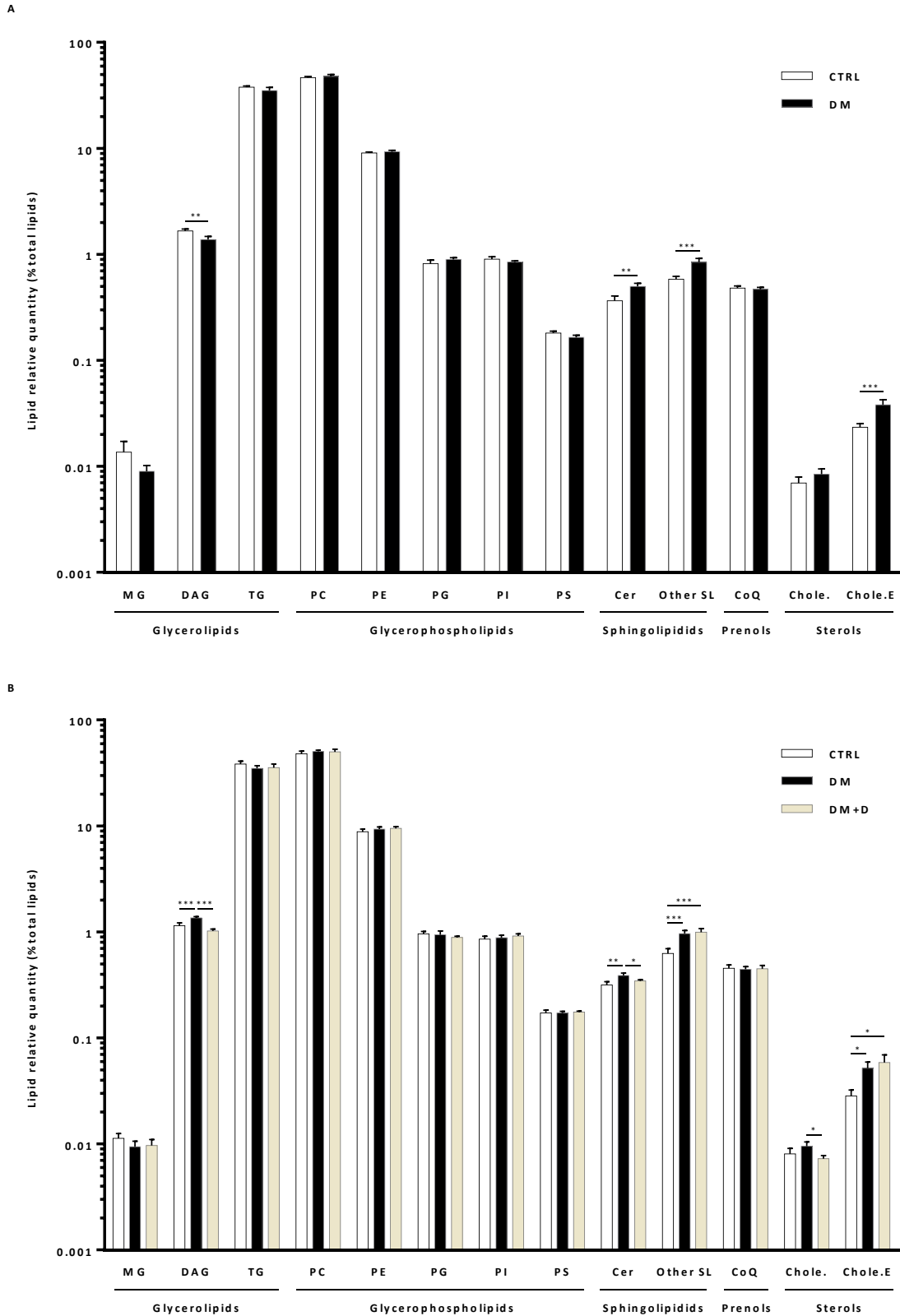
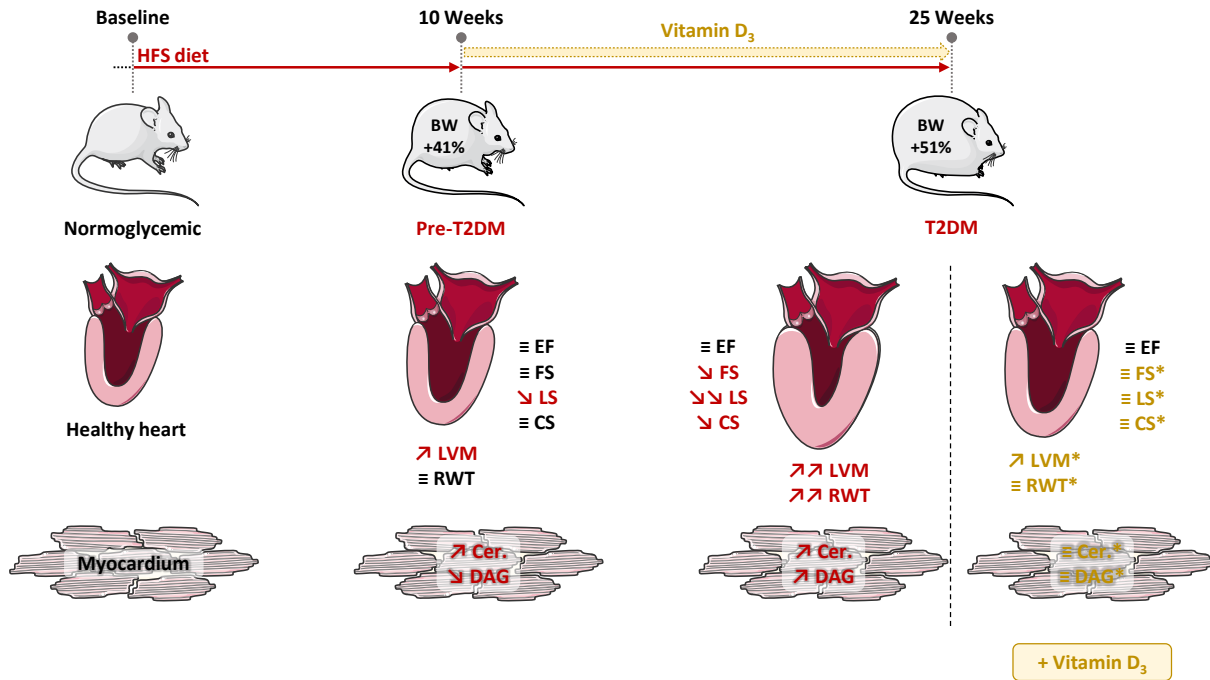


Figure 4. Myocardial lipid profile at the A) 10<sup>th</sup> and B) 25<sup>th</sup> weeks of protocol, effect of cholecalciferol supplementation.

*Cer*: ceramides, *Chole.*: cholesterol, *Chole.E.*: cholesterylesters, *CoQ*: ubiquinones, *CTRL*: control group, *DAG*:



diacylglycerols, *DM*: type 2 diabetic mice, *DM+D*: vitamin D-supplemented DM mice, *MG*: monoradylglycerols, *PC*: glycerophosphocholines, *PE*: glycerophosphoethanolamines, *PG*: glycerophosphoglycerols, *PI*: glycerophosphoinositols, *PS*: glycerophosphoserines, *SL*: sphingolipids, *TG*: triradylglycerols. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .



**Figure 5. Summary diagram of the evolution of the mouse model of diet-induced T2DM throughout the protocol and effects of vitamin D3 supplementation.** *BW* body weight, *Cer.* ceramides, *CS* circumferential strain, *DAG* diacylglycerols, *EF* ejection fraction, *FS* fractional shortening, *HFS* high fat + sucrose, *LS* longitudinal strain, *LVM* left ventricular mass, *RWT* relative wall thickness, *T2DM* type 2 diabetes.  $\equiv$  no difference vs. control mice, ( $\nearrow$ ) $\nearrow$  (very) increased vs. control mice, ( $\searrow$ ) $\searrow$  (very) decreased vs. control mice, \*different from DM mice.



# DISCUSSION GÉNÉRALE







**E**n l'espace d'une quinzaine d'années, le diabète s'est hissé de la 12<sup>ème</sup> à la 7<sup>ème</sup> place au classement des causes de mortalité dans le monde établi par l'OMS (World Health Organization, 2016). Les complications cardiovasculaires associées à cette pathologie, et en particulier la DMCM, sont la première cause de morbi-mortalité chez ces patients. Les premières altérations myocardiques se mettant en place dès l'apparition du diabète (Waddingham *et al.*, 2015), **un dépistage précoce et une prévention de la progression de la DMCM revêtent donc une importance majeure et étaient les deux objectifs ciblés par ces travaux de thèse.**

La première étude réalisée dans le cadre de notre travail s'est donc intéressée au dépistage précoce de la DMCM par échocardiographie transthoracique. À l'heure actuelle, les outils de dépistage utilisés en routine sont en effet peu sensibles aux stades infra-cliniques car ils reposent principalement sur l'évaluation du remodelage cardiaque et sur des indices fonctionnels systoliques et diastoliques globaux, par ailleurs sensibles aux conditions de charge (Lang *et al.*, 2015a; Nagueh *et al.*, 2016). En utilisant ces indices, la DMCM est classiquement caractérisée chez le patient T2DM par une hypertrophie concentrique, associée à une dysfonction diastolique globale, la fonction systolique globale apparaissant généralement préservée (Seferović & Paulus, 2015). Si l'avènement des techniques d'imagerie de déformation, moins influencées par les conditions de charge, a permis à certains auteurs de rapporter la présence d'une dysfonction régionale myocardique systolique, cette observation ne fait cependant pas consensus, notamment dans le cas des patients présentant un diabète non compliqué avec un assez bon contrôle de la glycémie (Fang *et al.*, 2004; Govind *et al.*, 2006; Nakai *et al.*, 2009; Cognet *et al.*, 2013). Des études ont en effet mis en évidence l'existence d'un lien entre un faible contrôle glycémique ou la présence de complications et l'exacerbation de la dysfonction myocardique chez les patients T2DM (Zhang *et al.*, 2013; Zhen *et al.*, 2015; Enomoto *et al.*, 2016). En accord avec ces travaux, dans notre première étude, nous n'avons pas observé à l'état de repos d'altérations de la fonction régionale myocardique dans notre population de patients asymptomatiques présentant un T2DM non-complicé et un contrôle glycémique relativement correct (HbA1c 7,2%). Cependant, ce constat pourrait refléter un manque de sensibilité de l'évaluation au repos, et une évaluation en conditions de stress pourrait peut-être être nécessaire pour révéler des altérations fonctionnelles restant discrètes au repos. Dans ce sens, une petite poignée d'études a été réalisée, mais n'a pas permis de faire émerger de résultats consensuels (Govind *et al.*, 2006; Galderisi *et al.*, 2007; Cognet *et al.*, 2013; Cadeddu *et al.*, 2013; Wierzbowska-Drabik *et al.*, 2015). Notre vision est par ailleurs très partielle, et entachée de nombreuses limites méthodologiques. Il est ainsi à souligner que ces études ont en grande majorité été conduites en utilisant le TDI (Govind *et al.*, 2006; Galderisi *et al.*, 2007; Cadeddu *et al.*, 2013), et que les études



ayant utilisé le 2D-STI n'ont évalué que la fonction longitudinale (Cognet *et al.*, 2013; Wierzbowska-Drabik *et al.*, 2015). Or, la fonction circonférentielle et la mécanique de rotation/torsion jouent un rôle primordial dans la réponse myocardique au stress, à FC élevée comme à des fréquences correspondant à des faibles doses de dobutamine (~110bpm) (Notomi *et al.*, 2006; Esch & Warburton, 2009; Doucende *et al.*, 2010). **Le résultat majeur de notre étude est ainsi la mise en évidence de l'altération de la réponse à un stress adrénérgique modéré de la fonction régionale myocardique chez nos patients T2DM, et ce manière multidirectionnelle.** Cette dysfonction est majeure pour les rotations apicales, qui ne manifestent pas de réponse à la dobutamine. **Du point de vue clinique, ces observations 1) pourraient permettre une meilleure compréhension de l'origine centrale de l'intolérance à l'exercice qui est fréquemment rapportée chez ces patients, 2) soulignent la précocité de l'apparition des altérations de la fonction cardiaque chez le patient T2DM et donc l'importance d'une prise en charge précoce, avant l'installation d'une dysfonction majeure et, dans ce but, 3) démontrent, pour la première fois, l'intérêt d'une évaluation comprehensive de la fonction régionale myocardique par 2D-STI en conditions de stress adrénérgique modéré dans cette population.**

Bien que nous ne puissions pas établir avec certitude de lien de causalité, l'analyse multivariée des corrélations que nous avons réalisée nous permet d'identifier des mécanismes pouvant être impliqués dans la diminution de réserve fonctionnelle myocardique observée chez le patient T2DM. En effet, l'adiposité viscérale, la dyslipidémie et l'hyperglycémie se sont révélées être des prédicteurs indépendants de la réponse réduite à la dobutamine de la fonction régionale myocardique. Ces trois facteurs sont des éléments clés de la physiopathologie de la DMCM car ils interviennent dans un large spectre de processus délétères conduisant à l'altération du métabolisme cardiomyocytaire, aux phénomènes de gluco-/lipotoxicité, stress oxydant, inflammation et à l'altération des protéines sarcomériques, entre autres (Battiprolu *et al.*, 2010; Bugger & Abel, 2014; Aon *et al.*, 2015; Waddingham *et al.*, 2015; Jia *et al.*, 2016). **De façon intéressante, cette même analyse multivariée a identifié, pour la première fois, le TAE comme un acteur majeur de l'altération de la réponse à la dobutamine, notamment des rotations apicales.** Ce dépôt adipeux, au contact direct des cardiomyocytes et des coronaires, exerce en conditions physiologiques de nombreux effets cardioprotecteurs. *A contrario*, dans le contexte du T2DM, ce tissu s'hypertrophie et présente un shift de son profil sécrétoire vers un phénotype délétère pro-inflammatoire, qui a été associé au développement de diverses altérations fonctionnelles du cardiomyocyte ou de la paroi vasculaire et à la dysfonction diastolique globale du ventricule gauche (Kazlauskaitė *et al.*, 2010; Greulich *et al.*, 2012; Blumensatt *et al.*, 2017). Plus récemment, une étude menée par Ng et coll. dans





une population de patients non diabétiques présentant un large éventail d'IMC (19,3-36,3 kg/m<sup>2</sup>), a identifié le volume indexé du TAE, évalué par IRM, comme étant le seul facteur déterminant du LS en analyse multivariée (Ng *et al.*, 2018). À noter que ces mêmes auteurs ont par ailleurs mis en évidence une association indépendante entre le volume indexé du TAE, ainsi que l'HOMA-IR, et le contenu lipidique myocardique, également évalué par IRM (Ng *et al.*, 2018). **Dans la suite de nos travaux, nous avons donc porté une attention toute particulière à l'adiposité cardiaque, considérant ses effets délétères sur la fonction myocardique.**

Ces premiers travaux ayant permis de révéler la présence d'une altération précoce de la fonction cardiaque chez le patient T2DM asymptomatique, nous nous sommes donc intéressés, dans un deuxième temps, aux stratégies de prévention secondaire qui pourraient être mises en place dans cette population. En effet, à l'heure actuelle, la prévention de la progression de la DMCM repose sur le contrôle de la glycémie, associé à une intervention hygiéno-diététique. Notre attention s'est portée sur la VitD pour plusieurs raisons. Tout d'abord, l'hypovitaminose D présente une forte prévalence, aux alentours de 50%-60%, chez le patient T2DM (Fernández-Juárez *et al.*, 2013; Alcubierre *et al.*, 2015; Usluogullari *et al.*, 2015; Reddy *et al.*, 2015). En outre, un faible taux sérique de calcidiol a été associé, d'une part, au risque de diabète et de complications diabétiques et, d'autre part, au risque d'insuffisance cardiaque et de mortalité cardiovasculaire, dans la population générale comme chez le patient diabétique de type 2 (Afzal *et al.*, 2013; Heidari *et al.*, 2015; Zhu *et al.*, 2017). Plus spécifiquement, une récente étude chez des patients T2DM sans coronaropathie a rapporté une association indépendante entre la carence en VitD et l'altération de la fonction régionale myocardique (Chen *et al.*, 2014). Enfin, de précédentes études, conduites dans des populations de patients insuffisants cardiaques ont montré l'efficacité de la supplémentation en VitD dans l'amélioration de la fonction cardiaque et du remodelage ventriculaire (Schleithoff *et al.*, 2006; Schrotten *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2018). Cependant, les études de supplémentation réalisées dans des populations de patients diabétiques n'ont pas considéré la fonction cardiaque en tant que critère de jugement principal. Seules des études expérimentales, en grande majorité réalisées dans des modèles de T1DM, ont évalué de façon spécifique les effets d'une supplémentation en VitD sur le cœur diabétique. Similairement aux études cliniques menées chez les patients insuffisants cardiaques, ces travaux ont rapporté une amélioration de la fonction et du remodelage cardiaques associés à une diminution de la fibrose, du stress oxydant et de l'inflammation (Lee *et al.*, 2014b, 2014a; Wang *et al.*, 2014a; Wei *et al.*, 2017; Qu *et al.*, 2017; Zeng *et al.*, 2017). Si la supplémentation en VitD présente un fort potentiel dans la prévention de la progression de la DMCM chez le patient T2DM, on ne peut que constater le manque cruel de données sur le sujet dans la littérature, aussi



bien clinique qu'expérimentale. **La deuxième partie de ces travaux de thèse a ainsi été menée avec une approche translationnelle. La première étude, clinique, s'est intéressée aux effets d'une supplémentation en cholécalciférol sur la fonction régionale myocardique, au repos et en conditions de stress adrénergique, dans une population de patients asymptomatiques, présentant un T2DM non-complicé et divers niveaux de carence en calcidiol. La deuxième étude, expérimentale, a été menée chez un modèle murin de T2DM induit par un régime riche en graisses et en sucres. Ses objectifs étaient à la fois d'évaluer les effets de ce régime et d'une supplémentation en cholécalciférol, en prévention secondaire, sur le remodelage et la fonction cardiaque, mais également d'appréhender les potentiels mécanismes sous-jacents, notamment les effets de ces interventions sur l'adiposité cardiaque.**

Ces travaux nous ont permis de mettre en évidence pour la première fois les effets bénéfiques d'une supplémentation en VitD<sub>3</sub> sur la fonction cardiaque dans le T2DM. **Dans notre population de patients T2DM, la normalisation des taux sériques en calcidiol par 3 mois de supplémentation a permis d'améliorer la réponse à la dobutamine de la fonction régionale myocardique, et ce manière multidirectionnelle.** On notera ainsi notamment la restauration de la réponse au stress des rotations apicales et l'amélioration de la torsion, qui sont, comme précédemment mentionné, les deux paramètres clés de la réponse cardiaque à un stress (Notomi *et al.*, 2006; Esch & Warburton, 2009; Doucende *et al.*, 2010). À noter que ces améliorations sont corrélées à l'amplitude de la variation du taux sérique en 25(OH)D. Cette deuxième étude clinique souligne dans le même temps l'utilité de l'échocardiographie de stress en mode 2D-STI dans l'évaluation fine de la réponse à une intervention. En effet, dans notre cas, seule la réponse au stress est majorée, la supplémentation n'ayant pas eu d'effet sur les variables au repos. Néanmoins, dans ce type de population, il est à rappeler que notre première étude n'avait pas révélé d'altération de la fonction au repos. De même, l'absence d'effet de l'intervention sur les dimensions cardiaques, en apparence contradiction avec de précédentes études (Zhao *et al.*, 2018), est à mettre en perspective avec l'absence de remodelage dans notre population, l'hypertrophie étant un critère d'exclusion. Dans leur méta-analyse, Zhao et coll. ont en effet souligné que l'amélioration des paramètres de remodelage et de fonction cardiaque obtenue par la supplémentation en VitD était plus importante chez les patients présentant un remodelage et une altération de la fonction cardiaque globale (Zhao *et al.*, 2018). **Notre étude montre donc que la VitD pourrait présenter une stratégie prophylactique intéressante, afin d'entraver la progression de la DMCM dès ses premiers stades de développement chez le patient T2DM asymptomatique.**



Dans notre précédente étude, nous avons identifié l'obésité viscérale, la dyslipidémie, l'hyperglycémie, ainsi que l'épaississement du TAE comme étant des prédicteurs indépendants de l'altération de la réponse à la dobutamine dans notre population. Si cette deuxième étude clinique n'était pas conçue pour étudier les mécanismes fins impliqués dans les effets du cholécalficérol sur le cœur, il semblerait néanmoins que les effets bénéfiques de la supplémentation ne soient pas liés à une modulation de l'obésité viscérale, de la dyslipidémie ou de l'hyperglycémie, ces facteurs n'étant pas améliorés suite au protocole. En revanche, la diminution de l'épaisseur du TAE suite à la supplémentation est un phénomène intéressant. En effet, comme précédemment mentionné, l'hypertrophie de ce dépôt adipeux dans le T2DM, ainsi que le shift de son profil sécrétoire vers un phénotype délétère pro-inflammatoire, a été associé au développement de diverses altérations fonctionnelles du cardiomyocyte et à la dysfonction diastolique globale du ventricule gauche (Kazlauskaitė *et al.*, 2010; Greulich *et al.*, 2012; Blumensatt *et al.*, 2017). Son volume indexé serait par ailleurs indépendamment associé à une réduction du LS (Ng *et al.*, 2018). **Une réduction de l'hypertrophie du TAE pourrait ainsi constituer une première hypothèse pour expliquer l'amélioration de la fonction cardiaque observée chez nos patients**, bien que l'analyse des corrélations conduite ait uniquement révélé une association significative entre cette réduction du TAE et l'amélioration de la réponse du twist. En outre, de précédentes études ayant rapporté des propriétés anti-inflammatoires de la VitD (Schleithoff *et al.*, 2006), nous pourrions également émettre l'hypothèse d'une modulation de l'inflammation, aussi bien systémique que du TAE, chez ces patients. Cette hypothèse est étayée par de précédentes études, chez l'Homme (Dozio *et al.*, 2015) ou dans des modèles porcins (Gupta *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2016), qui ont associé l'hypovitaminose D à une inflammation accrue de ce dépôt adipeux et montré que la VitD pourrait moduler ce phénomène par une inhibition de la translocation nucléaire du NF- $\kappa$ B (Chen *et al.*, 2016).

