



Nouvelles cibles pharmacologiques du traitement de la dysfonction cardiovasculaire associée au syndrome métabolique

Marianne Lachaux

► To cite this version:

Marianne Lachaux. Nouvelles cibles pharmacologiques du traitement de la dysfonction cardiovasculaire associée au syndrome métabolique. Sciences pharmaceutiques. Normandie Université, 2019. Français. NNT : 2019NORMR010 . tel-02569400v2

HAL Id: tel-02569400

<https://theses.hal.science/tel-02569400v2>

Submitted on 15 May 2020

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

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



Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité Sciences de la Vie et de la Santé

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

Nouvelles cibles pharmacologiques du traitement de la dysfonction cardiovasculaire associée au syndrome métabolique

**Présentée et soutenue par
Marianne Lachaux**

**Thèse soutenue publiquement le 06 Mai 2019 Salle des thèses, Bâtiment Stewart
devant le jury composé de**

Mme Geneviève Derumeaux	PU-PH / Université Paris Est-Créteil	Rapporteur
Mr Thierry Couffinal	PU-PH/ Université de Bordeaux	Rapporteur
Mme Elise Belaidi-Corsat	MCF / Université de Grenoble Alpes	Examineur
Mr Moïse Coeffier	MCU-PH/ Université de Rouen Normandie	Examineur
Mr Paul Mulder	PR/ Université de Rouen Normandie	Codirecteur de thèse
Mr Vincent Richard	PU-PH/ Université de Rouen Normandie	Directeur de thèse

Thèse dirigée par Mr le Pr Vincent Richard et Mr le Pr Paul Mulder, laboratoire EnVI : Endothélium, Valvulopathies et Insuffisance Cardiaque, unité INSERM U1096



Instituts
thématiques

EnVI

Inserm

● U1096

Institut national
de la santé et de la recherche médicale



Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité Sciences de la Vie et de la Santé

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

Nouvelles cibles pharmacologiques du traitement de la dysfonction cardiovasculaire associée au syndrome métabolique

**Présentée et soutenue par
Marianne Lachaux**

**Thèse soutenue publiquement le 06 Mai 2019 Salle des thèses, Bâtiment Stewart
devant le jury composé de**

Mme Geneviève Derumeaux	PU-PH / Université Paris Est-Créteil	Rapporteur
Mr Thierry Couffignal	PU-PH/ Université de Bordeaux	Rapporteur
Mme Elise Belaidi-Corsat	MCF / Université de Grenoble Alpes	Examineur
Mr Moïse Coeffier	MCU-PH/ Université de Rouen Normandie	Examineur
Mr Paul Mulder	PR/ Université de Rouen Normandie	Codirecteur de thèse
Mr Vincent Richard	PU-PH/ Université de Rouen Normandie	Directeur de thèse

Thèse dirigée par Mr le Pr Vincent Richard et Mr le Pr Paul Mulder, laboratoire EnVI : Endothélium, Valvulopathies et Insuffisance Cardiaque, unité INSERM U1096



Instituts
thématiques

EnVI

Inserm

● U1096

Institut national
de la santé et de la recherche médicale

Sommaire

Remerciements	
Table des Figures	
Liste des Abréviations	
Résumé.....	
Abstract	
Partie Bibliographie	1
Préambule	1
I) L'insuffisance Cardiaque Chronique	2
A. Définition Générale	2
B. L'IC à fraction d'éjection réduite.....	5
1. Généralités	5
2. Physiopathologie	5
3. Mécanismes compensateurs.....	5
Systèmes neuro-humoraux	6
Remodelage	7
4. Traitements	8
C. L'IC à fraction d'ejection préservée	10
1. Généralités	10
2. Physiopathologie	11
Impact des comorbidités	12
Hypertrophie des cardiomyocytes	13
Ralentissement de la relaxation des cardiomyocytes	13
Fibrose interstitielle.....	14
Remodelage	14
3. Traitements	15
D. Rôle de l'Hypertension Pulmonaire et de la Dysfonction Ventriculaire Droite dans l'Insuffisance Cardiaque Gauche	17
1. Hypertension pulmonaire.....	17
2. La Dysfonction Ventriculaire Droite	18
3. Pronostic et traitements.....	19
E. Rôle du vaisseau dans l'Insuffisance Cardiaque Chronique	20
1. Rappels sur le vaisseau physiologique	20
Structure des vaisseaux	20
L'endothélium vasculaire.....	21
Le NO.....	22
Les NO Synthases	22
La NOS endothéliale	24
2. Le vaisseau pathologique	24
Diminution de la production de NO	25

Augmentation de la dégradation du NO	25
La dysfonction coronaire dans l'ICFEP.....	27
II) Le Syndrome Métabolique	28
A. Définition	28
B. Physiopathologie et conséquences cardiovasculaires du syndrome métabolique.....	30
1. Caractéristique du syndrome métabolique : l'obésité abdominale.....	30
2. Caractéristique du syndrome métabolique : les dyslipidémies	32
Triglycérides.....	32
Lipoprotéine de basse densité (LDL)	32
Lipoprotéine de haute densité (HDL-C)	32
3. Caractéristique du syndrome métabolique : l'hyperglycémie à jeun	33
Rôles physiologiques de l'insuline	33
1) Voie IP3K	34
2) Voie MAPK	34
Actions sur le système cardiovasculaire	35
Conséquences d'une dérégulation dans la signalisation de l'insuline	36
4. Caractéristique du syndrome métabolique : l'hypertension artérielle.....	37
III) Nouvelles cibles thérapeutiques de la dysfonction cardiovasculaire associée au syndrome métabolique.....	38
A. Cibler le Récepteur Minéralocorticoïde	38
1. Synthèse de l'aldostérone	38
2. Le Récepteur Minéralocorticoïde	39
3. Antagonistes du Récepteur Minéralocorticoïde	40
La finérénone	41
B. Cibler l'endothéline-1	44
1. Synthèse de l'endothéline	44
2. Les récepteurs de l'endothéline	44
3. Le système endothélinergique en conditions physiologiques	46
4. Le système endothélinergique en conditions pathologiques	47
Inhibition du système endothélinergique en conditions pathologiques	48
Essais cliniques dans l'ICC	49
Le macitentan	49
C. Cibler la dysfonction mitochondriale	52
1. Rappels sur la mitochondrie.....	52
2. Dysfonction mitochondriale et pathologies cardio-métaboliques	53
3. Traitements ciblant la dysfonction mitochondriale	55
L'iméglimine	55
Objectifs de la thèse	58

Partie expérimentale	60
I) Modèle Animal : le rat Zucker <i>fa/fa</i> et traitements	60
II) Paramètres Etudiés.....	60
A. Paramètres cardiaques	60
1. Echocardiographie.....	60
2. IRM	61
Détermination des volumes ventriculaires gauche et droit par IRM	61
Détermination de la perfusion tissulaire ventriculaire gauche par IRM	62
3. Pression artérielle systémique chez le rat vigile	62
4. Hémodynamique ventriculaire gauche	63
3. Hémodynamique ventriculaire droite	63
B. Paramètres vasculaires	64
1. Myographe de Mulvany	64
Normalisation des artères	64
Evaluation de la réactivité vasculaire	65
2. Artériographe d'Halpern	65
Evaluation de la réactivité vasculaire	66
C. Paramètres métaboliques	66
1. Test de tolérance au glucose.....	66
2. Test de tolérance à l'insuline.....	66
3. Dosages plasmatiques	67
4. Dosages urinaires	67
5. Composition corporelle par Echo MRI	67
D. Evaluation de l'expression génique par qRT-PCR	67
E. Histologie/Immunohistochimie.....	69
1. Histologie cardiaque.....	69
2. Histologie vasculaire.....	70
3. Histologie rénale.....	70
F. Biochimie	70
1. Etude des EROs ventriculaires par Résonance Paramagnétique Electronique.	70
2. Etude des nitrites plasmatiques par Chemiluminescence	72
3. Etude du stress oxydant mitochondrial	72
G. Test de tolérance à l'effort.....	72
III) Analyses Statistiques	73
Résultats	74
Résumé étude 1.....	75
Etude 1	77
Résumé étude 2.....	85