Afin de mieux appréhender les processus impliqués, nous avons poursuivi nos travaux dans une étude expérimentale. Si nous n'avons pas été en mesure d'évaluer le lien entre le TAE, qui est discret, voire considéré absent chez le rongeur (Yamaguchi *et al.*, 2015; Iacobellis, 2015), et la fonction cardiaque, nous nous sommes en revanche intéressés à l'adiposité intramyocardique. Cette dernière, et plus spécifiquement l'accumulation d'espèces lipotoxiques telles que le DAG et les céramides, ont en effet été associés au développement d'altérations de la fonction cardiaque par de précédentes études (Liu *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2013). En outre, ces espèces lipotoxiques seraient impliquées dans la physiopathologie de la DMCM, en altérant de nombreux processus intracellulaires tels que la signalisation insulinaire ou  $\beta$ -adrénergique, la fonction mitochondriale, l'homéostasie calcique ou bien encore la contraction du sarcomère (Battiprolu *et al.*, 2010; Drosatos *et al.*, 2010;



Simon *et al.*, 2014). La troisième étude de cette thèse avait donc pour double objectif d'évaluer les effets d'un régime diabétogène et de la supplémentation en cholécalciférol, en prévention secondaire, sur la fonction cardiaque, mais également sur le profil lipidique myocardique. Dans notre modèle de souris, les 10 premières semaines de protocole nous ont permis d'induire un phénotype pré-diabétique, caractérisé par une altération de la sensibilité à l'insuline et une glycémie modérément augmentée. À ce stade, les animaux ne présentaient pas d'hypertrophie cardiaque majeure, de dysfonction cardiaque globale ou d'altération des CS, mais une réduction du LS, un schéma également décrit en clinique chez des patients T2DM présentant un bon contrôle glycémique (Zhang *et al.*, 2013). **Ce résultat met ici bien en évidence la précocité de l'installation des altérations de la fonction cardiaque dans la chronologie du développement du diabète et souligne l'importance de la mise en place rapide d'une stratégie de prévention de la progression de la cardiomyopathie.** À ce stade, les céramides intramyocardiques étaient d'ores-et-déjà significativement augmentés, suggérant leur potentielle implication dans le développement des premières perturbations de la fonction myocardique. À la fin des 25 semaines de protocole, les souris présentaient un phénotype T2DM marqué, associé à une hypertrophie concentrique et une dysfonction régionale myocardique bien établies, avec FE préservée. En clinique, ce profil est typiquement retrouvé chez les patients présentant un T2DM avec un faible contrôle glycémique (Nakai *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2013; Seferović & Paulus, 2015). **À notre connaissance, cette étude est la première à rapporter une altération de la fonction régionale myocardique avec une FE préservée dans un modèle murin de T2DM induit par un régime sur le long-terme.** À ce stade, les niveaux intramyocardiques de céramides, mais également de DAG, étaient accrus chez les animaux T2DM. Ces résultats suggèrent que ces deux espèces lipotoxiques seraient bien impliquées dans la physiopathologie des altérations cardiaques observées dans notre modèle.

Dans ce modèle, la supplémentation en cholécalciférol s'est révélée efficace dans l'enrayement de la progression des altérations cardiaques. Elle a en effet permis la préservation, voire l'amélioration, des paramètres fonctionnels, tout en modulant le profil hypertrophique vers une diminution de la masse ventriculaire et une abolition du phénotype concentrique. Des effets bénéfiques similaires avaient précédemment été rapportés dans des modèles de T1DM (Lee *et al.*, 2014a; Wei *et al.*, 2017) ou par l'étude réalisée dans un modèle de diabète de type 2, en prévention primaire (Mazzone *et al.*, 2018). **Nos travaux montrent ainsi pour la première fois, à notre connaissance, les effets bénéfiques de la supplémentation en cholécalciférol, en prévention secondaire, sur le remodelage et la fonction cardiaques dans un modèle expérimental de T2DM induit par un régime.** Si ces résultats, obtenus au repos, diffèrent de nos observations en clinique,



cela pourrait s'expliquer, d'une part, par une intervention plus précoce chez nos souris. En effet, le protocole de supplémentation a été mis en place chez nos animaux dès le stade pré-diabétique. Dans notre étude clinique, au contraire, nous étions intervenus chez des patients présentant un T2DM déclaré depuis plusieurs années. D'autre part, la mise en parallèle de ces deux études est également limitée par la difficulté de comparer les posologies utilisées, ainsi que par les statuts vitaminiques différents en début de protocole, nos patients étant carencés, contrairement à nos animaux. Cependant, **similairement à ce que nous avons rapporté chez l'Homme, les effets bénéfiques du cholécalciférol ne semblent pas passer par une amélioration de l'obésité viscérale ou du phénotype diabétique chez les souris.** En revanche, nous avons observé une normalisation des taux intramyocardiques des deux espèces lipotoxiques céramides et DAG suite à la supplémentation. Considérant le rôle de ces lipides dans la physiopathologie de la DMCM, ces résultats suggèrent, pour la première fois, que **les effets cardioprotecteurs de la VitD pourraient être dus à une modulation des taux intramyocardiques en espèces lipotoxiques.** Les deux études que nous avons menées laissent ainsi à penser que, de manière globale, la VitD pourrait exercer ses effets bénéfiques, tout du moins en partie, par une modulation de l'adiposité cardiaque (c.-à-d. TAE, lipides intramyocardiques) et de son phénotype délétère dans le T2DM.



# CONCLUSIONS & PERSPECTIVES









## Conclusion

**E**n conclusion, l'ensemble de ce travail a permis d'atteindre les deux objectifs ciblés. En effet, la première étude a permis de démontrer l'utilité d'une évaluation comprehensive de la fonction régionale myocardique, en conditions de stress, dans le dépistage précoce de la cardiomyopathie diabétique chez le patient asymptomatique présentant un diabète de type 2 non-complicqué. Ces travaux ont donné lieu à un premier papier, aujourd'hui publié dans le *Journal of the American Society of Echocardiography*. Cette conclusion s'inscrit dans la tendance actuelle à la généralisation de l'utilisation de l'échocardiographie de stress dans le diagnostic et l'évaluation du pronostic de nombreuses cardiopathies non ischémiques, comme la cardiopathie hypertrophique, les valvulopathies, l'hypertension pulmonaire, ou bien encore les cardiopathies congénitales (Lancellotti *et al.*, 2016). Nos travaux pourraient ouvrir la voie à de plus larges études, pour valider la valeur de cette évaluation de la fonction régionale myocardique, en conditions de stress, dans le cas de la DMCM et, éventuellement, définir des valeurs de référence.

Si la deuxième étude est, quant à elle, toujours en cours, les premiers résultats obtenus ont d'ores-et-déjà permis de souligner l'efficacité d'une intervention précoce, ici par supplémentation en vitamine D<sub>3</sub>, sur la fonction cardiaque. Nos résultats ont en effet mis en évidence des effets bénéfiques du cholécalciférol dans la préservation, ou la normalisation, de la fonction cardiaque, dans la prévention du développement de l'hypertrophie concentrique et du phénotype délétère de l'adiposité cardiaque chez l'individu T2DM présentant un stade précoce de DMCM. Chez le patient diabétique, ces travaux montrent l'importance de la surveillance et du maintien du statut vitaminique D.

Ensemble, ces deux études ont mis en exergue la précocité de l'apparition des altérations cardiaques dans le T2DM et donc l'importance d'un dépistage précoce efficace, afin de mettre en place au plus tôt une stratégie interventionnelle permettant d'enrayer la progression de ces altérations vers l'insuffisance cardiaque.



## Perspectives

**S**i la première étude réalisée est achevée et a été publiée, la deuxième étude est toujours en cours. L'une des premières limites de cette dernière est bien entendu le faible effectif de patients recrutés jusqu'à maintenant : 20 patients T2DM carencés ont été recrutés, sur les 45 prévus. L'une des premières perspectives, à court terme, de ce travail, est donc la poursuite du recrutement des patients. Par ailleurs, nous avons prévu, toujours dans cette deuxième étude clinique, de comparer la fonction cardiaque des patients T2DM non-carencés aux patients T2DM carencés. En effet, les études observationnelles réalisées dans diverses populations ont rapporté chez les patients carencés un risque accru d'insuffisance cardiaque et d'hypertrophie concentrique (Ameri *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2017). Nous n'avons, cependant, pas pu, dans ce travail, présenter de résultats concernant les patients T2DM non carencés que nous avons recrutés, leur effectif étant bien trop faible à ce jour (6 patients). Tout comme les patients carencés, nous avons pour objectif d'en recruter 45 au total.

Une autre limite de notre travail concerne l'évaluation des mécanismes impliqués dans les effets de la supplémentation en cholécalciférol chez nos patients. D'une part, nous avons rapporté une diminution du TAE suite à la supplémentation. Il convient de rappeler que la mesure de l'épaisseur du TAE par échocardiographie n'est par une méthode de référence et ne prend pas en compte la structure tridimensionnelle de ce dépôt adipeux. Afin de confirmer nos résultats, une évaluation du volume du TAE par IRM serait nécessaire. L'utilisation de l'IRM permettrait en outre de quantifier, en spectroscopie par résonance magnétique, l'adiposité intramyocardique, qui n'est pas appréciable par échocardiographie. Cette mesure nous permettrait d'avoir une vue d'ensemble des effets de la vitamine D sur l'adiposité cardiaque. D'autre part, nous avons émis l'hypothèse d'un possible effet bénéfique de la vitamine D<sub>3</sub> sur l'inflammation pour expliquer, du moins en partie, les améliorations observées. Afin de valider cette hypothèse, des dosages sériques de marqueurs tels que la CRP ou des cytokines pro-/anti-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-10...) seraient à envisager. Pour aller plus loin, une évaluation de marqueurs d'intérêt tels que les miRs (miR-22 et miR-451, des marqueurs d'hypertrophie, ou bien encore miR-208a, surexprimé en présence d'angiotensine II) pourrait se révéler intéressante, le VDR pouvant réguler l'expression de ce type d'ARN (Lisse *et al.*, 2013).

De nombreuses perspectives émergent également du versant expérimental de cette deuxième étude. Tout d'abord, nous n'avons ici présenté que les pesées cardiaques et les variables échocardiographiques du remodelage. Pour compléter ces résultats, une analyse histologique du



remodelage et de la fibrose va être conduite d'ici quelques semaines, tout comme l'évaluation du niveau d'expression des collagènes par RT-qPCR. Afin de mieux comprendre les mécanismes pouvant être impliqués dans les effets anti-hypertrophiques de la vitamine D<sub>3</sub> que nous avons observés, l'évaluation des voies calcineurine/NFAT et Wnt serait à envisager. En effet, la vitamine D inhiberait la voie calcineurine/NFAT, classiquement associée à l'hypertrophie pathologique, et la voie Wnt canonique, liée à la prolifération cellulaire, tout en activant la voie Wnt non-canonique, associée, quant à elle, à la différenciation du cardiomyocyte (Chen *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2016). L'hypothèse, controversée, d'un effet anti-hypertrophique du calcitriol médié par une diminution de l'expression de la rénine pourrait également être vérifiée (Xiang *et al.*, 2005; Simpson *et al.*, 2007). Cela nous fournirait aussi, par voie indirecte, des informations sur le caractère systémique ou local de l'origine des effets bénéfiques du cholécalciférol.

Par ailleurs, nous allons, à très court terme, avoir des informations concernant le statut inflammatoire du myocarde, avec les résultats de la mesure de l'activation de la voie NF-κB que nous sommes en train de mener. La vitamine D serait en effet capable d'inhiber l'activation de cette voie (Chen *et al.*, 2016). Par ailleurs, nous avons également prévu, à moyen terme, d'évaluer le stress oxydant par la quantification de la 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG), un marqueur des dommages oxydatif subits par l'ADN.

Pour approfondir notre analyse du profil lipidique cardiaque, nous allons mener, à court terme, une analyse complémentaire en chromatographie en phase gazeuse. En effet, si l'analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse nous a permis de caractériser les différentes espèces lipidiques présentes dans le myocarde, nous n'avons pas d'information précise sur sa composition en AG. En outre, nous allons également ajouter à notre approche statistique une analyse discriminante des résultats précédemment obtenus, afin d'identifier des espèces lipidiques se démarquant entre les groupes suite au régime et à la supplémentation. Pour mieux comprendre les aspects fonctionnels qui lieraient la vitamine D aux lipides myocardiques et à la fonction cardiaque, des protocoles sur cardiomyocyte isolé pourraient être envisagés (exposition des cardiomyocytes à  $\pm 1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ,  $\pm$  acide palmitique,  $\pm$  acide oléique,  $\pm$  céramide...).

Concernant l'évaluation de la fonction cardiaque des souris, des analyses complémentaires vont également être menées à très court terme. En effet, chez l'Homme, nous avons montré, d'une part, que l'échocardiographie de stress permettait de révéler des dysfonctions restant discrètes au repos et, d'autre part, que la vitamine D améliorerait la réponse de la fonction régionale myocardique au stress. Chez nos animaux, nous avons également réalisé des échocardiographies de stress à la dobutamine. Leur prochaine analyse va nous permettre, comme chez nos patients, de vérifier que



des dysfonctions absentes au repos ne se révèlent pas en condition de stress, avant ou après supplémentation, mais aussi d'évaluer de potentiels effets de la supplémentation sur la réponse au stress de la fonction régionale myocardique de ces souris.

Ainsi, si les travaux réalisés dans le cadre de cette deuxième étude translationnelle ont d'ores-et-déjà fournis des résultats originaux et intéressants, ils laissent encore entrevoir de nombreuses perspectives à explorer, afin de mieux définir et comprendre les effets de la vitamine D sur le cœur diabétique.

# BIBLIOGRAPHIE







- A**bbasi F, Blasey C, Feldman D, Caulfield MP, Hantash FM & Reaven GM (2015). Low Circulating 25-Hydroxyvitamin D Concentrations Are Associated with Defects in Insulin Action and Insulin Secretion in Persons with Prediabetes. *J Nutr* **145**, 714–719.
- Abel ED, Peroni O, Kim JK, Kim Y-B, Boss O, Hadro E, Minnemann T, Shulman GI & Kahn BB (2001). Adipose-selective targeting of the *GLUT4* gene impairs insulin action in muscle and liver. *Nature* **409**, 729–733.
- Afzal S, Bojesen SE & Nordestgaard BG (2013). Low 25-Hydroxyvitamin D and Risk of Type 2 Diabetes: A Prospective Cohort Study and Metaanalysis. *Clin Chem* **59**, 381–391.
- Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail (2015). Avis de l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail relatif à l'évaluation des apports en vitamines et minéraux issus de l'alimentation non enrichie, de l'alimentation enrichie et des compléments alimentaires dans la population française : estimation des apports usuels, des prévalences d'inadéquation et des risques de dépassement des limites de sécurité.
- Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail (2017). Étude Individuelle Nationale des Consommations Alimentaires 3 (INCA 3) 2014-2015. Available at: <https://www.anses.fr/fr/content/inca-3-evolution-des-habitudes-et-modes-de-consommation-de-nouveaux-enjeux-en-mati%C3%A8re-de> [Accessed September 20, 2018].
- Aguirre V, Uchida T, Yenush L, Davis R & White MF (2000). The c-Jun NH2-terminal Kinase Promotes Insulin Resistance during Association with Insulin Receptor Substrate-1 and Phosphorylation of Ser307. *J Biol Chem* **275**, 9047–9054.
- Ahmad W, Ijaz B, Shabbiri K, Ahmed F & Rehman S (2017). Oxidative toxicity in diabetes and Alzheimer's disease: mechanisms behind ROS/ RNS generation. *J Biomed Sci*; DOI: 10.1186/s12929-017-0379-z.
- Alberti KGMM, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleman JI, Donato KA, Fruchart J-C, James WPT, Loria CM & Smith SC (2009). Harmonizing the Metabolic Syndrome A Joint Interim Statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart



- Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* **120**, 1640–1645.
- Alcubierre N, Valls J, Rubinat E, Cao G, Esquerda A, Traveset A, Granada-Casas M, Jurjo C & Mauricio D (2015). Vitamin D Deficiency Is Associated with the Presence and Severity of Diabetic Retinopathy in Type 2 Diabetes Mellitus. *J Diabetes Res*; DOI: 10.1155/2015/374178.
- Al-Daghri NM, Al-Attas OS, Alkharfy KM, Khan N, Mohammed AK, Vinodson B, Ansari MGA, Alenad A & Alokail MS (2014). Association of VDR-gene variants with factors related to the metabolic syndrome, type 2 diabetes and vitamin D deficiency. *Gene* **542**, 129–133.
- Aldiss P, Davies G, Woods R, Budge H, Sacks HS & Symonds ME (2017). ‘Browning’ the cardiac and peri-vascular adipose tissues to modulate cardiovascular risk. *Int J Cardiol* **228**, 265–274.
- Amaral N & Okonko DO (2015). Metabolic abnormalities of the heart in type II diabetes. *Diab Vasc Dis Res* **12**, 239–248.
- Ameri P, Canepa M, Milaneschi Y, Spallarossa P, Leoncini G, Giallauria F, Strait JB, Lakatta EG, Brunelli C, Murialdo G & Ferrucci L (2013). Relationship between vitamin D status and left ventricular geometry in a healthy population: results from the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *J Intern Med* **273**, 253–262.
- American Diabetes Association (2017). Standards of Medical Care in Diabetes—2017. *Diabetes Care*; DOI: 10.2337/dc17-S005.
- Amin A, Minaee S, Chitsazan M, Naderi N, Taghavi S & Ardeshiri M (2013). Can Vitamin D Supplementation Improve the Severity of Congestive Heart Failure? *Congest Heart Fail* **19**, E22–E28.
- Amundsen BH, Helle-Valle T, Edvardsen T, Torp H, Crosby J, Lyseggen E, Støylen A, Ihlen H, Lima JAC, Smiseth OA & Slørdahl SA (2006). Noninvasive Myocardial Strain Measurement by Speckle Tracking Echocardiography: Validation Against Sonomicrometry and Tagged Magnetic Resonance Imaging. *J Am Coll Cardiol* **47**, 789–793.
- Andrikopoulos S, Blair AR, Deluca N, Fam BC & Proietto J (2008). Evaluating the glucose tolerance test in mice. *Am J Physiol - Endocrinol Metab* **295**, E1323–E1332.





Aon MA, Tocchetti CG, Bhatt N, Paolocci N & Cortassa S (2015). Protective Mechanisms of Mitochondria and Heart Function in Diabetes. *Antioxid Redox Signal* **22**, 1563–1586.

Artinian NT et al. (2010). Interventions to Promote Physical Activity and Dietary Lifestyle Changes for Cardiovascular Risk Factor Reduction in Adults: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation* **122**, 406–441.

Atkinson MA, Eisenbarth GS & Michels AW (2014). Type 1 diabetes. *Lancet* **383**, 69–82.

Augustus AS, Kako Y, Yagyu H & Goldberg IJ (2003). Routes of FA delivery to cardiac muscle: modulation of lipoprotein lipolysis alters uptake of TG-derived FA. *Am J Physiol-Endocrinol Metab* **284**, E331–E339.

Aurich A-C, Niemann B, Pan R, Gruenler S, Issa H, Silber R-E & Rohrbach S (2013). Age-dependent effects of high fat-diet on murine left ventricles: role of palmitate. *Basic Res Cardiol*; DOI: 10.1007/s00395-013-0369-6.

Ayala JE, Samuel VT, Morton GJ, Obici S, Croniger CM, Shulman GI, Wasserman DH & McGuinness OP (2010). Standard operating procedures for describing and performing metabolic tests of glucose homeostasis in mice. *Dis Model Mech* **3**, 525–534.

**B**allegooijen AJ van, Snijder MB, Visser M, Hurk K van den, Kamp O, Dekker JM, Nijpels G, Stehouwer CDA, Henry RMA, Paulus WJ & Brouwer IA (2012). Vitamin D in Relation to Myocardial Structure and Function after Eight Years of Follow-Up: The Hoorn Study. *Ann Nutr Metab* **60**, 69–77.

van Ballegooijen AJ, Visser M, Cotch MF, Arai AE, Garcia M, Harris TB, Launer LJ, Eiríksdóttir G, Gudnason V & Brouwer IA (2013). Serum Vitamin D and Parathyroid Hormone in Relation to Cardiac Structure and Function: The ICELAND-MI Substudy of AGES-Reykjavik. *J Clin Endocrinol Metab* **98**, 2544–2552.

Bandurska K, Berdowska A, Barczyńska-Felusiak R & Krupa P (2015). Unique features of human cathelicidin LL-37. *BioFactors* **41**, 289–300.

Basit S (2013). Vitamin D in health and disease: a literature review. *Br J Biomed Sci* **70**, 161–172.



- Battiprolu PK, Gillette TG, Wang ZV, Lavandro S & Hill JA (2010). Diabetic Cardiomyopathy: Mechanisms and Therapeutic Targets. *Drug Discov Today Dis Mech* **7**, e135–e143.
- Battiprolu PK, Lopez-Crisosto C, Wang ZV, Nemchenko A, Lavandro S & Hill JA (2013). Diabetic Cardiomyopathy and Metabolic Remodeling of the Heart. *Life Sci* **92**, 609–615.
- Baz B, Riveline J-P & Gautier J-F (2016). ENDOCRINOLOGY OF PREGNANCY: Gestational diabetes mellitus: definition, aetiological and clinical aspects. *Eur J Endocrinol* **174**, R43–R51.
- Benhamou C-L, Souberbielle J-C, Cortet B, Fardellone P, Gauvain J-B, Thomas T & pour le groupe de recherche et d'information sur les ostéoporoses (GRIO) (2011). La vitamine D chez l'adulte : recommandations du GRIO. *Presse Médicale* **40**, 673–682.
- Beveridge LA et al. (2015). Effect of Vitamin D Supplementation on Blood Pressure. *JAMA Intern Med* **175**, 745–754.
- Beveridge LA et al. (2018). Effect of Vitamin D Supplementation on Markers of Vascular Function: A Systematic Review and Individual Participant Meta-Analysis. *J Am Heart Assoc Cardiovasc Cerebrovasc Dis*; DOI: 10.1161/JAHA.117.008273.
- Bjorntorp P (1991). Metabolic Implications of Body Fat Distribution. *Diabetes Care* **14**, 1132–1143.
- Blumensatt M, Fahlbusch P, Hilgers R, Bekaert M, Herzfeld de Wiza D, Akhyari P, Ruige JB & Ouwens DM (2017). Secretory products from epicardial adipose tissue from patients with type 2 diabetes impair mitochondrial  $\beta$ -oxidation in cardiomyocytes via activation of the cardiac renin-angiotensin system and induction of miR-208a. *Basic Res Cardiol* **112**, 2.
- Boland RL (2011). VDR activation of intracellular signaling pathways in skeletal muscle. *Mol Cell Endocrinol* **347**, 11–16.
- Bonnet L, Karkeni E, Couturier C, Astier J, Dalifard J, Defoort C, Svilar L, Martin J-C, Tourniaire F & Landrier J-F (2018). Gene Expression Pattern in Response to Cholecalciferol Supplementation Highlights Cubilin as a Major Protein of 25(OH)D Uptake in Adipocytes and Male Mice White Adipose Tissue. *Endocrinology* **159**, 957–966.
- Boonman-de Winter LJM, Rutten FH, Cramer MJM, Landman MJ, Liem AH, Rutten GEHM & Hoes AW (2012). High prevalence of previously unknown heart failure and left ventricular dysfunction in patients with type 2 diabetes. *Diabetologia* **55**, 2154–2162.



- Borlaug BA & Fine NM (2016). Use of the Echocardiogram to Define the Presence, Extent, and Etiology of Cardiac Dysfunction. *Cardiol Advis*. Available at: <https://www.thecardiologyadvisor.com/cardiology/use-of-the-echocardiogram-to-define-the-presence-extent-and-etiology-of-cardiac-dysfunction/article/584293/> [Accessed September 7, 2018].
- Bouillon R (2017). Comparative analysis of nutritional guidelines for vitamin D. *Nat Rev Endocrinol* **13**, 466–479.
- Bouillon R, Carmeliet G, Verlinden L, van Etten E, Verstuyf A, Luderer HF, Lieben L, Mathieu C & Demay M (2008). Vitamin D and Human Health: Lessons from Vitamin D Receptor Null Mice. *Endocr Rev* **29**, 726–776.
- Bouillon R, Verlinden L & Verstuyf A (2016). Is Vitamin D2 Really Bioequivalent to Vitamin D3? *Endocrinology* **157**, 3384–3387.
- Bouthoorn S, Valstar GB, Gohar A, den Ruijter HM, Reitsma HB, Hoes AW & Rutten FH (2018). The prevalence of left ventricular diastolic dysfunction and heart failure with preserved ejection fraction in men and women with type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Diab Vasc Dis Res* 1479164118787415.
- Boxer RS, Hoit BD, Schmotzer BJ, Stefano GT, Gomes A & Negrea L (2014). The Effect of Vitamin D on Aldosterone and Health Status in Patients with Heart Failure. *J Card Fail* **20**, 334–342.
- Boyko EJ, Fujimoto WY, Leonetti DL & Newell-Morris L (2000). Visceral adiposity and risk of type 2 diabetes: a prospective study among Japanese Americans. *Diabetes Care* **23**, 465–471.
- Brainard RE, Watson LJ, DeMartino AM, Brittian KR, Readnower RD, Boakye AA, Zhang D, Hoetker JD, Bhatnagar A, Baba SP & Jones SP (2013). High Fat Feeding in Mice Is Insufficient to Induce Cardiac Dysfunction and Does Not Exacerbate Heart Failure. *PLoS ONE*; DOI: 10.1371/journal.pone.0083174.
- Brassard P, Legault S, Garneau C, Bogaty P, Dumesnil JG & Poirier P (2007). Normalization of diastolic dysfunction in type 2 diabetics after exercise training. *Med Sci Sports Exerc* **39**, 1896–1901.



Brindley DN, Kok BPC, Kienesberger PC, Lehner R & Dyck JRB (2010). Shedding light on the enigma of myocardial lipotoxicity: the involvement of known and putative regulators of fatty acid storage and mobilization. *Am J Physiol-Endocrinol Metab* **298**, E897–E908.

Briot K, Audran M, Cortet B, Fardellone P, Marcelli C, Orcel P, Vellas B, Thomas T & Roux C (2009). Vitamine D : effet osseux et extra-osseux ; recommandations de bon usage. *Presse Médicale* **38**, 43–54.

Brown EM, Gamba G, Riccardi D, Lombardi M, Butters R, Kifor O, Sun A, Hediger MA, Lytton J & Hebert SC (1993). Cloning and characterization of an extracellular Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature* **366**, 575–580.

Brunkwall L & Orho-Melander M (2017). The gut microbiome as a target for prevention and treatment of hyperglycaemia in type 2 diabetes: from current human evidence to future possibilities. *Diabetologia* **60**, 943–951.

Bugger H & Abel ED (2014). Molecular mechanisms of diabetic cardiomyopathy. *Diabetologia* **57**, 660–671.

Burns AT, Gerche AL, D’hooge J, Maclsaac AI & Prior DL (2010). Left ventricular strain and strain rate: characterization of the effect of load in human subjects. *Eur Heart J - Cardiovasc Imaging* **11**, 283–289.

**C**ade C & Norman AW (1986). Vitamin D3 Improves Impaired Glucose Tolerance and Insulin Secretion in the Vitamin D-Deficient Rat in Vivo. *Endocrinology* **119**, 84–90.

Cadeddu C, Nocco S, Piano D, Deidda M, Cossu E, Baroni MG & Mercurio G (2013). Early impairment of contractility reserve in patients with insulin resistance in comparison with healthy subjects. *Cardiovasc Diabetol* **12**, 66.

Calligaris SD, Lecanda M, Solis F, Ezquer M, Gutiérrez J, Brandan E, Leiva A, Sobrevia L & Conget P (2013). 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**, e60931.



- Callis TE, Pandya K, Seok HY, Tang R-H, Tatsuguchi M, Huang Z-P, Chen J-F, Deng Z, Gunn B, Shumate J, Willis MS, Selzman CH & Wang D-Z (2009). MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice. *J Clin Invest* **119**, 2772–2786.
- Cersosimo E, Triplitt C, Solis-Herrera C, Mandarino LJ & DeFronzo RA (2000). Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus. In *Endotext*, ed. De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, Feingold KR, Grossman A, Hershman JM, Koch C, Korbonits M, McLachlan R, New M, Purnell J, Rebar R, Singer F & Vinik A. MDText.com, Inc., South Dartmouth (MA). Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279115/> [Accessed May 14, 2018].
- Chanakul A, Zhang MYH, Louw A, Armbrecht HJ, Miller WL, Portale AA & Perwad F (2013). FGF-23 Regulates CYP27B1 Transcription in the Kidney and in Extra-Renal Tissues. *PLoS ONE*; DOI: 10.1371/journal.pone.0072816.
- Chapuy M-C, Preziosi P, Maamer M, Arnaud S, Galan P, Hercberg S & Meunier PJ (1997). Prevalence of Vitamin D Insufficiency in an Adult Normal Population. *Osteoporos Int* **7**, 439–443.
- Chaurasia B & Summers SA (2015). Ceramides – Lipotoxic Inducers of Metabolic Disorders. *Trends Endocrinol Metab* **26**, 538–550.
- Chavez JA, Knotts TA, Wang L-P, Li G, Dobrowsky RT, Florant GL & Summers SA (2003). A Role for Ceramide, but Not Diacylglycerol, in the Antagonism of Insulin Signal Transduction by Saturated Fatty Acids. *J Biol Chem* **278**, 10297–10303.
- Chel V, Wijnhoven HAH, Smit JH, Ooms M & Lips P (2008). Efficacy of different doses and time intervals of oral vitamin D supplementation with or without calcium in elderly nursing home residents. *Osteoporos Int* **19**, 663–671.
- Chen L, Pei J-H, Kuang J, Chen H-M, Chen Z, Li Z-W & Yang H-Z (2015). Effect of lifestyle intervention in patients with type 2 diabetes: A meta-analysis. *Metabolism* **64**, 338–347.
- Chen S, Law CS, Grigsby CL, Olsen K, Hong T-T, Zhang Y, Yeghiazarians Y & Gardner DG (2011). Cardiomyocyte-Specific Deletion of the Vitamin D Receptor Gene Results in Cardiac Hypertrophy. *Circulation* **124**, 1838–1847.



- Chen S, Swier VJ, Boosani CS, Radwan MM & Agrawal DK (2016). Vitamin D Deficiency Accelerates Coronary Artery Disease Progression in Swine Highlights. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **36**, 1651–1659.
- Chen X-H, Zhao Y-P, Xue M, Ji C-B, Gao C-L, Zhu J-G, Qin D-N, Kou C-Z, Qin X-H, Tong M-L & Guo X-R (2010). TNF- $\alpha$  induces mitochondrial dysfunction in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Cell Endocrinol* **328**, 63–69.
- Chen Y, Zhao C-T, Zhen Z, Wong A, Tse HF & Yiu KH (2014). Association of myocardial dysfunction with vitamin D deficiency in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes Complications* **28**, 286–290.
- Cheng Q & Leung PS (2011). An update on the islet renin–angiotensin system. *Peptides* **32**, 1087–1095.
- Cheng Y, Ji R, Yue J, Yang J, Liu X, Chen H, Dean DB & Zhang C (2007). MicroRNAs Are Aberrantly Expressed in Hypertrophic Heart: Do They Play a Role in Cardiac Hypertrophy? *Am J Pathol* **170**, 1831–1840.
- Chiang S-J, Daimon M, Ishii K, Kawata T, Miyazaki S, Hirose K, Ichikawa R, Miyauchi K, Yeh M-H, Chang N-C & Daida H (2014). Assessment of Elevation of and Rapid Change in Left Ventricular Filling Pressure Using a Novel Global Strain Imaging Diastolic Index. *Circ J* **78**, 419–427.
- Chillo P, Rieck ÅE, Lwakatare J, Lutale J & Gerds E (2013). Left atrial volume index as a marker of left ventricular diastolic dysfunction in asymptomatic Tanzanian diabetic patients. *Blood Press* **22**, 86–93.
- Chistiakov DA, Orekhov AN & Bobryshev YV (2016). Cardiac-specific miRNA in cardiogenesis, heart function, and cardiac pathology (with focus on myocardial infarction). *J Mol Cell Cardiol* **94**, 107–121.
- Chiu KC, Chu A, Go VLW & Saad MF (2004). Hypovitaminosis D is associated with insulin resistance and  $\beta$  cell dysfunction. *Am J Clin Nutr* **79**, 820–825.
- Choi J-O, Shin D-H, Cho SW, Song YB, Kim JH, Kim YG, Lee S-C & Park SW (2008). Effect of Preload on Left Ventricular Longitudinal Strain by 2D Speckle Tracking. *Echocardiography* **25**, 873–879.



- Christoffersen C, Bollano E, Lindegaard MLS, Bartels ED, Goetze JP, Andersen CB & Nielsen LB (2003). Cardiac Lipid Accumulation Associated with Diastolic Dysfunction in Obese Mice. *Endocrinology* **144**, 3483–3490.
- Cigolini M, Iagulli MP, Miconi V, Galiotto M, Lombardi S & Targher G (2006). Serum 25-Hydroxyvitamin D3 Concentrations and Prevalence of Cardiovascular Disease Among Type 2 Diabetic Patients. *Diabetes Care* **29**, 722–724.
- Clemente-Postigo M, Muñoz-Garach A, Serrano M, Garrido-Sánchez L, Bernal-López MR, Fernández-García D, Moreno-Santos I, Garriga N, Castellano-Castillo D, Camargo A, Fernández-Real JM, Cardona F, Tinahones FJ & Macías-González M (2015). Serum 25-Hydroxyvitamin D and Adipose Tissue Vitamin D Receptor Gene Expression: Relationship With Obesity and Type 2 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* **100**, E591–E595.
- Cognet T, Vervueren P-L, Dercle L, Bastié D, Richaud R, Berry M, Marchal P, Gautier M, Fouilloux A, Galinier M, Carrié D, Massabuau P, Berry I & Lairez O (2013). New concept of myocardial longitudinal strain reserve assessed by a dipyridamole infusion using 2D-strain echocardiography: the impact of diabetes and age, and the prognostic value. *Cardiovasc Diabetol* **12**, 84.
- Combs TP, Berg AH, Obici S, Scherer PE & Rossetti L (2001). Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30. *J Clin Invest* **108**, 1875–1881.
- Cooke NE, Murgia A & McLEOD JF (1988). Vitamin D-Binding Protein. *Ann N Y Acad Sci* **538**, 49–59.
- Corradi D, Maestri R, Callegari S, Pastori P, Goldoni M, Luong TV & Bordi C (2004). The ventricular epicardial fat is related to the myocardial mass in normal, ischemic and hypertrophic hearts. *Cardiovasc Pathol* **13**, 313–316.
- Cortigiani L, Borelli L, Raciti M, Bovenzi F, Picano E, Molinaro S & Sicari R (2015). Prediction of mortality by stress echocardiography in 2835 diabetic and 11 305 nondiabetic patients. *Circ Cardiovasc Imaging*; DOI: 10.1161/CIRCIMAGING.114.002757.
- Cortigiani L, Gherardi S, Faggioni M, Bovenzi F, Picano E, Petersen C, Molinaro S & Sicari R (2017). Dual-Imaging Stress Echocardiography for Prognostic Assessment of High-Risk Asymptomatic Patients with Diabetes Mellitus. *J Am Soc Echocardiogr* **30**, 149–158.



Craig ME, Jefferies C, Dabelea D, Balde N, Seth A & Donaghue KC (2014). Definition, epidemiology, and classification of diabetes in children and adolescents. *Pediatr Diabetes* **15**, 4–17.

Cuspidi C, Meani S, Negri F, Giudici V, Valerio C, Sala C, Zanchetti A & Mancia G (2009). Indexation of left ventricular mass to body surface area and height to allometric power of 2.7: is the difference limited to obese hypertensives? *J Hum Hypertens* **23**, 728–734.

**D**ahle GO, Stangeland L, Moen CA, Salminen P-R, Haaverstad R, Matre K & Grong K (2016). The influence of acute unloading on left ventricular strain and strain rate by speckle tracking echocardiography in a porcine model. *Am J Physiol - Heart Circ Physiol* **310**, H1330–H1339.

Dalbeni A, Scaturro G, Degan M, Minuz P & Delva P (2014). Effects of six months of vitamin D supplementation in patients with heart failure: A randomized double-blind controlled trial. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* **24**, 861–868.

Dandel M, Lehmkühl H, Knosalla C, Suramelashvili N & Hetzer R (2009). Strain and Strain Rate Imaging by Echocardiography – Basic Concepts and Clinical Applicability. *Curr Cardiol Rev* **5**, 133–148.

Daniels L, Bell JR, Delbridge LMD, McDonald FJ, Lamberts RR & Erickson JR (2015). The role of CaMKII in diabetic heart dysfunction. *Heart Fail Rev* **20**, 589–600.

Danzmann LC, Bodanese LC, Köhler I & Torres MR (2008). Left atrioventricular remodeling in the assessment of the left ventricle diastolic function in patients with heart failure: a review of the currently studied echocardiographic variables. *Cardiovasc Ultrasound* **6**, 56.

Darmon P, Bauduceau B, Bordier L, Bringer J, Chabrier G, Charbonnel B, Detournay B, Fontaine P, Grimaldi A, Gourdy P, Guerci B, Penfornis A, Riveline J-P & Scheen A (2017). Prise de position de la Société Francophone du Diabète (SFD) sur la prise en charge médicamenteuse de l’hyperglycémie du patient diabétique de type 2. *Médecine Mal Métaboliques* **11**, 577–593.