Etude 2	87
Résumé étude 3.....	102
Etude 3	104
Discussion Générale.....	120
Rôle du stress oxydant dans la dysfonction cardiovasculaire associée au syndrome métabolique	120
Rôle des comorbidités dans la dysfonction cardiovasculaire associée au syndrome métabolique :	122
La dysfonction rénale	122
Perturbation du métabolisme glucidique.....	124
L'hypertension pulmonaire et la dysfonction ventriculaire droite	125
Rôle des doses de médicaments sur nos résultats.....	126
Conclusions	128
Revue Bibliographique.....	129

Remerciements

Je remercie **le Pr. Derumeaux** ainsi que **le Pr. Couffinhal** d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et de me faire l'honneur de rapporter mon travail.

Je remercie le **Dr. Bélaïdi-Corsat** ainsi que le **Dr. Coeffier** de participer à mon jury et d'examiner mon travail.

Je tiens à remercier le **Professeur Vincent Richard** pour son accueil au sein du laboratoire il y a quelques années déjà et pour m'avoir confié l'organisation des réunions du laboratoire. Merci également pour les corrections des différents papiers et de la thèse ainsi que pour vos commentaires toujours très pertinents.

Paul Mulder, merci pour toutes ces années passées à me supporter, merci pour la thèse avec tout ce que cela comporte : le côté technique d'une part, merci pour toutes ces heures à m'apprendre à me servir de l'échographe et de l'hémodynamique invasive, merci pour ta patience et ta confiance avec mes débuts galères avec le myographe. D'autre part merci pour le côté humain à supporter mes questions « débiles » et mes accès de folies, merci aussi de m'avoir encouragé et écouté dans les moments plus difficiles ! Merci aussi pour la « pizza party » un soir où avec Mouad on luttait sur les manips !

Contrairement à ce que l'on pourrait penser les remerciements ne constituent pas la partie la plus facile à écrire de la thèse. En effet il est difficile de retranscrire tous les moments de partage et d'échange qui ont eu lieu au cours de la thèse et surtout de n'oublier personne après ces quelques années à arpenter les couloirs du laboratoire.

Une pensée premièrement pour les anciens du laboratoire **Najah** et **Alexandre** tout particulièrement ainsi qu'**Orianne**, **Inès** et **Mahmoud**, merci pour votre accueil lors de mes débuts balbutiants.

Najah avec qui j'ai commencé en M1 à souffrir sur l'analyse du collagène, merci pour ton aide sur le mulvany et pour les dépannages téléphoniques !

Merci au trio de choc **Eugénie**, **Julie** et **Clothilde** complété par **Pierre-Alain** pour former un super quatuor, merci pour votre accueil lors de mon arrivée et de m'avoir donné envie de continuer notamment grâce à votre esprit d'équipe et d'entraide ainsi que votre bonne humeur montrant qu'on peut rigoler et travailler ! Sur le plan personnel je crois qu'on s'est déjà tout dit lors de vos thèses respectives mais encore une fois mille mercis, vous me manquez et je vous admire !

Merci à tous les membres titulaires du laboratoire et en particulier à :

Ebba merci pour ton implication sur mes projets tes 100 idées à la minute et ton enthousiasme. Je me rappellerai longtemps tes « hayhay » en passant en coup de vent dans le couloir et tes délicieux gâteaux (surtout le carrot cake !).

Isabelle merci pour nos discussions et tes convictions, en espérant de te revoir et pourquoi pas dans les colloques sur nos amis à 4 pattes.

Antoine merci pour nos conversations, ton écoute et pour le temps que tu as passé à me motiver et à m'encourager. Merci pour l'entraînement à la répartie et aux réponses alambiquées mais je n'ai pas (encore) ton talent !

Lionel merci pour ton expertise sur les IRM et les contourages de ce vilain VD, merci aussi pour toutes nos discussions politiques et culturelles.

Les médecins **Dominique** et **Jérémy** merci pour votre grande gentillesse et votre accessibilité à chacune de vos venues au laboratoire.

A ceux avec qui j'ai surtout échangé lors de nos pauses déjeuners qui étaient des vrais havres de paix et de rigolade aussi :

Khédi, merci pour ta gentillesse et ta douceur, merci pour ta réactivité sur toutes les paperasseries que l'on anticipe jamais assez. Merci d'être là pour prendre soin du laboratoire et d'avoir toujours les mots de réconfort et d'encouragement. Je garde des très bons souvenirs de tous ces repas partagés à discuter, échanger, et rigoler avec **Sylvanie** que je remercie pour toutes nos discussions du midi sur tout et surtout sur rien ainsi que pour ton apprentissage des PCR et ta disponibilité même lorsque tu cours partout. **Anaïs**, la reine de l'immunohisto, merci de m'avoir appris à manier le cryostat, les anticorps et le microscope. Merci pour ces heures passées à compter des macrophages ! Au-delà de ça merci pour ta gentillesse et ta douceur et profite bien de ton nouveau métier de maman. **Jean-Paul** merci d'avoir opéré et pris soins de mes petits Zucker. Merci pour tous ces repas où tu nous a fait voyager dans le temps et/ou l'espace par tes anecdotes sur tes nombreux voyages et sur ta jeunesse et ses nombreux rebondissements ! C'était un plaisir de te rencontrer. **Annie**, la fée du laboratoire partie pour savourer sa retraite bien méritée, merci pour les techniques d'histo que tu m'as transmises, pour les œufs, pour les cappuccinos et pour l'organisation de ces événements gastronomiques soudant la vie du laboratoire. **Marine**, premières PCR ensemble il y a déjà quelques années, que de chemin parcourus pour toi depuis ! Bon courage et bonne chance pour la suite.

A mes collègues et amis :

Mouad nous sommes arrivés au laboratoire en même temps et tu m'as abandonné la dernière année pour retourner en médecine. Merci pour tout le temps passé et surtout les week-ends sur mes projets. Au-delà de ça merci pour toutes nos discussions scientifiques, merci pour ta gentillesse, ta bonne humeur et ton optimiste communicatifs.

Bérénice, merci pour ces deux ans et demi passés ensemble, merci pour ton accent chantant, tes coups de gueule, de m'avoir entraîné dans une salle de sport, pour avoir accepté mes bruits bizarres et mes nombreux craquages dans le bureau des étudiants, de m'avoir encouragé et motivé lorsque l'écriture devenait trop dure (tous les jours en fait !). Merci pour les soirées « pinard-sauciflard » mémorables. Bon courage pour la fin de ta thèse et j'espère que tu me feras visiter Bordeaux un jour.

Julie, le petit Hobbit, merci pour les moments passés ensemble dans le bureau des étudiants et (surtout) en dehors. Grâce à toi j'ai 150 nouveaux tics de langage « c'est détestable, malaisant, oui c'est vrai ! » et des nouvelles voix bizarres ! Merci de m'avoir supporté et encouragé alors que tu cours tout le temps partout, bonne chance (parce que le courage je sais que tu en as à revendre) pour la « fin » de ta thèse.