David KK, Andrabi SA, Dawson TM & Dawson VL (2009). Parthanatos, a messenger of death. *Front Biosci Landmark Ed* **14**, 1116–1128.

Davidson MB, Duran P, Lee ML & Friedman TC (2013). High-Dose Vitamin D Supplementation in People With Prediabetes and Hypovitaminosis D. *Diabetes Care* **36**, 260–266.





- Dawson A, Morris AD & Struthers AD (2005). The epidemiology of left ventricular hypertrophy in type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia* **48**, 1971–1979.
- Dawson-Hughes B, Harris SS & Dallal GE (1997). Plasma calcidiol, season, and serum parathyroid hormone concentrations in healthy elderly men and women. *Am J Clin Nutr* **65**, 67–71.
- De Rosa S, Arcidiacono B, Chiefari E, Brunetti A, Indolfi C & Foti DP (2018). Type 2 Diabetes Mellitus and Cardiovascular Disease: Genetic and Epigenetic Links. *Front Endocrinol*; DOI: 10.3389/fendo.2018.00002.
- DeFronzo RA & Tripathy D (2009). Skeletal Muscle Insulin Resistance Is the Primary Defect in Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* **32**, S157–S163.
- Delbridge LMD, Mellor KM, Taylor DJ & Gottlieb RA (2017). Myocardial stress and autophagy: mechanisms and potential therapies. *Nat Rev Cardiol*; DOI: 10.1038/nrcardio.2017.35.
- Deleskog A, Hilding A, Brismar K, Hamsten A, Efendic S & Östenson C-G (2012). Low serum 25-hydroxyvitamin D level predicts progression to type 2 diabetes in individuals with prediabetes but not with normal glucose tolerance. *Diabetologia* **55**, 1668–1678.
- DeLuca HF (2004). Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am J Clin Nutr* **80**, 1689S-1696S.
- Després J-P & Lemieux I (2006). Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature* **444**, 881–887.
- Devereux RB, Alonso DR, Lutas EM, Gottlieb GJ, Campo E, Sachs I & Reichek N (1986). Echocardiographic assessment of left ventricular hypertrophy: Comparison to necropsy findings. *Am J Cardiol* **57**, 450–458.
- Dillmann WH (1980). Diabetes Mellitus Induces Changes in Cardiac Myosin of the Rat. *Diabetes* **29**, 579–582.
- Donal E, Bergerot C, Thibault H, Ernande L, Loufoua J, Augeul L, Ovize M & Derumeaux G (2009). Influence of afterload on left ventricular radial and longitudinal systolic functions: a two-dimensional strain imaging study. *Eur J Echocardiogr J Work Group Echocardiogr Eur Soc Cardiol* **10**, 914–921.



Dong B, Yu QT, Dai HY, Gao YY, Zhou ZL, Zhang L, Jiang H, Gao F, Li SY, Zhang YH, Bian HJ, Liu CX, Wang N, Xu H, Pan CM, Song HD, Zhang C & Zhang Y (2012). Angiotensin-Converting Enzyme-2 Overexpression Improves Left Ventricular Remodeling and Function in a Rat Model of Diabetic Cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* **59**, 739–747.

Doroudi M, Chen J, Boyan BD & Schwartz Z (2014). New insights on membrane mediated effects of  $1\alpha,25$ -dihydroxy vitamin D3 signaling in the musculoskeletal system. *Steroids* **81**, 81–87.

Doroudi M, Schwartz Z & Boyan BD (2015). Membrane-mediated Actions of  $1,25$ -Dihydroxy Vitamin D3: A Review of the Roles of Phospholipase A2 Activating Protein and  $Ca^{2+}$ /Calmodulin-dependent Protein Kinase II. *J Steroid Biochem Mol Biol* **0**, 81–84.

Dorsch MP, Nemerovski CW, Ellingrod VL, Cowger JA, Dyke DB, Koelling TM, Wu AH, Aaronson KD, Simpson RU & Bleske BE (2014). Vitamin D Receptor Genetics on Extracellular Matrix Biomarkers and Hemodynamics in Systolic Heart Failure. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* **19**, 439–445.

Doucende G, Schuster I, Rupp T, Startun A, Dautat M, Obert P & Nottin S (2010). Kinetics of Left Ventricular Strains and Torsion During Incremental Exercise in Healthy Subjects Clinical Perspective. *Circ Cardiovasc Imaging* **3**, 586–594.

Dozio E, Briganti S, Vianello E, Dogliotti G, Barassi A, Malavazos AE, Ermetici F, Morriconi L, Sigrüener A, Schmitz G & Corsi Romanelli MM (2015). Epicardial adipose tissue inflammation is related to vitamin D deficiency in patients affected by coronary artery disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* **25**, 267–273.

Drosatos K, Bharadwaj KG, Lymperopoulos A, Ikeda S, Khan R, Hu Y, Agarwal R, Yu S, Jiang H, Steinberg SF, Blaner WS, Koch WJ & Goldberg IJ (2010). Cardiomyocyte lipids impair  $\beta$ -adrenergic receptor function via PKC activation. *Am J Physiol-Endocrinol Metab* **300**, E489–E499.

**E**delmann F, Gelbrich G, Düngen H-D, Fröhling S, Wachter R, Stahrenberg R, Binder L, Töpper A,

Lashki DJ, Schwarz S, Herrmann-Lingen C, Löffler M, Hasenfuss G, Halle M & Pieske B (2011). Exercise Training Improves Exercise Capacity and Diastolic Function in Patients With Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *J Am Coll Cardiol* **58**, 1780–1791.



- Edvardsen T, Helle-Valle T & Smiseth OA (2006). Systolic Dysfunction in Heart Failure with Normal Ejection Fraction: Speckle-Tracking Echocardiography. *Prog Cardiovasc Dis* **49**, 207–214.
- Edwards JL, Vincent A, Cheng T & Feldman EL (2008). Diabetic Neuropathy: Mechanisms to Management. *Pharmacol Ther* **120**, 1–34.
- Eguchi K & Nagai R (2017). Islet inflammation in type 2 diabetes and physiology. *J Clin Invest* **127**, 14–23.
- Elliott P, Andersson B, Arbustini E, Bilinska Z, Cecchi F, Charron P, Dubourg O, Kühl U, Maisch B, McKenna WJ, Monserrat L, Pankuweit S, Rapezzi C, Seferovic P, Tavazzi L & Keren A (2008). Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the european society of cardiology working group on myocardial and pericardial diseases. *Eur Heart J* **29**, 270–276.
- Enomoto M, Ishizu T, Seo Y, Kameda Y, Suzuki H, Shimano H, Kawakami Y & Aonuma K (2016). Myocardial dysfunction identified by three-dimensional speckle tracking echocardiography in type 2 diabetes patients relates to complications of microangiopathy. *J Cardiol* **68**, 282–287.
- Ernande L, Rietzschel ER, Bergerot C, De Buyzere ML, Schnell F, Groisne L, Ovize M, Croisille P, Moulin P, Gillebert TC & Derumeaux G (2010). Impaired Myocardial Radial Function in Asymptomatic Patients with Type 2 Diabetes Mellitus: A Speckle-Tracking Imaging Study. *J Am Soc Echocardiogr* **23**, 1266–1272.
- Esch BT & Warburton DER (2009). Left ventricular torsion and recoil: implications for exercise performance and cardiovascular disease. *J Appl Physiol* **106**, 362–369.
- Etten E van, Decallonne B, Verlinden L, Verstuyf A, Bouillon R & Mathieu C (2003). Analogs of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D3 as pluripotent immunomodulators. *J Cell Biochem* **88**, 223–226.
- European Food Safety Authority (2016). Dietary reference values for vitamin D. *EFSA J* **14**, e04547.
- Ezhilarasi K, Dhamodharan U & Vijay V (2018). BSM1 single nucleotide polymorphism in vitamin D receptor gene is associated with decreased circulatory levels of serum 25-hydroxyvitamin D among micro and macrovascular complications of type 2 diabetes mellitus. *Int J Biol Macromol* **116**, 346–353.



- Fagot-Campagna A, Romon I, Fosse S & Roudier C (2010). Prévalence et incidence du diabète, et mortalité liée au diabète en France – Synthèse épidémiologique. *Inst Veille Sanit* **12**.
- Fahy E, Subramaniam S, Brown HA, Glass CK, Merrill AH, Murphy RC, Raetz CRH, Russell DW, Seyama Y, Shaw W, Shimizu T, Spener F, Meer G van, VanNieuwenhze MS, White SH, Witztum JL & Dennis EA (2005). A comprehensive classification system for lipids. *J Lipid Res* **46**, 839–862.
- Fall T, Shiue I, Geijerstam PB af, Sundström J, Ärnlöv J, Larsson A, Melhus H, Lind L & Ingelsson E (2012). Relations of circulating vitamin D concentrations with left ventricular geometry and function. *Eur J Heart Fail* **14**, 985–991.
- Fan W & Evans R (2015). PPARs and ERRs: Molecular Mediators of Mitochondrial Metabolism. *Curr Opin Cell Biol* **33**, 49–54.
- Fang ZY, Leano R & Marwick TH (2004). Relationship between longitudinal and radial contractility in subclinical diabetic heart disease. *Clin Sci* **106**, 53–60.
- Feldman D, Krishnan AV, Swami S, Giovannucci E & Feldman BJ (2014). The role of vitamin D in reducing cancer risk and progression. *Nat Rev Cancer* **14**, 342–357.
- Fernández-Juárez G, Luño J, Barrio V, de Vinuesa SG, Praga M, Goicoechea M, Lahera V, Casas L & Oliva J (2013). 25 (OH) Vitamin D Levels and Renal Disease Progression in Patients with Type 2 Diabetic Nephropathy and Blockade of the Renin-Angiotensin System. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN* **8**, 1870–1876.
- Fetahu IS, Höbaus J & Kállay E (2014). Vitamin D and the epigenome. *Front Physiol*; DOI: 10.3389/fphys.2014.00164.
- Flannick J, Johansson S & Njølstad PR (2016). Common and rare forms of diabetes mellitus: towards a continuum of diabetes subtypes. *Nat Rev Endocrinol* **12**, 394–406.
- Forouhi NG, Ye Z, Rickard AP, Khaw KT, Luben R, Langenberg C & Wareham NJ (2012). Circulating 25-hydroxyvitamin D concentration and the risk of type 2 diabetes: results from the European Prospective Investigation into Cancer (EPIC)-Norfolk cohort and updated meta-analysis of prospective studies. *Diabetologia* **55**, 2173–2182.



Fox CS, Golden SH, Anderson C, Bray GA, Burke LE, Boer IH de, Deedwania P, Eckel RH, Ershow AG, Fradkin J, Inzucchi SE, Kosiborod M, Nelson RG, Patel MJ, Pignone M, Quinn L, Schauer PR, Selvin E & Vafiadis DK (2015). Update on Prevention of Cardiovascular Disease in Adults With Type 2 Diabetes Mellitus in Light of Recent Evidence. *Circulation* **132**, 691–718.

Frati G, Schirone L, Chimenti I, Yee D, Biondi-Zoccai G, Volpe M & Sciarretta S (2017). An overview of the inflammatory signalling mechanisms in the myocardium underlying the development of diabetic cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* **113**, 378–388.

Frustaci A, Kajstura J, Chimenti C, Jakoniuk I, Leri A, Maseri A, Nadal-Ginard B & Anversa P (2000). Myocardial Cell Death in Human Diabetes. *Circ Res* **87**, 1123–1132.

Fuchsberger C et al. (2016). The genetic architecture of type 2 diabetes. *Nature* **536**, 41–47.

**G**aborit B, Venteclef N, Ancel P, Pelloux V, Gariboldi V, Leprince P, Amour J, Hatem SN, Jouve E,

Dutour A & Clément K (2015). Human epicardial adipose tissue has a specific transcriptomic signature depending on its anatomical peri-atrial, peri-ventricular, or peri-coronary location. *Cardiovasc Res* **108**, 62–73.

Gagnon C, Daly RM, Carpentier A, Lu ZX, Shore-Lorenti C, Sikaris K, Jean S & Ebeling PR (2014). Effects of Combined Calcium and Vitamin D Supplementation on Insulin Secretion, Insulin Sensitivity and  $\beta$ -Cell Function in Multi-Ethnic Vitamin D-Deficient Adults at Risk for Type 2 Diabetes: A Pilot Randomized, Placebo-Controlled Trial. *PLoS ONE*; DOI: 10.1371/journal.pone.0109607.

Galderisi M, de Simone G, Inzucchi SE, Turco A, Turco S, Capaldo B, Riccardi G & de Zeeuw D (2007). Impaired inotropic response in type 2 diabetes mellitus: a strain rate imaging study. *Am J Hypertens* **20**, 548–555.

Galic S, Oakhill JS & Steinberg GR (2010). Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol* **316**, 129–139.

Galloway CA & Yoon Y (2015). Mitochondrial Dynamics in Diabetic Cardiomyopathy. *Antioxid Redox Signal* **22**, 1545–1562.



- Gao C-L, Zhu C, Zhao Y-P, Chen X-H, Ji C-B, Zhang C-M, Zhu J-G, Xia Z-K, Tong M-L & Guo X-R (2010). Mitochondrial dysfunction is induced by high levels of glucose and free fatty acids in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Cell Endocrinol* **320**, 25–33.
- Gardner DG, Chen S & Glenn DJ (2013). Vitamin D and the heart. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol* **305**, R969–R977.
- Gastaldelli A, Cusi K, Pettiti M, Hardies J, Miyazaki Y, Berria R, Buzzigoli E, Sironi AM, Cersosimo E, Ferrannini E & DeFronzo RA (2007). Relationship Between Hepatic/Visceral Fat and Hepatic Insulin Resistance in Nondiabetic and Type 2 Diabetic Subjects. *Gastroenterology* **133**, 496–506.
- Gastaldelli A, Miyazaki Y, Pettiti M, Matsuda M, Mahankali S, Santini E, DeFronzo RA & Ferrannini E (2002). Metabolic Effects of Visceral Fat Accumulation in Type 2 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* **87**, 5098–5103.
- Glenn DJ, Wang F, Nishimoto M, Cruz MC, Uchida Y, Holleran WM, Zhang Y, Yeghiazarians Y & Gardner DG (2011). A Murine Model of Isolated Cardiac Steatosis Leads to Cardiomyopathy. *Hypertension* **57**, 216–222.
- Goldstein BJ, Mahadev K, Wu X, Zhu L & Motoshima H (2005). Role of Insulin-Induced Reactive Oxygen Species in the Insulin Signaling Pathway. *Antioxid Redox Signal* **7**, 1021–1031.
- Gómez-Serrano M, Camafeita E, López JA, Rubio MA, Bretón I, García-Consuegra I, García-Santos E, Lago J, Sánchez-Pernaute A, Torres A, Vázquez J & Peral B (2016). Differential proteomic and oxidative profiles unveil dysfunctional protein import to adipocyte mitochondria in obesity-associated aging and diabetes. *Redox Biol* **11**, 415–428.
- Gorcsan J, Gulati VK, Mandarino WA & Katz WE (1996). Color-coded measures of myocardial velocity throughout the cardiac cycle by tissue Doppler imaging to quantify regional left ventricular function. *Am Heart J* **131**, 1203–1213.
- Govind S, Saha S, Brodin L-A, Ramesh SS, Arvind SR & Quintana M (2006). Impaired myocardial functional reserve in hypertension and diabetes mellitus without coronary artery disease: Searching for the possible link with congestive heart failure in the myocardial Doppler in diabetes (MYDID) study II. *Am J Hypertens* **19**, 851–857; discussion 858.



Green JJ, Robinson DA, Wilson GE, Simpson RU & Westfall MV (2006). Calcitriol modulation of cardiac contractile performance via protein kinase C. *J Mol Cell Cardiol* **41**, 350–359.

Gregg EW et al. (2016). Association of the magnitude of weight loss and changes in physical fitness with long-term cardiovascular disease outcomes in overweight or obese people with type 2 diabetes: a post-hoc analysis of the Look AHEAD randomised clinical trial., Association of the Magnitude of Weight Loss and Physical Fitness Change on Long-term CVD outcomes: The Look AHEAD Study. *Lancet Diabetes Endocrinol Lancet Diabetes Endocrinol* **4, 4**, 913, 913–921.

Greulich S, Maxhera B, Vandenplas G, Wiza DH de, Smiris K, Mueller H, Heinrichs J, Blumensatt M, Cuvelier C, Akhyari P, Ruige JB, Ouwens DM & Eckel J (2012). Secretory Products From Epicardial Adipose Tissue of Patients With Type 2 Diabetes Mellitus Induce Cardiomyocyte Dysfunction. *Circulation* **126**, 2324–2334.

Gupta GK, Agrawal T, DelCore MG, Mohiuddin SM & Agrawal DK (2012). Vitamin D Deficiency Induces Cardiac Hypertrophy and Inflammation in Epicardial Adipose Tissue in Hypercholesterolemic Swine. *Exp Mol Pathol* **93**, 82–90.

Gupta SK, Foinquinos A, Thum S, Remke J, Zimmer K, Bauters C, de Groote P, Boon RA, de Windt LJ, Preissl S, Hein L, Batkai S, Pinet F & Thum T (2016). Preclinical Development of a MicroRNA-Based Therapy for Elderly Patients With Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol* **68**, 1557–1571.

Gurses KM, Tokgozoglul L, Yalcin MU, Kocyigit D, Evranos B, Yorgun H, Sahiner L, Kaya EB, Kabakci G, Gurlek A, Ozer N & Aytemir K (2015). Epicardial Fat Thickness is Increased in Vitamin D Deficient Premenopausal Women and does not Decrease after Short-term Replacement. *J Atheroscler Thromb* **22**, 582–589.

**H**afstad AD, Nabeebaccus AA & Shah AM (2013). Novel aspects of ROS signalling in heart failure.

*Basic Res Cardiol* **108**, 359.

Hahn WS, Kuzmicic J, Burrill JS, Donoghue MA, Foncea R, Jensen MD, Lavandero S, Arriaga EA & Bernlohr DA (2014). Proinflammatory cytokines differentially regulate adipocyte



- mitochondrial metabolism, oxidative stress, and dynamics. *Am J Physiol - Endocrinol Metab* **306**, E1033–E1045.
- Halban PA, Polonsky KS, Bowden DW, Hawkins MA, Ling C, Mather KJ, Powers AC, Rhodes CJ, Sussel L & Weir GC (2014).  $\beta$ -Cell Failure in Type 2 Diabetes: Postulated Mechanisms and Prospects for Prevention and Treatment. *J Clin Endocrinol Metab* **99**, 1983–1992.
- Hammer S, Snel M, Lamb HJ, Jazet IM, van der Meer RW, Pijl H, Meinders EA, Romijn JA, de Roos A & Smit JWA (2008). Prolonged Caloric Restriction in Obese Patients With Type 2 Diabetes Mellitus Decreases Myocardial Triglyceride Content and Improves Myocardial Function. *J Am Coll Cardiol* **52**, 1006–1012.
- Haneda M, Utsunomiya K, Koya D, Babazono T, Moriya T, Makino H, Kimura K, Suzuki Y, Wada T, Ogawa S, Inaba M, Kanno Y, Shigematsu T, Masakane I, Tsuchiya K, Honda K, Ichikawa K & Shide K (2014). A new Classification of Diabetic Nephropathy 2014: a report from Joint Committee on Diabetic Nephropathy. *J Diabetes Investig* **6**, 242–246.
- Hankiewicz JH, Banke NH, Farjah M & Lewandowski ED (2010). Early Impairment of Transmural Principal Strains in the Left Ventricular Wall After Short-Term, High-Fat Feeding of Mice Predisposed to Cardiac Steatosis. *Circ Cardiovasc Imaging* **3**, 710–717.
- Harasim E, Stępek T, Konstantynowicz-Nowicka K, Baranowski M, Górski J & Chabowski A (2015). Myocardial Lipid Profiling During Time Course of High Fat Diet and its Relationship to the Expression of Fatty Acid Transporters. *Cell Physiol Biochem* **37**, 1147–1158.
- Hare JL, Hordern MD, Leano R, Stanton T, Prins JB & Marwick TH (2011). Application of an Exercise Intervention on the Evolution of Diastolic Dysfunction in Patients With Diabetes Mellitus: Efficacy and Effectiveness. *Circ Heart Fail* **4**, 441–449.
- Hauner H, Petruschke T, Russ M, Riihig K & Eckel J (1995). Effects of tumour necrosis factor alpha (TNF(x)) on glucose transport and lipid metabolism of newly-differentiated human fat cells in cell culture. *Diabetologia* **38**, 764–771.
- Haussler MR, Whitfield GK, Kaneko I, Haussler CA, Hsieh D, Hsieh J-C & Jurutka PW (2013). Molecular Mechanisms of Vitamin D Action. *Calcif Tissue Int* **92**, 77–98.





Haute Autorité de Santé (2013a). Stratégie médicamenteuse du contrôle glycémique du diabète de type 2, Recommandations.

Haute Autorité de Santé (2013b). Stratégie médicamenteuse du contrôle glycémique du diabète de type 2, Argumentaire.

Haute Autorité de Santé (2013c). Vitamine D - Note de cadrage.

Heaney RP, Dowell MS, Hale CA & Bendich A (2003). Calcium Absorption Varies within the Reference Range for Serum 25-Hydroxyvitamin D. *J Am Coll Nutr* **22**, 142–146.

Heidari B, Nargesi AA, Hafezi-Nejad N, Sheikhabaehi S, Pajouhi A, Nakhjavani M & Esteghamati A (2015). Assessment of serum 25-hydroxy vitamin D improves coronary heart disease risk stratification in patients with type 2 diabetes. *Am Heart J* **170**, 573-579.e5.

Helm S, Sylvia VL, Harmon T, Dean DD, Boyan BD & Schwartz Z (1996). 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> regulates protein kinase C through two distinct phospholipid-dependent mechanisms. *J Cell Physiol* **169**, 509–521.

Hendrick AM, Gibson MV & Kulshreshtha A (2015). Diabetic Retinopathy. *Prim Care Clin Off Pract* **42**, 451–464.

Hendrix I, Anderson P, May B & Morris H (2004). Regulation of gene expression by the CYP27B1 promoter—study of a transgenic mouse model. *J Steroid Biochem Mol Biol* **89–90**, 139–142.

Heng LZ, Comyn O, Peto T, Tadros C, Ng E, Sivaprasad S & Hykin PG (2013). Diabetic retinopathy: pathogenesis, clinical grading, management and future developments. *Diabet Med* **30**, 640–650.

Henry HL (2011). Regulation of vitamin D metabolism. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **25**, 531–541.

Herrmann M, Sullivan DR, Veillard A-S, McCorquodale T, Straub IR, Scott R, Laakso M, Topliss D, Jenkins AJ, Blankenberg S, Burton A & Keech AC (2015). Serum 25-Hydroxyvitamin D: A Predictor of Macrovascular and Microvascular Complications in Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* **38**, 521–528.

Ho CY (2006). A Clinician's Guide to Tissue Doppler Imaging. *Circulation* **113**, e396–e398.



- Ho JK, Zhou W, Ashraf M, Swaminathan M, Sahn D & Mahajan A (2013). Effect of Pharmacologic Increases in Afterload on Left Ventricular Rotation and Strain in a Rabbit Model. *J Am Soc Echocardiogr* **26**, 674–682.
- Hodson AE, Tippetts TS & Bikman BT (2015). Insulin treatment increases myocardial ceramide accumulation and disrupts cardiometabolic function. *Cardiovasc Diabetol*; DOI: 10.1186/s12933-015-0316-y.
- Hodson K, Man CD, Smith FE, Thelwall PE, Cobelli C, Robson SC & Taylor R (2013). Mechanism of Insulin Resistance in Normal Pregnancy. *Horm Metab Res* **45**, 567–571.
- Hoffmann A & Spengler D (2015). Role of ZAC1 in transient neonatal diabetes mellitus and glucose metabolism. *World J Biol Chem* **6**, 95–109.
- Holick MF & Chen TC (2008). Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. *Am J Clin Nutr* **87**, 1080S-1086S.
- Holland DJ, Marwick TH, Haluska BA, Leano R, Hordern MD, Hare JL, Fang ZY, Prins JB & Stanton T (2015). Subclinical LV dysfunction and 10-year outcomes in type 2 diabetes mellitus. *Heart Br Card Soc* **101**, 1061–1066.
- Holland WL, Miller RA, Wang ZV, Sun K, Barth BM, Bui HH, Davis KE, Bikman BT, Halberg N, Rutkowski JM, Wade MR, Tenorio VM, Kuo M-S, Brozinick JT, Zhang BB, Birnbaum MJ, Summers SA & Scherer PE (2011). The Pleiotropic Actions of Adiponectin are Initiated via Receptor-Mediated Activation of Ceramidase Activity. *Nat Med* **17**, 55–63.
- Hordern MD, Coombes JS, Cooney LM, Jeffriess L, Prins JB & Marwick TH (2009). Effects of exercise intervention on myocardial function in type 2 diabetes. *Heart* **95**, 1343–1349.
- Hsieh J-C, Shimizu Y, Minoshima S, Shimizu N, Haussler CA, Jurutka PW & Haussler MR (1998). Novel nuclear localization signal between the two DNA-binding zinc fingers in the human vitamin D receptor. *J Cell Biochem* **70**, 94–109.
- Huang Z-P & Wang D-Z (2014). miR-22 in cardiac remodeling and disease. *Trends Cardiovasc Med* **24**, 267–272.
- Hyppönen E, Läärä E, Reunanen A, Järvelin M-R & Virtanen SM (2001). Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study. *The Lancet* **358**, 1500–1503.



Iacobellis G (2015). Local and systemic effects of the multifaceted epicardial adipose tissue depot.

*Nat Rev Endocrinol* **11**, 363–371.

Iacobellis G, Ribaldo MC, Assael F, Vecci E, Tiberti C, Zappaterreno A, Di Mario U & Leonetti F (2003). Echocardiographic Epicardial Adipose Tissue Is Related to Anthropometric and Clinical Parameters of Metabolic Syndrome: A New Indicator of Cardiovascular Risk. *J Clin Endocrinol Metab* **88**, 5163–5168.

Iacobellis G, Ribaldo MC, Zappaterreno A, Iannucci CV & Leonetti F (2004). Relation between epicardial adipose tissue and left ventricular mass. *Am J Cardiol* **94**, 1084–1087.

Iacobellis G & Willens HJ (2009). Echocardiographic Epicardial Fat: A Review of Research and Clinical Applications. *J Am Soc Echocardiogr* **22**, 1311–1319.

Ibrahim MM (2010). Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obes Rev* **11**, 11–18.

Innocenti F, Bartalucci F, Boni V, Vicidomini S, Mannucci E, Monami M & Pini R (2014). Coronary artery disease screening in type II diabetic patients: Prognostic value of rest and stress echocardiography. *Diabetes Metab Syndr Clin Res Rev* **8**, 18–23.

International Diabetes Federation (2017a). IDF Clinical Practice Recommendations for managing Type 2 Diabetes in Primary Care.

International Diabetes Federation (2017b). IDF Diabetes Atlas. Available at: <http://diabetesatlas.org/resources/2017-atlas.html>.

Inzucchi SE, Bergenstal RM, Buse JB, Diamant M, Ferrannini E, Nauck M, Peters AL, Tsapas A, Wender R & Matthews DR (2015). Management of hyperglycaemia in type 2 diabetes, 2015: a patient-centred approach. Update to a Position Statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetologia* **58**, 429–442.

Iribarren C, Karter AJ, Go AS, Ferrara A, Liu JY, Sidney S & Selby JV (2001). Glycemic Control and Heart Failure Among Adult Patients With Diabetes. 6.



Ish-Shalom S, Segal E, Salganik T, Raz B, Bromberg IL & Vieth R (2008). Comparison of Daily, Weekly, and Monthly Vitamin D3 in Ethanol Dosing Protocols for Two Months in Elderly Hip Fracture Patients. *J Clin Endocrinol Metab* **93**, 3430–3435.

Jamal F, Strotmann J, Weidemann F, Kukulski T, D'hooge J, Bijmens B, Werf FV de, Scheerder ID & Sutherland GR (2001). Noninvasive Quantification of the Contractile Reserve of Stunned Myocardium by Ultrasonic Strain Rate and Strain. *Circulation* **104**, 1059–1065.

Jia G, DeMarco VG & Sowers JR (2016). Insulin resistance and hyperinsulinaemia in diabetic cardiomyopathy. *Nat Rev Endocrinol* **12**, 144–153.

Jin ES, Szuszkiewicz-Garcia M, Browning JD, Baxter JD, Abate N & Malloy CR (2015). Influence of Liver Triglycerides on Suppression of Glucose Production by Insulin in Men. *J Clin Endocrinol Metab* **100**, 235–243.

Joergensen C, Gall M-A, Schmedes A, Tarnow L, Parving H-H & Rossing P (2010). Vitamin D Levels and Mortality in Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* **33**, 2238–2243.

Jones KS, Assar S, Harnpanich D, Bouillon R, Lambrechts D, Prentice A & Schoenmakers I (2014). 25(OH)D2 Half-Life Is Shorter Than 25(OH)D3 Half-Life and Is Influenced by DBP Concentration and Genotype. *J Clin Endocrinol Metab* **99**, 3373–3381.

Jørgensen PG, Jensen MT, Mogelvang R, von Scholten BJ, Bech J, Fritz-Hansen T, Galatius S, Biering-Sørensen T, Andersen HU, Vilsbøll T, Rossing P & Jensen JS (2016). Abnormal echocardiography in patients with type 2 diabetes and relation to symptoms and clinical characteristics. *Diab Vasc Dis Res* **13**, 321–330.

Joubert M, Manrique A, Cariou B & Prieur X (2018). Diabetes-related cardiomyopathy: The sweet story of glucose overload from epidemiology to cellular pathways. *Diabetes Metab*; DOI: 10.1016/j.diabet.2018.07.003.

Jung C-H, Jung S-H, Kim K-J, Kim B-Y, Kim C-H, Kang S-K & Mok J-O (2015). The relationship between vitamin D status and cardiac autonomic neuropathy in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diab Vasc Dis Res* **12**, 342–351.



Jung C-H, Kim K-J, Kim B-Y, Kim C-H, Kang SK & Mok J-O (2016). Relationship between vitamin D status and vascular complications in patients with type 2 diabetes mellitus. *Nutr Res* **36**, 117–124.

**K**ahn SE, Cooper ME & Del Prato S (2014). Pathophysiology And Treatment Of Type 2 Diabetes: Perspectives On The Past, Present And Future. *Lancet* **383**, 1068–1083.

Kahn SE, Hull RL & Utzschneider KM (2006). Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* **444**, 840–846.

Kain V & Halade GV (2017). Metabolic and Biochemical Stressors in Diabetic Cardiomyopathy. *Front Cardiovasc Med*; DOI: 10.3389/fcvm.2017.00031.

Kamen DL & Tangpricha V (2010). Vitamin D and molecular actions on the immune system: modulation of innate and autoimmunity. *J Mol Med Berl Ger* **88**, 441–450.

Kampmann U, Mosekilde L, Juhl C, Moller N, Christensen B, Rejnmark L, Wamberg L & Orskov L (2014). Effects of 12weeks high dose vitamin D3 treatment on insulin sensitivity, beta cell function, and metabolic markers in patients with type 2 diabetes and vitamin D insufficiency – a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Metabolism* **63**, 1115–1124.

Kannel WB, Hjortland M & Castelli WP (1974). Role of diabetes in congestive heart failure: The Framingham study. *Am J Cardiol* **34**, 29–34.

Karagöz A, Bezgin T, Kutlutürk I, Külahçioğlu S, Tanboğa IH, Güler A, Karabay CY, Oduncu V, Aksoy H & Kirma C (2014). Subclinical left ventricular systolic dysfunction in diabetic patients and its association with retinopathy. *Herz* **40**, 240–246.

Kayama Y, Raaz U, Jagger A, Adam M, Schellinger IN, Sakamoto M, Suzuki H, Toyama K, Spin JM & Tsao PS (2015). Diabetic Cardiovascular Disease Induced by Oxidative Stress. *Int J Mol Sci* **16**, 25234–25263.

Kazlauskaite R, Doukky R, Evans A, Margeta B, Ruchi A, Fogelfeld L & Kelly RF (2010). Predictors of diastolic dysfunction among minority patients with newly diagnosed type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* **88**, 189–195.



- Khan H, Kunutsor S, Franco OH & Chowdhury R (2013). Vitamin D, type 2 diabetes and other metabolic outcomes: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Proc Nutr Soc* **72**, 89–97.
- Kiencke S, Handschin R, Dahlen R von, Muser J, Brunner-LaRocca HP, Schumann J, Felix B, Berneis K & Rickenbacher P (2010). Pre-clinical diabetic cardiomyopathy: prevalence, screening, and outcome. *Eur J Heart Fail* **12**, 951–957.
- Kim IM, Norris KC & Artaza JN (2016). Chapter Twelve - Vitamin D and Cardiac Differentiation. In *Vitamins & Hormones*, ed. Litwack G, Vitamin D Hormone, pp. 299–320. Academic Press. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0083672915000606> [Accessed September 30, 2018].
- Kinno M, Nagpal P, Horgan S & Waller AH (2017). Comparison of Echocardiography, Cardiac Magnetic Resonance, and Computed Tomographic Imaging for the Evaluation of Left Ventricular Myocardial Function: Part 1 (Global Assessment). *Curr Cardiol Rep* **19**, 9.
- Kissebah AH (1996). Intra-abdominal fat: is it a major factor in developing diabetes and coronary artery disease? *Diabetes Res Clin Pract* **30**, S25–S30.
- Klötting N, Fasshauer M, Dietrich A, Kovacs P, Schön MR, Kern M, Stumvoll M & Blüher M (2010). Insulin-sensitive obesity. *Am J Physiol-Endocrinol Metab* **299**, E506–E515.
- Kobayashi S & Liang Q (2015). Autophagy and mitophagy in diabetic cardiomyopathy. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis* **1852**, 252–261.
- Kolek OI, Hines ER, Jones MD, LeSueur LK, Lipko MA, Kiela PR, Collins JF, Haussler MR & Ghishan FK (2005).  $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> upregulates FGF23 gene expression in bone: the final link in a renal-gastrointestinal-skeletal axis that controls phosphate transport. *Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol* **289**, G1036–G1042.
- Kolwicz SC, Purohit S & Tian R (2013). Cardiac Metabolism and Its Interactions with Contraction, Growth, and Survival of the Cardiomyocyte. *Circ Res*; DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.113.302095.
- Korinek J, Wang J, Sengupta PP, Miyazaki C, Kjaergaard J, McMahon E, Abraham TP & Belohlavek M (2005). Two-Dimensional Strain—A Doppler-Independent Ultrasound Method for



- Quantitation of Regional Deformation: Validation In Vitro and In Vivo. *J Am Soc Echocardiogr* **18**, 1247–1253.
- Kosmala W, Sanders P & Marwick TH (2017). Subclinical Myocardial Impairment in Metabolic Diseases. *JACC Cardiovasc Imaging* **10**, 692–703.
- Koves TR, Ussher JR, Noland RC, Slentz D, Mosedale M, Ilkayeva O, Bain J, Stevens R, Dyck JRB, Newgard CB, Lopaschuk GD & Muoio DM (2008). Mitochondrial Overload and Incomplete Fatty Acid Oxidation Contribute to Skeletal Muscle Insulin Resistance. *Cell Metab* **7**, 45–56.
- Krishnan J, Danzer C, Simka T, Ukropec J, Walter KM, Kumpf S, Mirtschink P, Ukropcova B, Gasperikova D, Pedrazzini T & Krek W (2012). Dietary obesity-associated Hif1 $\alpha$  activation in adipocytes restricts fatty acid oxidation and energy expenditure via suppression of the Sirt2-NAD<sup>+</sup> system. *Genes Dev* **26**, 259–270.
- Krul-Poel YHM, Westra S, Boekel E ten, Wee MM ter, Schoor NM van, Wijland H van, Stam F, Lips PTAM & Simsek S (2015). Effect of Vitamin D Supplementation on Glycemic Control in Patients With Type 2 Diabetes (SUNNY Trial): A Randomized Placebo-Controlled Trial. *Diabetes Care* **38**, 1420–1426.
- Kubli DA & Gustafsson ÅB (2015). Unbreak My Heart: Targeting Mitochondrial Autophagy in Diabetic Cardiomyopathy. *Antioxid Redox Signal* **22**, 1527–1544.
- Kusminski CM, Bickel PE & Scherer PE (2016). Targeting adipose tissue in the treatment of obesity-associated diabetes. *Nat Rev Drug Discov* **15**, 639–660.
- Kusminski CM & Scherer PE (2012). Mitochondrial dysfunction in white adipose tissue. *Trends Endocrinol Metab* **23**, 435–443.
- L**ancellotti P, Pellikka PA, Budts W, Chaudhry FA, Donal E, Dulgheru R, Edvardsen T, Garbi M, Ha J-W, Kane GC, Kreeger J, Mertens L, Pibarot P, Picano E, Ryan T, Tsutsui JM & Varga A (2016). The clinical use of stress echocardiography in non-ischaemic heart disease: recommendations from the European Association of Cardiovascular Imaging and the American Society of Echocardiography. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging* **17**, 1191–1229.



- Lang RM, Badano LP, Mor-Avi V, Afilalo J, Armstrong A, Ernande L, Flachskampf FA, Foster E, Goldstein SA, Kuznetsova T, Lancellotti P, Muraru D, Picard MH, Rietzschel ER, Rudski L, Spencer KT, Tsang W & Voigt J-U (2015a). Recommendations for Cardiac Chamber Quantification by Echocardiography in Adults: An Update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging* **16**, 233–271.
- Lang RM, Badano LP, Mor-Avi V, Afilalo J, Armstrong A, Ernande L, Flachskampf FA, Foster E, Goldstein SA, Kuznetsova T, Lancellotti P, Muraru D, Picard MH, Rietzschel ER, Rudski L, Spencer KT, Tsang W & Voigt J-U (2015b). 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* **28**, 1-39.e14.
- Lang RM, Borow KM, Neumann A & Janzen D (1986). Systemic vascular resistance: an unreliable index of left ventricular afterload. *Circulation* **74**, 1114–1123.
- Laurencikiene J, Harmelen V van, Nordström EA, Dicker A, Blomqvist L, Näslund E, Langin D, Arner P & Rydén M (2007). NF-κB is important for TNF-α-induced lipolysis in human adipocytes. *J Lipid Res* **48**, 1069–1077.
- Lee H-S (2015). Impact of Maternal Diet on the Epigenome during In Utero Life and the Developmental Programming of Diseases in Childhood and Adulthood. *Nutrients* **7**, 9492–9507.
- Lee J-I, Oh S-J, Ha W-C, Kwon H-S, Sohn T-S, Son H-S & Cha B-Y (2012). Serum 25-hydroxyvitamin D concentration and arterial stiffness among type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* **95**, 42–47.
- Lee T-I, Kao Y-H, Chen Y-C, Tsai W-C, Chung C-C & Chen Y-J (2014a). Cardiac metabolism, inflammation, and peroxisome proliferator-activated receptors modulated by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in diabetic rats. *Int J Cardiol* **176**, 151–157.
- Lee T-W, Kao Y-H, Lee T-I, Chang C-J, Lien G-S & Chen Y-J (2014b). Calcitriol modulates receptor for advanced glycation end products (RAGE) in diabetic hearts. *Int J Cardiol* **173**, 236–241.