Matthieu L, mon geek préféré ! Merci pour les cours et les dépannages informatiques et les appareils de massage bizarroïdes ! Bon courage pour la fin de ta thèse et on se retrouve au Japon ?

Nicolas, merci pour ton soutien quotidien lors de l'écriture de cette thèse à compter chaque jour le nombre de mot et à m'encourager. Merci pour ton calme et ton efficacité, tu fais partie des présences rassurantes de ce laboratoire ! Je te souhaite tout plein de bonheur avec ta Vivi.

Sylvain, merci pour le partage de tes connaissances scientifiques et tes encouragements mais merci surtout pour les soirées bières et jeux de société (et karaoké), tu pourras toujours compter sur moi pour tes one-man-show !

Matthieu S qui m'a détrôné au Mulvany (certes je n'ai pas beaucoup résisté) bonne chance pour la suite de ta thèse et j'espère que ce voyage au Pérou était bien !

Marie vive l'obésité (chez les autres) et le récepteur minéralocorticoïde ! Bon courage pour la suite et on se croiera peut-être au mont Gargan !

Déborah, avec Bérénice et Julie à tes côtés tu es dans le droit chemin, la relève est assurée ! Merci pour les gouttes pour les yeux qui m'ont bien sauvé, pour ta gentillesse et nos discussions !

Une pensée pour **Sébastien** fraîchement Dr² et toutes les M2 internistes qu'il a ramenés au laboratoire (**Louise, Delphine et Céline**) ainsi que pour **Manu, Thomas, Jean**, et tous les étudiants médecins que j'ai croisés au cours de ces années au labo et avec qui les discussions sont toujours très intéressantes.

Et bien sur merci à ma famille, à Damien ainsi qu'à mes ami(e)s pour leurs encouragements et leur soutien dans cette aventure qui comporte ses hauts et ses bas.

A **Damien**, merci pour ta confiance en moi et tes encouragements au cours de cette longue thèse. Merci pour les coachings à distance et les messages de relaxation avant les congrès ! Merci surtout ce que tu m'apportes au quotidien malgré la distance. Merci à tes parents pour leur gentillesse et leur accueil dans la famille.

A **papa, mamie** et **Sylvain** merci pour ces moments que nous partageons.

Table des figures

- Figure 1 Représentation schématique des principaux mécanismes hormonaux mis en place dans l'IC
- Figure 2 Illustration du remodelage ventriculaire excentrique dans l'ICFcr
- Figure 3 Représentation schématique des profils des flux à travers la valve mitrale en conditions physiologiques et lors d'une dysfonction diastolique
- Figure 4 Illustration du remodelage ventriculaire excentrique dans l'ICFcr
- Figure 5 Visualisation des différents lits vasculaires impliqués dans l'hypertension pulmonaire artérielle, pré-capillaire isolée ou pré- et post-capillaire combinée.
- Figure 6 Illustration des différentes tuniques de la paroi veineuse et artérielle
- Figure 7 Représentation schématique d'un dimère de la NO synthase endothéliale
- Figure 8 Régulateurs de l'activité de la NOS endothéliale et fonctionnement de la NOS en conditions physiologiques (gauche) et lors d'un stress oxydant
- Figure 9 Représentation schématique de la signalisation de l'insuline
- Figure 10 Représentation schématique de la stimulation de la synthèse de l'aldostérone.
- Figure 11 Représentation schématique de la signalisation du Récepteur Minéralocorticoïde.
- Figure 12 Structure chimique de la finérénone un antagoniste non stéroïdien du Récepteur Minéralocorticoïde.
- Figure 13 Représentation schématique des facteurs et étapes permettant la synthèse de l'endothéline-1
- Figure 14 Illustration des effets de l'endothéline sur le système vasculaire, cardiaque, pulmonaire et rénale en physiologie et en conditions pathologiques
- Figure 15 Structure chimique du macitentan et de son métabolite actif, un antagoniste mixte des récepteurs de l'endothéline-1.
- Figure 16 Structure chimique de l'iméglimine, premier représentant de la classe pharmacologique des glimines.
- Figure 17 Vue d'ensemble du rôle de nos traitements dans l'ICFcr associée au SM

Liste des abréviations

A	Auriculaire
AA	Acide arachidonique
ACC/AHA	American college of cardiology/American heart association
Ach	Acétylcholine
ADH	Antidiuretic hormone
AGLs	Acides gras libres
Akt/PKB	Protéine kinase B
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
AMPK	Adenosine monophosphate-activated kinase
AngII	Angiotensine II
ANP	Atrial natriuretic peptide
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine tri phosphate
BH₄	Tétrahydrobioptérine
BID	<i>Bis in day</i> , 2 fois par jour
BNP	Brain natriuretic peptide
CaM	Calmoduline
CaMKII	Calmoduline kinase II
DAG	Diacylglycérol
E	Early
ECA	Enzyme de conversion de l'angiotensine
ECE	ET converting enzyme
EROs	Espèces réactives de l'oxygène
ET	Endothéline
FAD	Flavine adenine dinucléotide
FC	Fréquence cardiaque
FE	Fraction d'éjection
FMD	Flow-mediated dilatation
FMN	Flavine mononucléotide
GLP-1	Glucagon-like peptide-1
GLUT	Glucose transporter
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
GSK-3β	Glycogen synthases kinase-3 β
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
Hsp90	Heat shock protein 90
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells
HTA	Hypertension Arterielle
IC	Insuffisance cardiaque

ICD	Insuffisance cardiaque droite
ICFEA	Insuffisance cardiaque à fraction d'éjection altérée
ICFEP	Insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée
ICG	Insuffisance cardiaque droite
IFN-γ	Interféron gamma
IGF-1	Insulin growth factor-1
IGFR-1	Insulin growth factor receptor-1
IL	Interleukine
IDM	Infarctus du myocarde
IR	Insulinorésistance
IRS	Insulin receptor substrate
KO	Knock-out
L-NMMA	L-NG-monomethyl arginine
LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
MEK1/2	MAPK-ERK-kinase ½
MMP	Métalloprotéase de la matrice
Mn-SOD	Manganèse-superoxyde dismutase
NADPH	Nicotinamide adenine dinucléotide phosphate
NCX	Echangeur Na ⁺ /Ca ²⁺
NF-1	Nuclear factor-1
NF-κB	Nuclear factor-κ B
NO	Nitric oxide
NOS	Nitric oxide synthase
NOS_e	Nitric oxide synthase endothéliale
NOS_i	Nitric oxide synthase inducible
NOS_n	Nitric oxide synthase neuronale
NPS	Nitroprussiate de sodium
NYHA	New York heart association
O₂⁻	Anions superoxydes
OD	Oreillette droite
OG	Oreillette gauche
ONOO⁻	Peroxynitrite
PAD	Pression artérielle diastolique
PAS	Pression artérielle systolique
PGH₂	Prostaglandine H2
PGI₂	Prostaglandine I2
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PIP₂	Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate
PIP₃	Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate

PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PKG	Protéine kinase G
PLA₂	Phospholipase A ₂
PPAR	Peroxisome proliferator-activator receptor
PTKs	Protéines tyrosines kinases
PTP	Protein tyrosine phosphatase
RCPG	Récepteur couplé aux protéines G
RE	Réticulum endoplasmique
RI	Récepteur à l'insuline
ROS	Reactive oxygen species
RPTPs	Récepteurs de PTPs
RS	Réticulum sarcoplasmique
RTK	Récepteurs à activité tyrosine kinase
SERCA	Sarcoplasmic-reticulum Ca ²⁺ ATPases
SNP	Nitro prussiate de sodium
SOD	Superoxydes dismutases
SRAA	Système rénine-angiotensine-aldostérone
SSRE	Shear stress response element
TGF-β	Transforming growth factor-beta
TNF-α	Tumor necrosis factor-alpha
TXA₂	Thromboxane A ₂
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
VD	Ventricule droit
VG	Ventricule gauche

Résumé

Le syndrome métabolique (SM) est associé avec une augmentation du risque de survenue d'évènements cardiovasculaires et plus particulièrement d'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée (ICFEP). L'ICFEP représente environ 50% des IC totales, cependant, à ce jour, aucun traitement n'a permis de diminuer significativement la mortalité.