- Lee T-W, Lee T-I, Chang C-J, Lien G-S, Kao Y-H, Chao T-F & Chen Y-J (2015). Potential of vitamin D in treating diabetic cardiomyopathy. *Nutr Res* **35**, 269–279.
- Leem J & Koh EH (2012). Interaction between Mitochondria and the Endoplasmic Reticulum: Implications for the Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus. *Exp Diabetes Res*; DOI: 10.1155/2012/242984.
- Lessard J, Laforest S, Pelletier M, Leboeuf M, Blackburn L & Tchernof A (2014). Low abdominal subcutaneous preadipocyte adipogenesis is associated with visceral obesity, visceral adipocyte hypertrophy, and a dysmetabolic state. *Adipocyte* **3**, 197–205.
- Leung PS (2016). The Potential Protective Action of Vitamin D in Hepatic Insulin Resistance and Pancreatic Islet Dysfunction in Type 2 Diabetes Mellitus. *Nutrients* **8**, 147.
- Levelt E, Pavlides M, Banerjee R, Mahmood M, Kelly C, Sellwood J, Ariga R, Thomas S, Francis J, Rodgers C, Clarke W, Sabharwal N, Antoniadou C, Schneider J, Robson M, Clarke K, Karamitsos T, Rider O & Neubauer S (2016). Ectopic and Visceral Fat Deposition in Lean and Obese Patients With Type 2 Diabetes. *J Am Coll Cardiol* **68**, 53–63.
- Lewis GF, Carpentier A, Adeli K & Giacca A (2002). Disordered Fat Storage and Mobilization in the Pathogenesis of Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. *Endocr Rev* **23**, 201–229.
- Li YC, Kong J, Wei M, Chen Z-F, Liu SQ & Cao L-P (2002). 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system. *J Clin Invest* **110**, 229–238.
- Lima TI, Valentim RR, Araújo HN, Oliveira AG, Favero BC, Menezes ES, Araújo R & Silveira LR (2018). Role of NCoR1 in mitochondrial function and energy metabolism. *Cell Biol Int* **42**, 734–741.
- Lisse TS, Adams JS & Hewison M (2013). Vitamin D and MicroRNAs in Bone. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **23**, 195–214.
- Listenberger LL, Han X, Lewis SE, Cases S, Farese RV, Ory DS & Schaffer JE (2003). Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proc Natl Acad Sci* **100**, 3077–3082.
- Liu GX, Hanley PJ, Ray J & Daut; (2001). Long-Chain Acyl-Coenzyme A Esters and Fatty Acids Directly Link Metabolism to KATP Channels in the Heart. *Circ Res* **88**, 918–924.



Liu J-H, Chen Y, Yuen M, Zhen Z, Chan CW-S, Lam KS-L, Tse H-F & Yiu K-H (2016). Incremental prognostic value of global longitudinal strain in patients with type 2 diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol*; DOI: 10.1186/s12933-016-0333-5.

Liu L, Shi X, Bharadwaj KG, Ikeda S, Yamashita H, Yagy H, Schaffer JE, Yu Y-H & Goldberg IJ (2009). DGAT1 Expression Increases Heart Triglyceride Content but Ameliorates Lipotoxicity. *J Biol Chem* **284**, 36312–36323.

Liu L, Yu S, Khan RS, Ables GP, Bharadwaj KG, Hu Y, Huggins LA, Eriksson JW, Buckett LK, Turnbull AV, Ginsberg HN, Blaner WS, Huang L-S & Goldberg IJ (2011). DGAT1 deficiency decreases PPAR expression and does not lead to lipotoxicity in cardiac and skeletal muscle. *J Lipid Res* **52**, 732–744.

Liu S, Tang W, Zhou J, Stubbs JR, Luo Q, Pi M & Quarles LD (2006). Fibroblast Growth Factor 23 Is a Counter-Regulatory Phosphaturic Hormone for Vitamin D. *J Am Soc Nephrol* **17**, 1305–1315.

Long SD & Pekala PH (1996). Regulation of GLUT4 mRNA Stability by Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ : Alterations in Both Protein Binding to the 3' Untranslated Region and Initiation of Translation. *Biochem Biophys Res Commun* **220**, 949–953.

Lotta LA et al. (2017). Integrative genomic analysis implicates limited peripheral adipose storage capacity in the pathogenesis of human insulin resistance. *Nat Genet* **49**, 17–26.

**M**a M et al. (2018). Bidirectional modulation of insulin action by reactive oxygen species in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Med Rep*; DOI: 10.3892/mmr.2018.9016.

Maassen JA, Hart LM 't, Essen E van, Heine RJ, Nijpels G, Tafrechi RSJ, Raap AK, Janssen GMC & Lemkes HHPJ (2004). Mitochondrial Diabetes: Molecular Mechanisms and Clinical Presentation. *Diabetes* **53**, S103–S109.

Machackova J, Liu X, Lukas A & Dhalla NS (2004). Renin–angiotensin blockade attenuates cardiac myofibrillar remodelling in chronic diabetes. *Mol Cell Biochem* **261**, 271–278.

Maia J, da Silva AS, do Carmo RF, de Mendonça TF, Griz LHM, Moura P & Bandeira F (2016). The association between vitamin D receptor gene polymorphisms (TaqI and FokI), Type 2



- diabetes, and micro-/macrovascular complications in postmenopausal women. *Appl Clin Genet* **9**, 131–136.
- Malhotra A, Penpargkul S, Fein FS, Sonnenblick EH & Scheuer J (1981). The effect of streptozotocin-induced diabetes in rats on cardiac contractile proteins. *Circ Res* **49**, 1243–1250.
- Mandavia CH, Aroor AR, DeMarco VG & Sowers JR (2013). Molecular and Metabolic Mechanisms of Cardiac Dysfunction in Diabetes. *Life Sci* **92**, 601–608.
- Marwick TH, Case C, Sawada S, Vasey C, Short L & Lauer M (2002). Use of Stress Echocardiography to Predict Mortality in Patients With Diabetes and Known or Suspected Coronary Artery Disease. *Diabetes Care* **25**, 1042–1048.
- Marwick TH, Ritchie R, Shaw JE & Kaye D (2018). Implications of Underlying Mechanisms for the Recognition and Management of Diabetic Cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* **71**, 339–351.
- Maser RE, Lenhard MJ & Pohlig RT (2015). VITAMIN D INSUFFICIENCY IS ASSOCIATED WITH REDUCED PARASYMPATHETIC NERVE FIBER FUNCTION IN TYPE 2 DIABETES. *Endocr Pract Off J Am Coll Endocrinol Am Assoc Clin Endocrinol* **21**, 174–181.
- Mathieu C (2015). Vitamin D and diabetes: Where do we stand? *Diabetes Res Clin Pract* **108**, 201–209.
- Mathieu C & Adorini L (2002). The coming of age of 1,25-dihydroxyvitamin D3 analogs as immunomodulatory agents. *Trends Mol Med* **8**, 174–179.
- Matloch Z, Kotulák T & Haluzík M (2016). The role of epicardial adipose tissue in heart disease. *Physiol Res* **65**, 23–32.
- Matloch Z, Kratochvílová H, Cinkajzlová A, Lipš M, Kopecký P, Pořízka M, Haluzíková D, Lindner J, Mráz M, Kloučková J, Lacinová Z & Haluzík M (2018). Changes in omentin levels and its mRNA expression in epicardial adipose tissue in patients undergoing elective cardiac surgery: the influence of type 2 diabetes and coronary heart disease. *Physiol Res*.
- Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF & Turner RC (1985). Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* **28**, 412–419.



- Mazzone G, Morisco C, Lembo V, D'Argenio G, D'Armiento M, Rossi A, Giudice CD, Trimarco B, Caporaso N & Morisco F (2018). Dietary supplementation of vitamin D prevents the development of western diet-induced metabolic, hepatic and cardiovascular abnormalities in rats. *United Eur Gastroenterol J* **6**, 1056–1064.
- van der Meer RW, Rijzewijk LJ, Diamant M, Hammer S, Schar M, Bax JJ, Smit JWA, Romijn JA, de Roos A & Lamb HJ (2008). The ageing male heart: myocardial triglyceride content as independent predictor of diastolic function. *Eur Heart J* **29**, 1516–1522.
- Merino J, Udler MS, Leong A & Meigs JB (2017). A Decade of Genetic and Metabolomic Contributions to Type 2 Diabetes Risk Prediction. *Curr Diab Rep* **17**, 135.
- Miki T, Yuda S, Kouzu H & Miura T (2013). Diabetic cardiomyopathy: pathophysiology and clinical features. *Heart Fail Rev* **18**, 149–166.
- Mishra PK, Ying W, Nandi SS, Bandyopadhyay GK, Patel KK & Mahata SK (2017). Diabetic Cardiomyopathy: An Immunometabolic Perspective. *Front Endocrinol*; DOI: 10.3389/fendo.2017.00072.
- Miyazaki Y, Glass L, Triplitt C, Wajcberg E, Mandarino LJ & DeFronzo RA (2002). Abdominal fat distribution and peripheral and hepatic insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. *Am J Physiol-Endocrinol Metab* **283**, E1135–E1143.
- Moir S, Hanekom L, Fang Z, Haluska B, Wong C, Burgess M & Marwick TH (2006). Relationship between myocardial perfusion and dysfunction in diabetic cardiomyopathy: a study of quantitative contrast echocardiography and strain rate imaging. *Heart* **92**, 1414–1419.
- Mor-Avi V, Lang RM, Badano LP, Belohlavek M, Cardim NM, Derumeaux G, Galderisi M, Marwick T, Nagueh SF, Sengupta PP, Sicari R, Smiseth OA, Smulevitz B, Takeuchi M, Thomas JD, Vannan M, Voigt J-U & Zamorano JL (2011). Current and Evolving Echocardiographic Techniques for the Quantitative Evaluation of Cardiac Mechanics: ASE/EAE Consensus Statement on Methodology and Indications: Endorsed by the Japanese Society of Echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr* **24**, 277–313.
- Morris AP et al. (2012). Large-scale association analysis provides insights into the genetic architecture and pathophysiology of type 2 diabetes. *Nat Genet* **44**, 981–990.



Moukayed M & Grant WB (2013). Molecular Link between Vitamin D and Cancer Prevention. *Nutrients* **5**, 3993–4021.

Moukayed M & Grant WB (2017). The roles of UVB and vitamin D in reducing risk of cancer incidence and mortality: A review of the epidemiology, clinical trials, and mechanisms. *Rev Endocr Metab Disord* **18**, 167–182.

Murai D, Yamada S, Hayashi T, Okada K, Nishino H, Nakabachi M, Yokoyama S, Abe A, Ichikawa A, Ono K, Kaga S, Iwano H, Mikami T & Tsutsui H (2016). Relationships of left ventricular strain and strain rate to wall stress and their afterload dependency. *Heart Vessels* **32**, 574–583.

Murphy R, Ellard S & Hattersley AT (2008). Clinical implications of a molecular genetic classification of monogenic  $\beta$ -cell diabetes. *Nat Rev Endocrinol* **4**, 200.

**N**agarajan V, Gopalan V, Kaneko M, Angeli V, Gluckman P, Richards AM, Kuchel PW & Velan SS (2013). Cardiac function and lipid distribution in rats fed a high-fat diet: in vivo magnetic resonance imaging and spectroscopy. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol* **304**, H1495–H1504.

Nagueh SF, Bierig SM, Budoff MJ, Desai M, Dilsizian V, Eidem B, Goldstein SA, Hung J, Maron MS, Ommen SR & Woo A (2011). American Society of Echocardiography Clinical Recommendations for Multimodality Cardiovascular Imaging of Patients with Hypertrophic Cardiomyopathy: Endorsed by the American Society of Nuclear Cardiology, Society for Cardiovascular Magnetic Resonance, and Society of Cardiovascular Computed Tomography. *J Am Soc Echocardiogr* **24**, 473–498.

Nagueh SF, Smiseth OA, Appleton CP, Byrd BF, Dokainish H, Edvardsen T, Flachskampf FA, Gillebert TC, Klein AL, Lancellotti P, Marino P, Oh JK, Popescu BA & Waggoner AD (2016). 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* **29**, 277–314.

Nakai H, Takeuchi M, Nishikage T, Lang RM & Otsuji Y (2009). Subclinical left ventricular dysfunction in asymptomatic diabetic patients assessed by two-dimensional speckle tracking echocardiography: correlation with diabetic duration. *Eur Heart J - Cardiovasc Imaging* **10**, 926–932.



- Nakanishi T & Kato S (2014). Impact of diabetes mellitus on myocardial lipid deposition: An autopsy study. *Pathol - Res Pract* **210**, 1018–1025.
- Nazar CMJ (2014). Diabetic nephropathy; principles of diagnosis and treatment of diabetic kidney disease. *J Nephro pharmacology* **3**, 15–20.
- NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC) (2016). Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4.4 million participants. *Lancet Lond Engl* **387**, 1513–1530.
- Newsholme P, Cruzat VF, Keane KN, Carlessi R & Bittencourt PIH de (2016). Molecular mechanisms of ROS production and oxidative stress in diabetes. *Biochem J* **473**, 4527–4550.
- Ng ACT, Delgado V, Bertini M, van der Meer RW, Rijzewijk LJ, Shanks M, Nucifora G, Smit JWA, Diamant M, Romijn JA, de Roos A, Leung DY, Lamb HJ & Bax JJ (2009). Findings from Left Ventricular Strain and Strain Rate Imaging in Asymptomatic Patients With Type 2 Diabetes Mellitus. *Am J Cardiol* **104**, 1398–1401.
- Ng ACT, Strudwick M, van der Geest RJ, Ng ACC, Gillinder L, Goo SY, Cowin G, Delgado V, Wang WYS & Bax JJ (2018). Impact of Epicardial Adipose Tissue, Left Ventricular Myocardial Fat Content, and Interstitial Fibrosis on Myocardial Contractile Function. *Circ Cardiovasc Imaging*. Available at: <https://www.ahajournals.org/doi/full/10.1161/CIRCIMAGING.117.007372> [Accessed October 29, 2018].
- Nguyen MTA, Satoh H, Favelyukis S, Babendure JL, Imamura T, Sbodio JI, Zalevsky J, Dahiyat BI, Chi N-W & Olefsky JM (2005). JNK and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Mediate Free Fatty Acid-induced Insulin Resistance in 3T3-L1 Adipocytes. *J Biol Chem* **280**, 35361–35371.
- Nikitin NP & Witte KKA (2004). Application of Tissue Doppler Imaging in Cardiology. *Cardiology* **101**, 170–184.
- Norman AW (2006). Vitamin D Receptor: New Assignments for an Already Busy Receptor. *Endocrinology* **147**, 5542–5548.
- Norman AW, Frankel JB, Heldt AM & Grodsky GM (1980). Vitamin D deficiency inhibits pancreatic secretion of insulin. *Science* **209**, 823–825.
- Norman PE & Powell JT (2014). Vitamin D and Cardiovascular Disease. *Circ Res* **114**, 379–393.



Notomi Y, Martin-Miklovic MG, Oryszak SJ, Shiota T, Deserranno D, Popovic ZB, Garcia MJ, Greenberg NL & Thomas JD (2006). Enhanced Ventricular Untwisting During Exercise. *Circulation* **113**, 2524–2533.

Nyomba BL, Bouillon R & De Moor P (1984). Influence of Vitamin D Status on Insulin Secretion and Glucose Tolerance in the Rabbit. *Endocrinology* **115**, 191–197.

**O**uwens DM, Boer C, Fodor M, de Galan P, Heine RJ, Maassen JA & Diamant M (2005). Cardiac dysfunction induced by high-fat diet is associated with altered myocardial insulin signalling in rats. *Diabetologia* **48**, 1229–1237.

Ouwens DM, Diamant M, Fodor M, Habets DDJ, Pelsers MMAL, El Hasnaoui M, Dang ZC, van den Brom CE, Vlasblom R, Rietdijk A, Boer C, Coort SLM, Glatz JFC & Luiken JJFP (2007). Cardiac contractile dysfunction in insulin-resistant rats fed a high-fat diet is associated with elevated CD36-mediated fatty acid uptake and esterification. *Diabetologia* **50**, 1938–1948.

**P**alomer X, González-Clemente JM, Blanco-Vaca F & Mauricio D (2008). Role of vitamin D in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Obes Metab* **10**, 185–197.

Pappachan JM, Varughese GI, Sriraman R & Arunagirinathan G (2013). Diabetic cardiomyopathy: Pathophysiology, diagnostic evaluation and management. *World J Diabetes* **4**, 177–189.

Park M, Wu D, Park T, Choi C, Li R-K, Cheng KKY, Xu A & Sweeney G (2013). APPL1 transgenic mice are protected from high-fat diet-induced cardiac dysfunction. *Am J Physiol-Endocrinol Metab* **305**, E795–E804.

Park SK, Garland CF, Gorham ED, BuDoff L & Barrett-Connor E (2018). Plasma 25-hydroxyvitamin D concentration and risk of type 2 diabetes and pre-diabetes: 12-year cohort study. *PLoS ONE*; DOI: 10.1371/journal.pone.0193070.

Park S-Y, Cho Y-R, Kim H-J, Higashimori T, Danton C, Lee M-K, Dey A, Rothermel B, Kim Y-B, Kalinowski A, Russell KS & Kim JK (2005). Unraveling the Temporal Pattern of Diet-Induced Insulin Resistance in Individual Organs and Cardiac Dysfunction in c57bl/6 Mice. *Diabetes* **54**, 3530–3540.



- Park T-S & Goldberg IJ (2012). Sphingolipids, Lipotoxic Cardiomyopathy, and Cardiac Failure. *Heart Fail Clin* **8**, 633–641.
- Park T-S, Hu Y, Noh H-L, Drosatos K, Okajima K, Buchanan J, Tuinei J, Homma S, Jiang X-C, Abel ED & Goldberg IJ (2008). Ceramide is a cardiotoxin in lipotoxic cardiomyopathy. *J Lipid Res* **49**, 2101–2112.
- Parra V, Moraga F, Kuzmicic J, López-Crisosto C, Troncoso R, Torrealba N, Criollo A, Díaz-Elizondo J, Rothermel BA, Quest AFG & Lavandero S (2013). Calcium and mitochondrial metabolism in ceramide-induced cardiomyocyte death. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis* **1832**, 1334–1344.
- Pascual F & Coleman RA (2016). Fuel Availability and Fate in Cardiac Metabolism: A Tale of Two Substrates. *Biochim Biophys Acta* **1860**, 1425–1433.
- Patten IS & Arany Z (2012). PGC-1 coactivators in the cardiovascular system. *Trends Endocrinol Metab* **23**, 90–97.
- Paulus WJ, Tschöpe C, Sanderson JE, Rusconi C, Flachskampf FA, Rademakers FE, Marino P, Smiseth OA, De Keulenaer G, Leite-Moreira AF, Borbély A, Édes I, Handoko ML, Heymans S, Pezzali N, Pieske B, Dickstein K, Fraser AG & Brutsaert DL (2007). How to diagnose diastolic heart failure: a consensus statement on the diagnosis of heart failure with normal left ventricular ejection fraction by the Heart Failure and Echocardiography Associations of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* **28**, 2539–2550.
- Penfornis A, Zimmermann C, Boumal D, Sabbah A, Meneveau N, Gaultier-Bourgeois S, Bassand JP & Bernard Y (2001). Use of dobutamine stress echocardiography in detecting silent myocardial ischaemia in asymptomatic diabetic patients: a comparison with thallium scintigraphy and exercise testing. *Diabet Med* **18**, 900–905.
- Pérez-Schindler J, Summermatter S, Salatino S, Zorzato F, Beer M, Balwierz PJ, van Nimwegen E, Feige JN, Auwerx J & Handschin C (2012). The Corepressor NCoR1 Antagonizes PGC-1 $\alpha$  and Estrogen-Related Receptor  $\alpha$  in the Regulation of Skeletal Muscle Function and Oxidative Metabolism. *Mol Cell Biol* **32**, 4913–4924.
- Perk J et al. (2012). European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012)The Fifth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other





- Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of nine societies and by invited experts) Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR). *Eur Heart J* **33**, 1635–1701.
- Pettus BJ, Chalfant CE & Hannun YA (2002). Ceramide in apoptosis: an overview and current perspectives. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids* **1585**, 114–125.
- Philouze C, Obert P, Nottin S, Benamor A, Barthez O & Aboukhoudir F (2018). Dobutamine Stress Echocardiography Unmasks Early Left Ventricular Dysfunction in Asymptomatic Patients with Uncomplicated Type 2 Diabetes: A Comprehensive Two-Dimensional Speckle-Tracking Imaging Study. *J Am Soc Echocardiogr* **31**, 587–597.
- Piepoli MF et al. (2016). 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice The Sixth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of 10 societies and by invited experts) Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR). *Eur Heart J* **37**, 2315–2381.
- Pihoker C, Gilliam LK, Ellard S, Dabelea D, Davis C, Dolan LM, Greenbaum CJ, Imperatore G, Lawrence JM, Marcovina SM, Mayer-Davis E, Rodriguez BL, Steck AK, Williams DE & Hattersley AT (2013). Prevalence, Characteristics and Clinical Diagnosis of Maturity Onset Diabetes of the Young Due to Mutations in HNF1A, HNF4A, and Glucokinase: Results From the SEARCH for Diabetes in Youth. *J Clin Endocrinol Metab* **98**, 4055–4062.
- Pike JW & Meyer MB (2014). FUNDAMENTALS OF VITAMIN D HORMONE-REGULATED GENE EXPRESSION. *J Steroid Biochem Mol Biol* **144PA**, 5–11.
- Pinney SE & Simmons RA (2012). Metabolic Programming, Epigenetics, and Gestational Diabetes Mellitus. *Curr Diab Rep* **12**, 67–74.
- Pinton P, Ferrari D, Rapizzi E, Virgilio FD, Pozzan T & Rizzuto R (2001). The Ca<sup>2+</sup> concentration of the endoplasmic reticulum is a key determinant of ceramide-induced apoptosis: significance for the molecular mechanism of Bcl-2 action. *EMBO J* **20**, 2690–2701.



Pittas AG, Dawson-Hughes B, Li T, Dam RMV, Willett WC, Manson JE & Hu FB (2006). Vitamin D and Calcium Intake in Relation to Type 2 Diabetes in Women. *Diabetes Care* **29**, 650–656.

Ponikowski P et al. (2016). 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* **37**, 2129–2200.

Pound LD, Patrick C, Eberhard CE, Mottawea W, Wang G-S, Abujamel T, Vandenberg R, Stintzi A & Scott FW (2015). Cathelicidin Antimicrobial Peptide: A Novel Regulator of Islet Function, Islet Regeneration, and Selected Gut Bacteria. *Diabetes* **64**, 4135–4147.

Pramyothin P & Holick MF (2012). Vitamin D supplementation: guidelines and evidence for subclinical deficiency. *Curr Opin Gastroenterol* **28**, 139–150.

**Q**i Y, Zhu Q, Zhang K, Thomas C, Wu Y, Kumar R, Baker KM, Xu Z, Chen S & Guo S (2014). Activation of Foxo1 by Insulin Resistance Promotes Cardiac Dysfunction and  $\beta$ -Myosin Heavy Chain Gene Expression. **11**.

Qu H, Lin K, Wang H, Wei H, Ji B, Yang Z, Peng C, Xiao X & Deng H (2017). 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> improves cardiac dysfunction, hypertrophy, and fibrosis through PARP1/SIRT1/mTOR-related mechanisms in type 1 diabetes. *Mol Nutr Food Res* **61**, 1600338.

**R**ahman A, Hershey S, Ahmed S, Nibbelink K & Simpson RU (2007). Heart extracellular matrix gene expression profile in the vitamin D receptor knockout mice. *J Steroid Biochem Mol Biol* **103**, 416–419.

Reddy GB, Sivaprasad M, Shalini T, Satyanarayana A, Seshacharyulu M, Balakrishna N, Viswanath K & Sahay M (2015). Plasma vitamin D status in patients with type 2 diabetes with and without retinopathy. *Nutrition* **31**, 959–963.

Rennison JH, McElfresh TA, Chen X, Anand VR, Hoit BD, Hoppel CL & Chandler MP (2009). Prolonged Exposure to High Dietary Lipids is not Associated with Lipotoxicity in Heart Failure. *J Mol Cell Cardiol* **46**, 883–890.



- Rietdorf K & MacQueen H (2017). Investigating interactions between epicardial adipose tissue and cardiac myocytes: what can we learn from different approaches? *Br J Pharmacol* n/a-n/a.
- Roberts NW, González-Vega M, Berhanu TK, Mull A, García J & Heydemann A (2015). Successful metabolic adaptations leading to the prevention of high fat diet-induced murine cardiac remodeling. *Cardiovasc Diabetol*; DOI: 10.1186/s12933-015-0286-0.
- Roden M, Price TB, Perseghin G, Petersen KF, Rothman DL, Cline GW & Shulman GI (1996). Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *J Clin Invest* **97**, 2859–2865.
- Roglic G (2016). *Global report on diabetes*. World Health Organization. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Romagnoli E, Mascia ML, Cipriani C, Fassino V, Mazzei F, D’Erasmus E, Carnevale V, Scillitani A & Minisola S (2008). Short and Long-Term Variations in Serum Calcitropic Hormones after a Single Very Large Dose of Ergocalciferol (Vitamin D2) or Cholecalciferol (Vitamin D3) in the Elderly. *J Clin Endocrinol Metab* **93**, 3015–3020.
- Rosen CJ, Adams JS, Bikle DD, Black DM, Demay MB, Manson JE, Murad MH & Kovacs CS (2012). The Nonskeletal Effects of Vitamin D: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocr Rev* **33**, 456–492.
- Ruan H, Hacoheh N, Golub TR, Parijs LV & Lodish HF (2002). Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Suppresses Adipocyte-Specific Genes and Activates Expression of Preadipocyte Genes in 3T3-L1 Adipocytes: Nuclear Factor- $\kappa$ B Activation by TNF- $\alpha$  Is Obligatory. *Diabetes* **51**, 1319–1336.
- Rubler S, Dlugash J, Yuceoglu YZ, Kumral T, Branwood AW & Grishman A (1972). New type of cardiomyopathy associated with diabetic glomerulosclerosis. *Am J Cardiol* **30**, 595–602.
- Russell JW & Zilliox LA (2014). Diabetic Neuropathies. *Contin Lifelong Learn Neurol* **20**, 1226–1240.
- Russo C, Jin Z, Elkind MSV, Rundek T, Homma S, Sacco RL & Di Tullio MR (2014). Prevalence and Prognostic Value of Subclinical Left Ventricular Systolic Dysfunction by Global Longitudinal Strain in a Community-Based Cohort. *Eur J Heart Fail* **16**, 1301–1309.
- Rydén L et al. (2013). ESC Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD. *Eur Heart J* **34**, 3035–3087.



Ryysy L, Häkkinen AM, Goto T, Vehkavaara S, Westerbacka J, Halavaara J & Yki-Järvinen H (2000). Hepatic fat content and insulin action on free fatty acids and glucose metabolism rather than insulin absorption are associated with insulin requirements during insulin therapy in type 2 diabetic patients. *Diabetes* **49**, 749–758.

**S**acks HS & Fain JN (2007). Human epicardial adipose tissue: A review. *Am Heart J* **153**, 907–917.

Sacks HS, Fain JN, Bahouth SW, Ojha S, Frontini A, Budge H, Cinti S & Symonds ME (2013). Adult Epicardial Fat Exhibits Beige Features. *J Clin Endocrinol Metab* **98**, E1448–E1455.

Sacks HS, Fain JN, Holman B, Cheema P, Chary A, Parks F, Karas J, Optican R, Bahouth SW, Garrett E, Wolf RY, Carter RA, Robbins T, Wolford D & Samaha J (2009). Uncoupling Protein-1 and Related Messenger Ribonucleic Acids in Human Epicardial and Other Adipose Tissues: Epicardial Fat Functioning as Brown Fat. *J Clin Endocrinol Metab* **94**, 3611–3615.

Sade LE, Eroglu S, Bozbaş H, Ozbiçer S, Hayran M, Haberal A & Müderrisoğlu H (2009). Relation between epicardial fat thickness and coronary flow reserve in women with chest pain and angiographically normal coronary arteries. *Atherosclerosis* **204**, 580–585.

Salazar J, Luzardo E, Mejías JC, Rojas J, Ferreira A, Rivas-Ríos JR & Bermúdez V (2016). Epicardial Fat: Physiological, Pathological, and Therapeutic Implications. *Cardiol Res Pract*; DOI: 10.1155/2016/1291537.

Samuel S & Sitrin MD (2008). Vitamin D's role in cell proliferation and differentiation. *Nutr Rev* **66**, S116–S124.

Samuel VT & Shulman GI (2016). The pathogenesis of insulin resistance: integrating signaling pathways and substrate flux. *J Clin Invest* **126**, 12–22.

Saponaro F, Saba A, Frascarelli S, Prontera C, Clerico A, Scalese M, Sessa MR, Cetani F, Borsari S, Pardi E, Marvelli A, Marcocci C, Passino C & Zucchi R (2018). Vitamin D measurement and effect on outcome in a cohort of patients with heart failure. *Endocr Connect*; DOI: 10.1530/EC-18-0207.

Satirapoj B & Adler SG (2015). Prevalence and Management of Diabetic Nephropathy in Western Countries. *Kidney Dis* **1**, 61–70.



- Schleithoff SS, Zittermann A, Tenderich G, Berthold HK, Stehle P & Koerfer R (2006). Vitamin D supplementation improves cytokine profiles in patients with congestive heart failure: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Am J Clin Nutr* **83**, 754–759.
- Schork NJ, Murray SS, Frazer KA & Topol EJ (2009). Common vs. Rare Allele Hypotheses for Complex Diseases. *Curr Opin Genet Dev* **19**, 212–219.
- Schrauwen-Hinderling VB, Meex RC, Hesselink MK, Weijer T van de, Leiner T, Schär M, Lamb HJ, Wildberger JE, Glatz JF, Schrauwen P & Kooi ME (2011). Cardiac lipid content is unresponsive to a physical activity training intervention in type 2 diabetic patients, despite improved ejection fraction. *Cardiovasc Diabetol* **10**, 47.
- Schreiber AK, Nones CF, Reis RC, Chichorro JG & Cunha JM (2015). Diabetic neuropathic pain: Physiopathology and treatment. *World J Diabetes* **6**, 432–444.
- Schroten NF, Ruifrok WPT, Kleijn L, Dokter MM, Silljé HH, Lambers Heerspink HJ, Bakker SJL, Kema IP, van Gilst WH, van Veldhuisen DJ, Hillege HL & de Boer RA (2013). Short-term vitamin D3 supplementation lowers plasma renin activity in patients with stable chronic heart failure: An open-label, blinded end point, randomized prospective trial (VitD-CHF trial). *Am Heart J* **166**, 357-364.e2.
- Schwartz Z, Shaked D, Hardin RR, Gruwell S, Dean DD, Sylvia VL & Boyan BD (2003).  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  causes a rapid increase in phosphatidylinositol-specific PLC- $\beta$  activity via phospholipase A2-dependent production of lysophospholipid. *Steroids* **68**, 423–437.
- Scragg RK, Camargo CA & Simpson RU (2010). Relation of Serum 25-Hydroxyvitamin D to Heart Rate and Cardiac Work (from the National Health and Nutrition Examination Surveys). *Am J Cardiol* **105**, 122–128.
- Seferović PM et al. (2018). Type 2 diabetes mellitus and heart failure: a position statement from the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology. *Eur J Heart Fail* **20**, 853–872.
- Seferović PM & Paulus WJ (2015). Clinical diabetic cardiomyopathy: a two-faced disease with restrictive and dilated phenotypes. *Eur Heart J* **36**, 1718–1727.



- Sengupta PP, Korinek J, Belohlavek M, Narula J, Vannan MA, Jahangir A & Khandheria BK (2006). Left Ventricular Structure and Function: Basic Science for Cardiac Imaging. *J Am Coll Cardiol* **48**, 1988–2001.
- Sengupta PP, Krishnamoorthy VK, Korinek J, Narula J, Vannan MA, Lester SJ, Tajik JA, Seward JB, Khandheria BK & Belohlavek M (2007). Left Ventricular Form and Function Revisited: Applied Translational Science to Cardiovascular Ultrasound Imaging. *J Am Soc Echocardiogr Off Publ Am Soc Echocardiogr* **20**, 539–551.
- Sengupta PP, Tajik AJ, Chandrasekaran K & Khandheria BK (2008). Twist Mechanics of the Left Ventricle: Principles and Application. *JACC Cardiovasc Imaging* **1**, 366–376.
- Sergeev IN & Rhoten WB (1995). 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> evokes oscillations of intracellular calcium in a pancreatic beta-cell line. *Endocrinology* **136**, 2852–2861.
- Serrano-Ferrer J, Crendal E, Walther G, Vinet A, Dutheil F, Naughton G, Lesourd B, Chapier R, Courteix D & Obert P (2016). Effects of lifestyle intervention on left ventricular regional myocardial function in metabolic syndrome patients from the RESOLVE randomized trial. *Metabolism* **65**, 1350–1360.
- Shedeed SA (2012). Vitamin D Supplementation in Infants With Chronic Congestive Heart Failure. *Pediatr Cardiol* **33**, 713–719.
- Shieh A, Chun RF, Ma C, Witzel S, Meyer B, Rafison B, Swinkels L, Huijs T, Pepkowitz S, Holmquist B, Hewison M & Adams JS (2016). Effects of High-Dose Vitamin D<sub>2</sub> Versus D<sub>3</sub> on Total and Free 25-Hydroxyvitamin D and Markers of Calcium Balance. *J Clin Endocrinol Metab* **101**, 3070–3078.
- Shimada T, Hasegawa H, Yamazaki Y, Muto T, Hino R, Takeuchi Y, Fujita T, Nakahara K, Fukumoto S & Yamashita T (2004). FGF-23 Is a Potent Regulator of Vitamin D Metabolism and Phosphate Homeostasis. *J Bone Miner Res* **19**, 429–435.
- Shimizu I & Minamino T (2016). Physiological and pathological cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* **97**, 245–262.



- Shiojima I, Sato K, Izumiya Y, Schiekofer S, Ito M, Liao R, Colucci WS & Walsh K (2005). Disruption of coordinated cardiac hypertrophy and angiogenesis contributes to the transition to heart failure. *J Clin Invest* **115**, 2108–2118.
- Sicari R, Nihoyannopoulos P, Evangelista A, Kasprzak J, Lancellotti P, Poldermans D, Voigt J-U & Zamorano JL (2008). Stress echocardiography expert consensus statement. *Eur Heart J - Cardiovasc Imaging* **9**, 415–437.
- da Silva RMS & de Mello RJV (2017). Fat deposition in the left ventricle: descriptive and observacional study in autopsy. *Lipids Health Dis*; DOI: 10.1186/s12944-017-0475-9.
- Simon JN, Chowdhury SAK, Warren CM, Sadayappan S, Wieczorek DF, Solaro RJ & Wolska BM (2014). Ceramide-mediated depression in cardiomyocyte contractility through PKC activation and modulation of myofilament protein phosphorylation. *Basic Res Cardiol*; DOI: 10.1007/s00395-014-0445-6.
- Simpson RU, Hershey SH & Nibelink KA (2007). Characterization Of Heart Size And Blood Pressure In The Vitamin D Receptor Knockout Mouse. *J Steroid Biochem Mol Biol* **103**, 521–524.
- Singh RM, Waqar T, Howarth FC, Adeghate E, Bidasee K & Singh J (2017). Hyperglycemia-induced cardiac contractile dysfunction in the diabetic heart. *Heart Fail Rev* 1–18.
- Sivasankar D, George M & Sriram DK (2018). Novel approaches in the treatment of diabetic cardiomyopathy. *Biomed Pharmacother* **106**, 1039–1045.
- Song L, Su M, Wang S, Zou Y, Wang X, Wang Y, Cui H, Zhao P, Hui R & Wang J (2014). MiR-451 is decreased in hypertrophic cardiomyopathy and regulates autophagy by targeting TSC1. *J Cell Mol Med* **18**, 2266–2274.
- Song Y, Wang L, Pittas AG, Del Gobbo LC, Zhang C, Manson JE & Hu FB (2013). Blood 25-Hydroxy Vitamin D Levels and Incident Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* **36**, 1422–1428.
- Srivastava PM, Calafiore P, Macisaac RJ, Patel SK, Thomas MC, Jerums G & Burrell LM (2008). Prevalence and predictors of cardiac hypertrophy and dysfunction in patients with Type 2 diabetes. *Clin Sci* **114**, 313–320.



Stephens JM, Lee J & Pilch PF (1997). Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ -induced Insulin Resistance in 3T3-L1 Adipocytes Is Accompanied by a Loss of Insulin Receptor Substrate-1 and GLUT4 Expression without a Loss of Insulin Receptor-mediated Signal Transduction. *J Biol Chem* **272**, 971–976.

Stephens JM & Pekala PH (1991). Transcriptional repression of the GLUT4 and C/EBP genes in 3T3-L1 adipocytes by tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem* **266**, 21839–21845.

Stöhr EJ, Shave RE, Baggish AL & Weiner RB (2016). Left Ventricular Twist Mechanics in the Context of Normal Physiology and Cardiovascular Disease: A Review of Studies using Speckle Tracking Echocardiography. *Am J Physiol - Heart Circ Physiol* **301**, H1040–H1048. DOI: 10.1152/ajpheart.00104.2016.

Stratton IM, Adler AI, Neil HAW, Matthews DR, Manley SE, Cull CA, Hadden D, Turner RC & Holman RR (2000). Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *BMJ* **321**, 405–412.

Stuckey DJ, Carr CA, Camelliti P, Tyler DJ, Davies KE & Clarke K (2012). In vivo MRI Characterization of Progressive Cardiac Dysfunction in the mdx Mouse Model of Muscular Dystrophy. *PLoS ONE*; DOI: 10.1371/journal.pone.0028569.

Sugden JA, Davies JL, Witham MD, Morris AD & Struthers AD (2008). Vitamin D improves endothelial function in patients with Type 2 diabetes mellitus and low vitamin D levels. *Diabet Med* **25**, 320–325.

Sun K, Kusminski CM & Scherer PE (2011). Adipose tissue remodeling and obesity. *J Clin Invest* **121**, 2094–2101.

Sunbul M, Bozbay M, Mammadov C, Cincin A, Atas H, Ozsenel EB, Sari I & Basaran Y (2015). Effect of vitamin D deficiency and supplementation on myocardial deformation parameters and epicardial fat thickness in patients free of cardiovascular risk. *Int J Cardiovasc Imaging* **31**, 765–772.

**T**abesh M, Azadbakht L, Faghihimani E, Tabesh M & Esmailzadeh A (2015). Effects of Calcium Plus Vitamin D Supplementation on Anthropometric Measurements and Blood Pressure in Vitamin D Insufficient People with Type 2 Diabetes: A Randomized Controlled Clinical Trial. *J Am Coll Nutr* **34**, 281–289.





- Tadic M, Ilic S, Cuspidi C, Stojcevski B, Ivanovic B, Bukarica L, Jozika L & Celic V (2015). Left Ventricular Mechanics in Untreated Normotensive Patients with Type 2 Diabetes Mellitus: A Two- and Three-dimensional Speckle Tracking Study. *Echocardiography* **32**, 947–955.
- Taegtmeyer H, McNulty P & Young ME (2002). Adaptation and Maladaptation of the Heart in Diabetes: Part I. *Circulation*. Available at: <https://www.ahajournals.org/doi/full/10.1161/01.CIR.0000012466.50373.E8> [Accessed August 21, 2018].
- Takács I, Tóth BE, Szekeres L, Szabó B, Bakos B & Lakatos P (2017). Randomized clinical trial to comparing efficacy of daily, weekly and monthly administration of vitamin D3. *Endocrine* **55**, 60–65.
- Tammaro P & Ashcroft FM (2006). Keeping the heart going: a new role for KATP channels. *J Physiol* **577**, 767.
- Ternacle J, Wan F, Sawaki D, Surenaud M, Pini M, Mercedes R, Ernande L, Audureau E, Dubois-Rande J-L, Adnot S, Hue S, Czibik G & Derumeaux G (2017). Short-term high-fat diet compromises myocardial function: a radial strain rate imaging study. *Eur Heart J - Cardiovasc Imaging* **18**, 1283–1291.
- The Look AHEAD Research Group (2007). Reduction in Weight and Cardiovascular Disease Risk Factors in Individuals With Type 2 Diabetes: One-year results of the Look AHEAD trial. *Diabetes Care* **30**, 1374–1383.
- The Look AHEAD Research Group (2010). Long Term Effects of a Lifestyle Intervention on Weight and Cardiovascular Risk Factors in Individuals with Type 2 Diabetes: Four Year Results of the Look AHEAD Trial. *Arch Intern Med* **170**, 1566–1575.
- Thomas CC & Philipson LH (2015). Update on Diabetes Classification. *Med Clin North Am* **99**, 1–16.
- Tishkoff DX, Nibbelink KA, Holmberg KH, Dandu L & Simpson RU (2008). Functional Vitamin D Receptor (VDR) in the T-Tubules of Cardiac Myocytes: VDR Knockout Cardiomyocyte Contractility. *Endocrinology* **149**, 558–564.