L'ICFEP associée au SM, bien que d'origine multifactorielle, est caractérisée par une activation du système endothélinergique, une surexpression du récepteur minéralocorticoïde ainsi qu'une dysfonction mitochondriale participant à l'établissement et au maintien de la pathologie.

Nous avons évalué dans trois études distinctes les effets à court-terme (1 semaine) et long-terme (3 mois) de trois médicaments ciblant ces systèmes biologiques, sur les dysfonctions cardiovasculaires observées dans un modèle d'ICFEP associée au SM, le rat Zucker *fa/fa*.

Ainsi nous avons utilisé un antagoniste des récepteurs de l'endothéline, le macitentan, un antagoniste du récepteur minéralocorticoïde, la finérénone, ainsi que d'une molécule diminuant la dysfonction mitochondriale, l'iméglimine.

Dans les trois études à court-terme nous avons retrouvé une amélioration de la dysfonction diastolique, une augmentation de la perfusion cardiaque ainsi qu'une restauration de la relaxation coronaire endothélium dépendante. Ces améliorations étaient associées à une diminution de la production d'espèces réactives de l'oxygène au niveau du ventricule gauche.

Dans les trois études à long-terme nous avons obtenus les mêmes résultats sur les fonctions vasculaire et cardiaque avec au niveau structurel une diminution du collagène interstitiel cardiaque. La production d'espèces réactives de l'oxygène était également diminuée avec les trois traitements

Cette étude montre que, dans un modèle d'ICFEP associée au SM, le blocage des récepteurs de l'endothéline ou du récepteur minéralocorticoïde, ou la prévention de la dysfonction mitochondriale permettent d'améliorer les dysfonctions cardiaque et vasculaire probablement *via* une diminution du stress oxydant

Mots clés : syndrome métabolique, insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée, macitentan, finérénone, iméglimine, dysfonction diastolique, dysfonction endothéliale,

Abstract

Metabolic Syndrome (MS) is associated with an increase in cardiovascular adverse events and specifically with heart failure with preserved ejection fraction (HFpEF). HFpEF represents up to 50% of HF however, no treatment effective on mortality has been yet identified.

MS related-HFpEF is a multifactorial syndrome in which an increase in endothelin signaling, in mineralocorticoid receptor activation as well as mitochondria dysfunction is found and participate to the pathology.

The present goal of the thesis was to evaluate in three different projects the effects of short- (1 week) and long-term (3 months) treatments, each targeting one of these biological systems, on cardiovascular dysfunction observed in a rat model of MS associated HFpEF.

We have chosen the endothelin receptors antagonist macitentan, the mineralocorticoid receptor antagonist finerenone and the new glucose-lowering agent imeglimin.

Our results clearly show after the short-term studies an improvement in diastolic dysfunction, an increase in myocardial perfusion as well as restoration of endothelium-dependent coronary relaxation with the 3 treatments. All these improvements were associated with a decrease in left ventricular (LV) reactive oxygen species production (ROS).

We obtained the same results after the long-term studies with a decrease in LV interstitial collagen deposition. ROS production was also decreased with the 3 components.

This study clearly shows that in a rat model of MS related-HFpEF, blocking endothelin receptors or mineralocorticoid receptors as well as preventing mitochondrial dysfunction is associated with an improvement in cardiac and vascular dysfunctions. These improvements probably involve, among other mechanisms, a decrease in oxidative stress.

Keywords: metabolic syndrome, heart failure withp reserved ejection fraction, macitentan, finérénone, imeglimin, diastolic dysfunction, endothelial dysfunction

Préambule

Les maladies cardiovasculaires représentent selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) la première cause de mortalité dans le monde avec en 2015 plus de 17 millions de mort. Parmi le nombre total de morts de causes cardiovasculaires, plus de 7 millions sont imputables à une cardiopathie d'origine coronarienne et plus de 6 millions sont consécutives à un accident vasculaire cérébral. D'après l'OMS un grand nombre des maladies cardiovasculaires serait la conséquence de facteurs de risque comportementaux ou environnementaux (tabagisme, obésité, sédentarité, mauvaise alimentation...) et pourrait ainsi être prévenu. Certaines de ces maladies cardiovasculaires peuvent aboutir à une insuffisance cardiaque chronique (ICC). Il faut souligner que malgré un large arsenal thérapeutique la morbi-mortalité reste élevée et que la recherche de nouveaux traitements plus efficaces reste primordiale.

I. L'Insuffisance Cardiaque Chronique

A. Définition générale

L'insuffisance cardiaque (IC) est un syndrome se caractérisant par une incapacité du cœur à assurer un débit sanguin suffisant afin de répondre aux besoins métaboliques de l'organisme et/ou par une augmentation anormale des pressions de remplissage du ventricule gauche (VG) pour assurer le débit¹. L'IC est la conséquence d'une altération de la fonction et/ou de la structure du cœur pouvant toucher le ventricule gauche, le ventricule droit ou les deux. L'IC peut survenir de manière brutale et transitoire, elle est alors appelée IC aigue, par exemple lors de la survenue d'un infarctus du myocarde. On parle d'IC chronique (ICC) lorsque l'IC est installée de manière irréversible en absence de prise en charge thérapeutique optimale.

L'ICC est une pathologie multifactorielle dont l'incidence augmente avec le vieillissement de la population, la meilleure survie suite à un infarctus du myocarde² et l'augmentation des comorbidités telles que l'hypertension artérielle, le diabète, le syndrome métabolique³ etc. C'est une pathologie avec une forte mortalité de l'ordre de 50% quatre ans après le diagnostic^{4,5} malgré une amélioration de la prise en charge thérapeutique. En effet en France l'ICC a provoqué la mort de plus de 23 000 personnes en 2010⁶, représente la première cause d'hospitalisation chez le sujet âgé et engendre une détérioration importante de la qualité de vie. L'incidence de la pathologie va augmenter dans les prochaines décennies en France du fait du vieillissement la population puisque l'incidence augmente avec l'âge, de 3% à 60 ans elle devient supérieure à 10% chez les plus de 75 ans⁷.

L'IC chronique peut être stable durant de nombreuses années mais reste une pathologie évolutive pour laquelle 4 stades ont été décrits par deux grandes institutions américaines : la *New York Heart Association* (NYHA) et l'*American College of Cardiology/American Heart Association* (ACC/AHA). La NYHA a réalisé cette classification en fonction de la gravité des symptômes tandis que l'ACC/AHA s'est basée sur les modifications structurelles et/ou fonctionnelles du cœur (tableau 1).

NYHA classification fonctionnelle		ACC/AHA grades de l'IC	
Classes basées sur la sévérité des symptômes et l'aptitude physique		Grades de l'IC basés sur la structure et les dommages du muscle cardiaque	
Classe I	Pas de limitation : les efforts physiques habituels ne provoquent pas de fatigue, dyspnée ou palpitations inhabituelles.	Grade A	Haut risque de développer une IC. Pas de modifications structurelle et fonctionnelle ; pas de symptômes.
Classe II	Il existe une petite limitation des capacités physiques : le patient n'a pas de symptômes au repos mais des efforts normaux provoquent fatigue, palpitations ou dyspnée.	Grade B	Atteinte structurelle du cœur associée au développement de l'IC mais sans symptômes.
Classe III	Il existe une limitation évidente de la capacité d'effort : le patient se sent toujours bien au repos mais un effort minime provoque déjà des symptômes.	Grade C	IC symptomatique associée avec des modifications structurelles cardiaques.
Classe IV	Le patient ne peut plus effectuer aucun effort sans éprouver de symptômes : les symptômes de l'IC sont déjà présents au repos et s'aggravent au moindre effort.	Grade D	Modifications structurelles avancées et symptômes au repos en dépit d'une thérapie médicale.

Tableau 1 : Classification de l'Insuffisance Cardiaque par la New York Heart Association et l'American College of Cardiology/American Heart Association

Les symptômes de l'IC sont peu spécifiques (fatigue, dyspnée, intolérance à l'effort...) ⁸ le principal étant la survenue d'une dyspnée d'abord lors d'exercice important, puis dans les stades les plus avancés de l'IC, au repos. La dyspnée est également classée par des grades de 1 à 4 par la NYHA. Une association entre les symptômes et des signes cliniques (œdème des membres inférieurs, tachycardie ou galop et râles) peuvent orienter le diagnostic vers l'IC. Cependant le dosage plasmatique de marqueurs de référence comme le Brain Natriuretic Peptide (BNP) et son précurseur le NT-pro BNP (N-terminal-pro BNP), ainsi que l'échographie restent les outils de diagnostic de référence.

En effet le taux de BNP est augmenté chez les patients IC et est corrélé avec la gravité de l'IC, ce qui en fait un bon marqueur diagnostique et pronostique⁹. L'échocardiographie reste l'examen le plus complet pour diagnostiquer l'IC puisqu'elle permet de mesurer la taille des cavités cardiaques, l'épaisseur du muscle cardiaque ainsi que de déterminer la fraction d'éjection et le débit cardiaque. L'IC a longtemps été divisée en deux sous-types selon la fraction d'éjection (FE) du VG, depuis 2016 un troisième sous-type d'IC a été ajouté par l'*European Society of Cardiology* (ESC)⁸ ainsi la nouvelle classification fait la distinction entre :

- l'IC à fraction d'éjection réduite (ICFER) ($FE \leq 40\%$)
- l'IC à fraction d'éjection préservée (ICFEP) ($FE \geq 50\%$)
- l'IC à fraction d'éjection intermédiaire (ICFEi) ($40 \leq FE \leq 49\%$)

Cette classification basée sur la fraction d'éjection permet de distinguer l'IC consécutive à une anomalie prédominante de la systole ou de la diastole ; dans ce manuscrit nous nous focaliserons seulement sur l'ICFER et l'ICFEP.

Il faut remarquer qu'il semblerait que ces deux types d'IC aient une étiologie différente et ne forment pas un continuum d'une même maladie¹ justifiant la classification de l'IC en plusieurs sous-groupes avec des critères spécifiques pour chaque forme d'IC. Cependant des variations dans le seuil de la FE au sein des grands essais cliniques réalisés rend difficile l'interprétation des résultats puisque certains patients n'ont peut-être pas été classés dans le bon groupe d'IC.

B. L'IC à fraction d'éjection réduite

1. Généralités

L'ICFEr représente environ la moitié des cas d'ICC ; elle a longtemps été caractérisée par une FE $\leq 50\%$, cependant depuis 2016 et la création du groupe IC à fraction d'éjection intermédiaire le pourcentage de la fraction d'éjection a été baissé à 40%. Des altérations de la fonction diastolique et systolique sont retrouvées de manière concomitante, c'est à dire que la phase de relaxation/remplissage du VG ainsi que la phase de contraction/éjection sont altérées et le débit sanguin est diminué.

L'ICFEr est le plus souvent consécutif à un infarctus du myocarde (pour près de la moitié des cas) ou à une insuffisance coronarienne mais peut aussi être la conséquence d'une hypertension artérielle (HTA), de cardiomyopathie ou du diabète.

2. Physiopathologie

La physiopathologie de l'ICFEr est complexe puisqu'elle associe le plus souvent des altérations de la systole et de la diastole. La systole peut être divisée en une phase de contraction des cardiomyocytes permettant d'augmenter la pression dans la cavité ventriculaire et une phase d'éjection permettant d'envoyer le sang dans la circulation systémique lors de l'ouverture de la valve aortique. Ces deux phases mettent en jeu les propriétés contractiles intrinsèques des cardiomyocytes mais aussi la pression régnant dans le ventricule et l'aorte. Dès lors il est possible que seule la contraction ou l'éjection soit altérée ou que l'altération des deux paramètres soit concomitante. Par exemple l'infarctus du myocarde induit une perte de cellules contractiles diminuant ainsi les capacités intrinsèques de contraction du myocarde alors que l'HTA induit une surcharge de pression s'opposant à l'éjection du sang, ces deux mécanismes entraînant avec le temps une ICFEr. Une surcharge chronique de volume, observée par exemple dans l'insuffisance valvulaire aortique, augmente la pré-charge cardiaque (assimilable au volume télé-diastolique) conduisant à long-terme à la fatigue musculaire et à la survenue d'une ICFEr.

3. Mécanismes compensateurs

L'ICFEr est caractérisée par une diminution du débit cardiaque (DC) entraînant à son tour une diminution de la pression artérielle (PA) conduisant à la mise en place de mécanismes compensateur visant à rétablir le DC.

Le DC dépend de la fréquence cardiaque (FC) et du volume d'éjection systolique (VES) alors que la PA dépend du DC et de la résistance périphérique totale (RPT), ainsi les mécanismes compensateurs mis en jeu vont permettre de préserver le DC par augmentation de la fréquence cardiaque, du volume sanguin, de la contractilité des cardiomyocytes ou de la RPT.

Systèmes neuro-hormonaux

Plusieurs systèmes biologiques aux actions complémentaires s'activent lors d'une diminution du DC. Parmi ces systèmes, le premier à s'activer est le système nerveux sympathique (SNS) qui va provoquer la libération de noradrénaline et d'adrénaline à la fois au niveau des terminaisons nerveuses mais également par la médullosurrénale. Au niveau cardiaque, ces catécholamines exercent un effet chronotrope et inotrope positif *via* leur liaison au récepteur β_1 -adrénergique, permettant ainsi d'augmenter la FC et la contractilité des cardiomyocytes. Au niveau périphérique les catécholamines sont responsables d'une vasoconstriction participant à l'augmentation de la RPT et donc au rétablissement de la PA ainsi que du DC. Cependant l'activation continue du SNS dans l'IC est délétère puisqu'une concentration élevée de noradrénaline plasmatique est associée à une augmentation de la mortalité et cela même dans les IC modérées (classe NYHA I-II)^{10,11}.