Tsugawa N, Nakagawa K, Kawamoto Y, Tachibana Y, Hayashi T, Ozono K & Okano T (1999). Biological Activity Profiles of 1 $\alpha$ , 25-Dihydroxyvitamin D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub>, D<sub>4</sub>, D<sub>7</sub>, and 24-Epi-1 $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D<sub>2</sub>. *Biol Pharm Bull* **22**, 371–377.

Tsur A, Feldman BS, Feldhammer I, Hoshen MB, Leibowitz G & Balicer RD (2013). Decreased Serum Concentrations of 25-Hydroxycholecalciferol Are Associated With Increased Risk of Progression to Impaired Fasting Glucose and Diabetes. *Diabetes Care* **36**, 1361–1367.

Turer AT, Hill JA, Elmquist JK & Scherer PE (2012). Adipose Tissue Biology and Cardiomyopathy-Translational Implications. *Circ Res* **111**, 1565–1577.

**U**sluogullari CA, Balkan F, Caner S, Ucler R, Kaya C, Ersoy R & Cakir B (2015). The relationship between microvascular complications and vitamin D deficiency in type 2 diabetes mellitus. *BMC Endocr Disord*; DOI: 10.1186/s12902-015-0029-y.

Utz W, Engeli S, Haufe S, Kast P, Hermsdorf M, Wiesner S, Pofahl M, Traber J, Luft FC, Boschmann M, Schulz-Menger J & Jordan J (2011). Myocardial steatosis, cardiac remodelling and fitness in insulin-sensitive and insulin-resistant obese women. *Heart* **97**, 1585–1589.

**V**arga ZV, Giricz Z, Liudet L, Haskó G, Ferdinándy P & Pacher P (2015). Interplay of oxidative, nitrosative/nitrative stress, inflammation, cell death and autophagy in diabetic cardiomyopathy. *Biochim Biophys Acta* **1852**, 232–242.

Venteclef N, Guglielmi V, Balse E, Gaborit B, Cotillard A, Atassi F, Amour J, Leprince P, Dutour A, Clément K & Hatem SN (2015). Human epicardial adipose tissue induces fibrosis of the atrial myocardium through the secretion of adipo-fibrokinases. *Eur Heart J* **36**, 795–805.

Vernay M, Sponga M, Salanave B, Oléko A, Deschamps V, Malon A & Castetbon K (2012). Statut en vitamine D de la population adulte en France : l'Étude nationale nutrition santé (ENNS, 2006-2007).

Verstuyf A, Carmeliet G, Bouillon R & Mathieu C (2010). Vitamin D: a pleiotropic hormone. *Kidney Int* **78**, 140–145.



Voigt J-U, Pedrizzetti G, Lysyansky P, Marwick TH, Houle H, Baumann R, Pedri S, Ito Y, Abe Y, Metz S, Song JH, Hamilton J, Sengupta PP, Koliass TJ, d'Hooge J, Aurigemma GP, Thomas JD & Badano LP (2015). Definitions for a Common Standard for 2D Speckle Tracking Echocardiography: Consensus Document of the EACVI/ASE/Industry Task Force to Standardize Deformation Imaging. *J Am Soc Echocardiogr* **28**, 183–193.

Voulgari C, Papadogiannis D & Tentolouris N (2010). Diabetic cardiomyopathy: from the pathophysiology of the cardiac myocytes to current diagnosis and management strategies. *Vasc Health Risk Manag* **6**, 883–903.

**W**addingham MT, Edgley AJ, Tsuchimochi H, Kelly DJ, Shirai M & Pearson JT (2015). Contractile apparatus dysfunction early in the pathophysiology of diabetic cardiomyopathy. *World J Diabetes* **6**, 943–960.

Wander PL, Boyko EJ, Leonetti DL, McNeely MJ, Kahn SE & Fujimoto WY (2013). Change in Visceral Adiposity Independently Predicts a Greater Risk of Developing Type 2 Diabetes Over 10 Years in Japanese Americans. *Diabetes Care* **36**, 289–293.

Wang C-H, Wang C-C, Huang H-C & Wei Y-H (2013). Mitochondrial dysfunction leads to impairment of insulin sensitivity and adiponectin secretion in adipocytes. *FEBS J* **280**, 1039–1050.

Wang Chih-Hao, Tsai Ting-Fen & Wei Yau-Huei (2015). Role of mitochondrial dysfunction and dysregulation of Ca<sup>2+</sup> homeostasis in insulin insensitivity of mammalian cells. *Ann N Y Acad Sci* **1350**, 66–76.

Wang C-P, Hsu H-L, Hung W-C, Yu T-H, Chen Y-H, Chiu C-A, Lu L-F, Chung F-M, Shin S-J & Lee Y-J (2009). Increased epicardial adipose tissue (EAT) volume in type 2 diabetes mellitus and association with metabolic syndrome and severity of coronary atherosclerosis. *Clin Endocrinol (Oxf)* **70**, 876–882.

Wang L, Song Y, Manson JE, Pilz S, März W, Michaëlsson K, Lundqvist A, Jassal SK, Barrett-Connor E, Zhang C, Eaton CB, May HT, Anderson JL & Sesso HD (2012). Circulating Levels of 25-Hydroxy-Vitamin D and Risk of Cardiovascular Disease: A Meta-Analysis of Prospective Studies. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes* **5**, 819–829.



- Wang L, Yuan T, Du G, Zhao Q, Ma L & Zhu J (2014a). The impact of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on the expression of connective tissue growth factor and transforming growth factor- $\beta$ 1 in the myocardium of rats with diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* **104**, 226–233.
- Wang Q, Gao Y, Tan K & Li P (2014b). Subclinical impairment of left ventricular function in diabetic patients with or without obesity. *Herz* **40**, 260–268.
- Wang TJ, Pencina MJ, Booth SL, Jacques PF, Ingelsson E, Lanier K, Benjamin EJ, D'Agostino RB, Wolf M & Vasan RS (2008). Vitamin D Deficiency and Risk of Cardiovascular Disease. *Circulation* **117**, 503–511.
- Wang Z, Zhang Y, Liu W & Su B (2017). Evaluation of Epicardial Adipose Tissue in Patients of Type 2 Diabetes Mellitus by Echocardiography and its Correlation with Intimal Medial Thickness of Carotid Artery. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **337**, a236.
- Wannamethee S, Shaper A & Walker M (2005). Overweight and obesity and weight change in middle aged men: impact on cardiovascular disease and diabetes. *J Epidemiol Community Health* **59**, 134–139.
- Watanabe T, Watanabe-Kominato K, Takahashi Y, Kojima M & Watanabe R (2011). Adipose Tissue-Derived Omentin-1 Function and Regulation. In *Comprehensive Physiology*. John Wiley & Sons, Inc. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cphy.c160043/abstract>.
- Wei H, Qu H, Wang H, Ji B, Ding Y, Liu D, Duan Y, Liang H, Peng C, Xiao X & Deng H (2017). 1,25-Dihydroxyvitamin-D<sub>3</sub> prevents the development of diabetic cardiomyopathy in type 1 diabetic rats by enhancing autophagy via inhibiting the  $\beta$ -catenin/TCF4/GSK-3 $\beta$ /mTOR pathway. *J Steroid Biochem Mol Biol*; DOI: 10.1016/j.jsbmb.2017.02.007.
- Wellen KE & Hotamisligil GS (2005). Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* **115**, 1111–1119.
- Westermeier F, Riquelme JA, Pavez M, Garrido V, Díaz A, Verdejo HE, Castro PF, García L & Lavandero S (2016). New Molecular Insights of Insulin in Diabetic Cardiomyopathy. *Front Physiol*; DOI: 10.3389/fphys.2016.00125.
- White P & Cooke N (2000). The Multifunctional Properties and Characteristics of Vitamin D-binding Protein. *Trends Endocrinol Metab* **11**, 320–327.



- Wierzbowska-Drabik K, Hamala P & Kasprzak JD (2015). Delayed longitudinal myocardial function recovery after dobutamine challenge as a novel presentation of myocardial dysfunction in type 2 diabetic patients without angiographic coronary artery disease. *Eur Heart J - Cardiovasc Imaging* **16**, 676–683.
- Wiesmann F, Ruff J, Engelhardt S, Hein L, Dienesch C, Leupold A, Illinger R, Frydrychowicz A, Hiller K-H, Rommel E, Haase A, Lohse MJ & Neubauer S (2001). Dobutamine-Stress Magnetic Resonance Microimaging in Mice Acute Changes of Cardiac Geometry and Function in Normal and Failing Murine Hearts. *Circ Res* **88**, 563–569.
- Wilkinson CP, Ferris FL, Klein RE, Lee PP, Agardh CD, Davis M, Dills D, Kampik A, Pararajasegaram R & Verdager JT (2003). Proposed international clinical diabetic retinopathy and diabetic macular edema disease severity scales. *Ophthalmology* **110**, 1677–1682.
- Wing RR, Lang W, Wadden TA, Safford M, Knowler WC, Bertoni AG, Hill JO, Brancati FL, Peters A, Wagenknecht L & the Look AHEAD Research Group (2011). Benefits of Modest Weight Loss in Improving Cardiovascular Risk Factors in Overweight and Obese Individuals With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* **34**, 1481–1486.
- Witham MD, Dove FJ, Dryburgh M, Sugden JA, Morris AD & Struthers AD (2010). The effect of different doses of vitamin D3 on markers of vascular health in patients with type 2 diabetes: a randomised controlled trial. *Diabetologia* **53**, 2112–2119.
- Witte KK, Byrom R, Gierula J, Paton MF, Jamil HA, Lowry JE, Gillott RG, Barnes SA, Chumun H, Kearney LC, Greenwood JP, Plein S, Law GR, Pavitt S, Barth JH, Cubbon RM & Kearney MT (2016). Effects of Vitamin D on Cardiac Function in Patients With Chronic HF. *J Am Coll Cardiol* **67**, 2593–2603.
- World Health Organization (2016). Rapport mondial sur le diabète.
- World Health Organization & International Diabetes Federation (2006). *Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycaemia: report of a WHO/IDF consultation*. Available at: [http://www.who.int/diabetes/publications/diagnosis\\_diabetes2006/en/](http://www.who.int/diabetes/publications/diagnosis_diabetes2006/en/) [Accessed November 30, 2017].



**X**iang W, Kong J, Chen S, Cao L-P, Qiao G, Zheng W, Liu W, Li X, Gardner DG & Li YC (2005). Cardiac hypertrophy in vitamin D receptor knockout mice: role of the systemic and cardiac renin-angiotensin systems. *Am J Physiol-Endocrinol Metab* **288**, E125–E132.

Xiao X, Fischbach S, Zhang T, Chen C, Sheng Q, Zimmerman R, Patnaik S, Fusco J, Ming Y, Guo P, Shiota C, Prasad K, Gangopadhyay N, Husain SZ, Dong H & Gittes GK (2017). SMAD3/Stat3 Signaling Mediates  $\beta$ -Cell Epithelial-Mesenchymal Transition in Chronic Pancreatitis-Related Diabetes. *Diabetes* **66**, 2646–2658.

**Y**amaguchi Y, Cavallero S, Patterson M, Shen H, Xu J, Kumar SR & Sucof HM (2015). Adipogenesis and epicardial adipose tissue: A novel fate of the epicardium induced by mesenchymal transformation and PPAR $\gamma$  activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 2070–2075.

Ye WZ, Reis AF, Dubois-Laforgue D, Bellanne-Chantelot C, Timsit J & Velho G (2001). Vitamin D receptor gene polymorphisms are associated with obesity in type 2 diabetic subjects with early age of onset. *Eur J Endocrinol* **145**, 181–186.

Young ME, Guthrie PH, Razeghi P, Leighton B, Abbasi S, Patil S, Youker KA & Taegtmeyer H (2002). Impaired Long-Chain Fatty Acid Oxidation and Contractile Dysfunction in the Obese Zucker Rat Heart. *Diabetes* **51**, 2587–2595.

Yu C-M, Sanderson JE, Marwick TH & Oh JK (2007). Tissue Doppler Imaging: A New Prognosticator for Cardiovascular Diseases. *J Am Coll Cardiol* **49**, 1903–1914.

**Z**elmanovitz T, Gerchman F, Balthazar AP, Thomazelli FC, Matos JD & Canani LH (2009). Diabetic nephropathy. *Diabetol Metab Syndr* **1**, 10.

Zeng X, Yu X, Xiao S, Yao H & Zhu J (2017). Effects of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on pathological changes in rats with diabetic cardiomyopathy. *Lipids Health Dis*; DOI: 10.1186/s12944-017-0498-2.



- Zhang L, Ussher JR, Oka T, Cadete VJJ, Wagg C & Lopaschuk GD (2011). Cardiac diacylglycerol accumulation in high fat-fed mice is associated with impaired insulin-stimulated glucose oxidation. *Cardiovasc Res* **89**, 148–156.
- Zhang X, Saaddine JB, Chou C-F, Cotch MF, Cheng YJ, Geiss LS, Gregg EW, Albright AL, Klein BEK & Klein R (2010). Prevalence of Diabetic Retinopathy in the United States, 2005-2008. *JAMA* **304**, 649–656.
- Zhang X, Wei X, Liang Y, Liu M, Li C & Tang H (2013). Differential Changes of Left Ventricular Myocardial Deformation in Diabetic Patients with Controlled and Uncontrolled Blood Glucose: A Three-Dimensional Speckle-Tracking Echocardiography-Based Study. *J Am Soc Echocardiogr* **26**, 499–506.
- Zhao G & Simpson RU (2010). Interaction Between Vitamin D Receptor and Caveolin-3 and Regulation by 1, 25 Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in Adult Rat Cardiomyocytes. *J Steroid Biochem Mol Biol* **121**, 159–163.
- Zhao J-D, Jia J-J, Dong P-S, Zhao D, yang X-M, Li D-L & Zhang H-F (2018). Effect of vitamin D on ventricular remodelling in heart failure: a meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ Open*; DOI: 10.1136/bmjopen-2017-020545.
- Zhen Z, Chen Y, Shih K, Liu J-H, Yuen M, Wong DS-H, Lam KS-L, Tse H-F & Yiu K-H (2015). Altered myocardial response in patients with diabetic retinopathy: an exercise echocardiography study. *Cardiovasc Diabetol*; DOI: 10.1186/s12933-015-0281-5.
- Zhu B, Zhao H-L, Ou C, Huang L-S, Li P-Z & Lao M (2014). Association of vitamin D receptor Bsm1 gene polymorphism with the risk of type 2 diabetes mellitus. *J Recept Signal Transduct* **34**, 458–462.
- Zhu K, Knuiman M, Divitini M, Hung J, Lim EM, Cooke BR & Walsh JP (2017). Serum 25-hydroxyvitamin D as a predictor of mortality and cardiovascular events: A 20-year study of a community-based cohort. *Clin Endocrinol (Oxf)* **88**, 154–163.
- Zia AA, Moten M, McGee JE, Bhattacharya SK, Weber KT, Komolafe BO, Ahokas RA & Rosenberg EW (2011). Supplemental Vitamin D and Calcium in the Management of African Americans With Heart Failure Having Hypovitaminosis D. *Am J Med Sci* **341**, 113–118.



Zipitis CS & Akobeng AK (2008). Vitamin D supplementation in early childhood and risk of type 1 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Arch Dis Child* **93**, 512–517.

Zoroufian A, Razmi T, Taghavi-Shavazi M, Lotfi-Tokaldany M & Jalali A (2014). Evaluation of Subclinical Left Ventricular Dysfunction in Diabetic Patients: Longitudinal Strain Velocities and Left Ventricular Dyssynchrony by Two-Dimensional Speckle Tracking Echocardiography Study. *Echocardiography* **31**, 456–463.



## Résumé

Le diabète est aujourd'hui la 7<sup>ème</sup> cause de mortalité dans le monde. Dans cette population, la cardiomyopathie diabétique est la principale cause de morbi-mortalité. Le développement de cette complication débutant dès l'apparition du diabète, un dépistage et une prise en charge précoces de cette pathologie sont donc de première importance et sont les deux objectifs visés par ces travaux. La première étude que nous avons réalisée a permis de démontrer l'utilité d'une évaluation comprehensive de la fonction régionale myocardique gauche par *2D speckle-tracking imaging*, en conditions de stress à la dobutamine, dans le dépistage précoce de la cardiomyopathie diabétique chez des patients diabétiques de type 2 asymptomatiques. La deuxième partie de ces travaux a, quant à elle, donné lieu à deux études. L'étude clinique a permis de mettre en évidence une amélioration de la réponse au stress de la fonction régionale myocardique après 3 mois de supplémentation en vitamine D<sub>3</sub> chez des patients carencés. L'étude expérimentale a, pour sa part, souligné les effets bénéfiques sur le remodelage et la fonction cardiaques de cette supplémentation, en prévention secondaire, dans un modèle murin de diabète de type 2 induit par un régime gras et sucré. Par ailleurs, cette étude a mis en lumière l'implication potentielle d'une modulation des taux myocardiques en espèces lipotoxiques par la vitamine D<sub>3</sub> dans ces effets. L'ensemble de ces travaux de thèse a ainsi permis, d'une part, de proposer une technique de dépistage des signes précoces d'altération de la fonction cardiaque chez le patient diabétique de type 2 et, d'autre part, de montrer les effets bénéfiques d'une supplémentation en vitamine D<sub>3</sub> dans ce contexte.

**Mots clés** *Diabète de type 2 non compliqué – Patient asymptomatique – Échocardiographie de stress – 2D speckle-tracking imaging – Fonction régionale myocardique – Tissu adipeux épicaudique – Lipotoxicité – Lipides myocardiques – Vitamine D – Diabète induit par un régime*

## Abstract

Diabetes has reached the 7<sup>th</sup> place in the world's top ten mortality causes. In this population, morbidity mainly originates from diabetic cardiomyopathy. This complication evolving from the onset of diabetes, early diagnosis and care are of paramount importance and are the two purposes of this work. In our first study, we demonstrated the relevance of a comprehensive 2D speckle-tracking imaging analysis, under dobutamine stress, in unmasking early left ventricular regional myocardial dysfunction in a population of asymptomatic type 2 diabetic patients. In the second part of this work, we performed two studies. In the first one, we brought to light an improvement of regional myocardial function response to dobutamine stress after a three-month vitamin D<sub>3</sub> supplementation protocol, in deficient patients. The second study was performed in a mouse model of diet-induced type 2 diabetes. In this last work, we put forward the beneficial effects of vitamin D<sub>3</sub> supplementation, in secondary prevention, on cardiac remodeling and function. These cardioprotective effects may be, at least in part, on account of modulatory effects of vitamin D<sub>3</sub> on myocardial lipotoxic species levels. This whole work allow us to propose a tool enabling recognition of early cardiac function impairments in type 2 diabetic patients and to demonstrate the beneficial effects of vitamin D<sub>3</sub> supplementation in this context.

**Keywords** *Uncomplicated type 2 diabetes – Asymptomatic patient – Stress echocardiography – 2D speckle-tracking imaging – Regional myocardial function – Epicardial adipose tissue – Lipotoxicity – Myocardial lipids – Vitamin D – Diet-induced diabetes*