Le système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA), qui joue un grand rôle dans le maintien de la pression artérielle, est activé lorsque la diminution de la PA est perçue au niveau de l'artère rénale. Dans un premier temps la rénine, enzyme libérée par le rein va cliver l'angiotensinogène, peptide inactif produit par le foie présent dans la circulation sanguine en angiotensine I qui sera clivé par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) pour former l'angiotensine II.

L'angiotensine II exerce des effets vasoconstricteurs *via* sa liaison sur le récepteur AT₁¹² situé sur les cellules musculaires lisses vasculaires augmentant ainsi la RPT. L'angiotensine stimule également la sécrétion d'aldostérone qui *via* sa liaison au récepteur minéralocorticoïde (RM) favorise la réabsorption active de sodium et passive d'eau augmentant ainsi la volémie et dont le rôle sera détaillé dans la partie IIIA. Ainsi l'angiotensine II et de l'aldostérone conduisent à une augmentation de la pression artérielle *via* deux mécanismes complémentaires.

D'autres facteurs vasoconstricteurs, agissant au niveau des vaisseaux artériels ou au niveau cardiaque, vont également s'activer tel que l'endothéline-1 (ET)¹³ dont la structure et le rôle sera détaillé dans la partie IIIB.

La chute de la PA lors de l'ICFcr, perçue par des barorécepteurs présents dans l'aorte, conduit également à la libération de vasopressine ou hormone anti diurétique (ADH) par l'hypophyse qui augmente la volémie en réduisant le volume urinaire.

Cependant des facteurs vasodilatateurs sont aussi produits dans l'ICC comme par exemple les peptides natriurétiques produits par les oreillettes et les ventricules (ANP : Atrial Natriuretic Peptide et BNP : Brain Natriuretic Peptide) en réponse à l'étirement. Ces peptides favorisent ; comme leur nom l'indique, la natriurèse permettant ainsi de diminuer la volémie et *in fine* la PA et exercent aussi un effet vasodilatateur notamment en inhibant l'activation du SRAA.

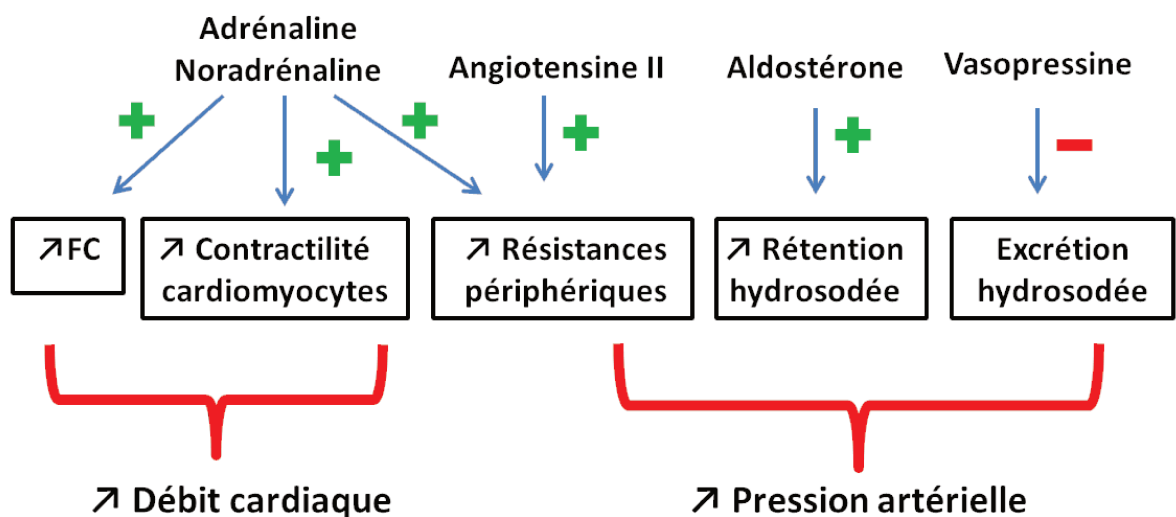


Figure 1 : Représentation schématique des principaux mécanismes hormonaux mis en place dans l'IC.

Remodelage

L'activation des systèmes neuro-humoraux permettant le maintien du DC vont directement ou indirectement induire des modifications dans la structure du cœur et des vaisseaux à long-terme. En effet l'augmentation de la volémie induit une surcharge chronique de volume à laquelle le cœur va s'adapter en dilatant le ventricule menant à une hypertrophie excentrique retrouvée chez les patients souffrant d'ICFcr^{1,14}. Dans ce type d'IC

les cardiomyocytes s'hypertrophient en s'allongeant ce qui amincit la paroi ventriculaire¹⁵. L'angiotensine II¹⁶, l'aldostérone, l'endothéline¹⁷ ainsi que le facteur de croissance transformant- β (TGF- β)^{18,19} exercent des effets génomiques induisant la prolifération et la transformation des fibroblastes en myofibroblastes qui synthétisent de grandes quantités de collagène conduisant à une fibrose interstitielle. Une fibrose dite de remplacement est observée suite à un infarctus du myocarde (IDM) puisque les fibroblastes synthétisent du collagène pour remplacer les cardiomyocytes morts formant une zone cicatricielle sans propriétés de contraction.

Ces mécanismes biologiques et morphologiques permettent pendant un certain temps de maintenir le DC et ainsi limiter les symptômes de l'IC au repos. Cependant ces mécanismes adaptatifs conduisent progressivement à un épuisement du cœur qui doit lutter contre une surcharge de volume et une augmentation de la post-charge conduisant à une augmentation de la demande en O₂ et en énergie. Ainsi, à long-terme l'activation neuro-humorale et l'hypertrophie ventriculaire deviennent délétères à l'origine d'un cercle vicieux provoquant une aggravation de l'IC.

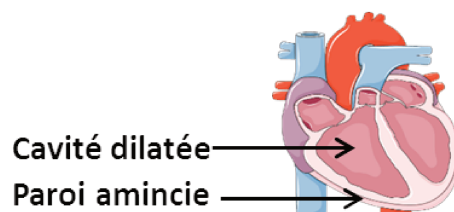


Figure 2 : Illustration du remodelage ventriculaire excentrique dans l'ICFEr. Image obtenue sur la banque d'image Servier.

4. Traitements

Malgré une amélioration de la prise en charge thérapeutique des patients ICFEr au cours de ces dernières décennies, la mortalité de cette pathologie reste élevée. Cependant la mortalité varie fortement selon la classe NYHA de l'IC soulignant l'importance de dépister l'IC dans sa phase précoce afin de contrôler l'activation neuro-humorale et limiter le remodelage ventriculaire. Actuellement le traitement de l'ICFEr associe le plus souvent plusieurs classes pharmacologiques différentes ayant des actions complémentaires.

Ces classes pharmacologiques peuvent agir sur la RPT et la PA ainsi que sur la FC, la rétention hydrosodée et (directement ou indirectement) sur le remodelage.

L'inhibition du SRAA, *via* l'utilisation d'inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IEC)^{20,21}, d'antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II (ARA-II)^{22,23} ou d'antagonistes du récepteur minéralocorticoïde (ARM) a montré son efficacité pour diminuer la mortalité. Pour ce qui concerne les ARM l'étude RALES avec la spironolactone²⁴ ainsi que l'étude EPHESUS²⁵ avec l'éplérénone ont démontré leur efficacité afin de diminuer la mortalité lorsque les ARMs sont associés à un traitement optimal de l'IC. De plus, récemment, l'étude PARAGIGM-HF²⁶ a montré un effet bénéfique sur la mortalité de l'association entre un ARA-II (le valsartan) et un inhibiteur de l'endopeptidase neutre, enzyme dégradant l'ANP et le BNP (le sacubitril).

Le traitement par les bêtabloquants chez des patients stables (hors décompensation) en complément des inhibiteurs du SRAA permet d'augmenter la survie^{27,28}. Cet effet apparaît lié en grande partie au ralentissement de la FC, comme en témoigne également l'effet bénéfique obtenu avec l'ivabradine, un inhibiteur du nœud sinusal possédant un effet sélectif de réduction de la FC^{29,30}. Ce ralentissement est particulièrement important lorsque l'IC est d'origine ischémique puisqu'il diminue la demande cardiaque en oxygène et augmente le temps de perfusion myocardique.

Enfin la limitation de la rétention d'eau et de la congestion par les diurétiques permet de soulager les symptômes de l'IC comme la dyspnée mais n'a à ce jour pas montré clairement d'effet bénéfique sur la mortalité³¹.

Certains de ces traitements exercent certainement un effet préventif sur le remodelage cardiaque en particulier les inhibiteurs du SRAA qui permettent, dans des modèles animaux, de limiter la fibrose et l'hypertrophie des cardiomyocytes¹⁶.

Cependant, malgré une amélioration considérable de la prise en charge thérapeutique le traitement de l'ICC est lourd, provoque de nombreux effets secondaires et n'empêche pas les phases de décompensations. Cela souligne l'importance de diagnostiquer l'IC aux stades précoces afin d'initier les traitements le plus tôt possible avant l'installation d'un remodelage irréversible.

Sur le plan éthique il est probablement tout aussi important de prendre en considération la qualité de vie des patients et pas uniquement l'augmentation de la survie lors des études cliniques.

C. L'IC à fraction d'éjection préservée

1. Généralités

L'ICFEp est caractérisée par des signes et symptômes d'IC en présence de FE normale ou subnormale (c'est-à-dire $\geq 50\%$) et des élévations de pression en télé-diastole. L'ICFEp représente de 30 à 50% des IC selon les études, a un aussi mauvais pronostic que l'ICFEr mais actuellement aucun traitement permettant d'augmenter la survie n'a été clairement identifié. Ceci s'explique en partie par le fait que l'ICFEp est un syndrome multifactoriel atteignant le plus souvent des personnes plus âgées et présentant plus de comorbidité que l'ICFEr³². De plus il a longtemps été pensé que dans l'ICFEp seule la fonction diastolique était altérée avec une atteinte systolique plutôt modérée voire absente du fait notamment d'une FE normale ou sub-normale. Cependant la mesure de la FE par échographie n'est pas représentative des capacités de contractilité du myocarde et de plus en plus d'études montrent une altération de la contraction systolique dans l'ICFEp pouvant toucher les quatre mouvements de la contraction à savoir l'épaississement pariétal, les déformations radiale et longitudinale³³ et la torsion du myocarde autour du grand axe^{34,35}.

Ces altérations de la contraction systolique se répercutent au niveau de la diastole puisque le remplissage ventriculaire précoce dépend du maintien de la contraction des fibres sous-épiscopardiques qui permet de « détordre » le VG. Ainsi une anomalie de la torsion VG entrainera un défaut de relaxation active du VG qui est une des caractéristiques de la dysfonction diastolique observée dans l'ICFEp.

Les autres caractéristiques de la dysfonction diastolique sont le ralentissement du remplissage et/ou la diminution de la compliance VG (ou augmentation de sa rigidité), cette dernière induisant une augmentation de la pression dans l'oreillette gauche (OG) et le VG qui limite le remplissage. Dans les stades précoces de développement de la pathologie, le débit sanguin est maintenu au repos mais s'effondre lors d'un effort car l'augmentation de la FC diminue le temps de diastole, or le remplissage n'étant plus efficace, le VES se retrouve diminué. L'intolérance à l'effort est également majorée par le fait que la diastole est un processus actif consommateur d'énergie et d'oxygène et que le myocarde n'est perfusé qu'en période de diastole, ainsi un ralentissement de la relaxation perturbe la perfusion myocardique menant à un cercle vicieux³⁶.

En ce qui concerne le diagnostic de l'ICFEp celui-ci peut être difficile à établir puisque ses symptômes sont peu spécifiques et peuvent être retrouvés en absence d'IC chez les sujets obèses. Le dosage du BNP n'est pas toujours fiable dans l'ICFEp puisque l'hypertrophie concentrique limite le stress pariétal³⁷ et que son taux est diminué chez le patient obèse³⁸. L'échographie cardiaque permet d'évaluer la fraction d'éjection VG mais aussi d'évaluer la fonction diastolique de remplissage en visualisant sous forme de deux ondes les flux entre l'OG et le VG. Une première onde appelée onde E (E pour *Early* : précoce) témoigne du remplissage rapide et passif du VG, la deuxième onde appelée onde A (A pour *atrial*) a lieu lors du remplissage tardif du VG par contraction de l'oreillette. En situation physiologique, la contribution du remplissage passif du VG est plus importante que celle du remplissage tardif par contraction de l'OG du fait d'une différence de pression suffisante entre les deux cavités, ce qui se traduit par un rapport E/A >1. Lors d'une dysfonction diastolique l'élévation de pression dans le VG ne permet plus l'établissement d'un gradient de pression entre l'OG et le VG ce qui ralentit le remplissage passif et augmente la contribution de la contraction auriculaire dans le remplissage. Cela se traduit par un rapport E/A <1 pouvant faire suspecter, en présence d'autres éléments, une ICFEp. Cependant cette mesure peut être considérée normale même en présence de dysfonction puisqu'une augmentation de la pression dans l'OG va rétablir un rapport E/A >1 dit « pseudonormal ». Lorsque la pathologie est grave le rapport E/A est beaucoup plus grand que 1 et est dit « restrictif ».

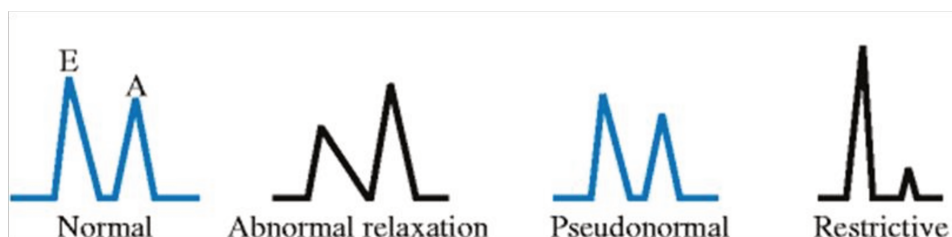


Figure 3 : Représentation schématique des profils des flux à travers la valve mitrale en conditions physiologiques et lors d'une dysfonction diastolique. Figure issue de VonBibra et Sutton³⁹.

2. Physiopathologie

La physiopathologie de l'ICFEp est plus difficile à déterminer que dans l'ICFEr tant la présence de comorbidités chez les personnes atteintes de ce syndrome est importante et rend difficile le diagnostic. En effet ces personnes présentent le plus souvent de nombreuses

comorbidités telles que l'HTA, l'obésité, le diabète de type II, le syndrome métabolique ou une maladie rénale chronique, chaque comorbidité pouvant participer à l'établissement de l'ICFEP^{40,41}. Cette pathologie touche également plus les femmes et les personnes âgées par rapport à l'ICFEP. Il a été rapporté qu'une grande proportion de patients présente une dysfonction endothéliale⁴², une fibrillation auriculaire⁴³ et une hypertension pulmonaire⁴⁴, ces paramètres étant corrélés à la sévérité de la maladie. Le premier très grand essai clinique réalisé sur 4133 patients ICFEP : I-PRESERVE (irbesartan in heart failure with preserved systolic function) a permis de mettre en évidence les caractéristiques « classiques » de la population générale des patients ICFEP⁴⁵. Dans cette étude 80% des patients étaient en surpoids ou obèses, l'hypertension était responsable de l'ICFEP pour 64% des patients et le diabète et la fibrillation auriculaire étaient retrouvées chez plus d'un tiers et d'un quart des patients respectivement, montrant l'importance des comorbidités dans la pathologie.

D'un point de vue plus moléculaire, l'ICFEP est la somme de plusieurs défauts dans des mécanismes tels que ceux régulant la taille et la rigidité des cardiomyocytes, les composants de la matrice extra cellulaire (MEC) et la signalisation calcique⁴⁶. L'accès à des biopsies cardiaques réalisées sur des patients souffrant d'ICFEP a permis de mettre en évidence une hypertrophie et une augmentation de la rigidité intrinsèque des cardiomyocytes⁴⁷ ainsi qu'une fibrose interstitielle. Il semblerait que les comorbidités soient impliquées dans les mécanismes aboutissant à ces modifications.

Impact des comorbidités

Une revue de 2013⁴⁸ instaure un nouveau paradigme selon lequel une inflammation systémique provoquée par les comorbidités de l'ICFEP et notamment par l'obésité serait à l'origine des modifications structurelles et fonctionnelles du myocarde. Ainsi l'inflammation systémique serait à l'origine d'une production excessive d'espèces réactives de l'oxygène (EROs) et de l'azote (ERNs) diminuant la biodisponibilité en monoxyde d'azote (NO)⁴⁹. Cette diminution de la biodisponibilité du NO altérerait la voie de signalisation NO/Guanosine Monophosphate cyclique/Protéine Kinase G (NO/GMPc/PKG)⁵⁰ ce qui aurait de multiples conséquences non seulement sur la relaxation et l'hypertrophie des cardiomyocytes cardiaques mais aussi sur la relaxation vasculaire ainsi que sur la MEC. La voie NO/GMPc/PKG permet l'adaptation du diamètre des vaisseaux sanguins au DC et chez les patients ICFEP on retrouve une perte de la dilatation médiée par le flux (FMD) au niveau du

bras ainsi qu'une altération de la fonction coronarienne témoignant d'une dysfonction endothéliale⁴² qui sera détaillée au paragraphe I-E.

Hypertrophie des cardiomyocytes

Une hypertrophie des cardiomyocytes est observée dans l'ICFEP en réponse à une augmentation de pression intra cavitaire. La voie NO/GMPc/PKG permet d'inhiber cette hypertrophie comme cela a été montré dans différents modèles animaux. En effet une diminution de l'hypertrophie a été observé dans un modèle murin d'IDM avec surexpression de la NOSe cardiomyocytaire⁵¹ et dans un modèle de surcharge de pression en inhibant la dégradation du GMPc par le sildenafil⁵².

Ralentissement de la relaxation des cardiomyocytes

Divers mécanismes sont à l'origine du ralentissement de la relaxation myocytaire. Parmi ces mécanismes on retrouve une augmentation de la rigidité intrinsèque du cardiomyocyte consécutive à des modifications de la protéine géante du cytosquelette la titine. En effet il a été montré chez l'animal⁵³ comme chez l'homme⁵⁴ qu'un défaut dans la phosphorylation de la titine par les Protéines Kinases A (PKA)⁵⁵ ou PKG⁵⁶ augmente la rigidité de la titine empêchant la relaxation complète du sarcomère. Le stress oxydant est aussi impliqué dans l'augmentation de la rigidité intra-cardiomyocytaire puisqu'il provoque la création de ponts disulfure au sein de la titine changeant sa conformation et la rendant plus rigide⁵⁷.

Un deuxième mécanisme participant au ralentissement de la relaxation des cardiomyocytes dans l'ICFEP est l'altération de l'homéostasie calcique. En effet la relaxation dépend du détachement des ponts actine/myosine par désensibilisation de la troponine C pour le calcium ainsi que de la recapture de calcium par le Réticulum Sarcoplasmique (RS). Cette désensibilisation au calcium passe, entre autres, par la voie NO/GMPc/PKG, ainsi lors d'une diminution de la biodisponibilité en NO, la désensibilisation des fibres au calcium va être plus longue entraînant un ralentissement de la relaxation. La recapture du calcium par le RS est sous la dépendance de la pompe SERCA-2a (Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase) qui est régulée négativement par le phospholamban non phosphorylé⁴⁶. Ainsi un défaut de phosphorylation du phospholamban et/ou une diminution de l'expression de SERCA2a sont associés à la dysfonction diastolique⁵⁸. Enfin il est important de rappeler que la relaxation est

un processus actif consommateur d'oxygène et d'Adénosine TriPhosphate (ATP) et qu'un ralentissement de la relaxation cardiaque peut être la conséquence d'un déficit en ATP comme cela a été montré chez des patients ICFEp^{36,59}.

Fibrose interstitielle

Une fibrose interstitielle est observée chez les patients et résulte de plusieurs facteurs, ainsi pour les patients combinant ICFEp et HTA l'accumulation de collagène serait la conséquence d'une diminution de sa dégradation par les métalloprotéases matricielles (MMPs). En effet une diminution du taux de MMPs a été rapportée⁶⁰ ainsi qu'une augmentation des taux des inhibiteurs tissulaires des MMPs (TIMPS)⁶¹.

Une infiltration de cellules inflammatoires dans le myocarde de patients ICFEp peut participer à l'établissement de la fibrose *via* la stimulation de sécrétion de TGF- β ⁶². En effet cette cytokine promeut la transformation des fibroblastes en myofibroblastes qui synthétisent du collagène⁶³ et expriment moins les MMPs. Le stress oxydatif participe également à l'établissement de la fibrose *via* une stimulation de la production de TGF- β comme cela a été montré chez l'animal¹⁹.

Remodelage

Dans l'ICFEp le myocarde subit une hypertrophie concentrique à l'opposé du remodelage observé dans l'ICFEr (excentrique). L'augmentation de pression intra-cavitaire est à l'origine d'un épaissement de la paroi sans augmentation de la taille de la cavité caractérisant l'hypertrophie concentrique. Il a été montré que même en absence d'IC, l'obésité est associée à une hypertrophie VG concentrique⁶⁴ elle-même associée à une moins bonne tolérance à l'effort⁶⁵.

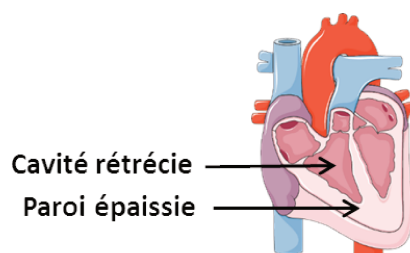


Figure 4 : Illustration du remodelage ventriculaire excentrique dans l'ICFEp. Image obtenue sur la banque d'image Servier.

3. Traitements

A ce jour aucun essai clinique de grande ampleur n'a montré une augmentation de la survie dans l'ICFEP avec les classes thérapeutiques couramment utilisées dans l'ICFER malgré un effet bénéfique sur la diminution des hospitalisations. L'absence d'effets sur la survie a de multiples causes parmi laquelle l'hétérogénéité de l'étiologie de l'ICFEP. Les traitements actuellement utilisés ont pour but de limiter les symptômes de l'IC, d'éviter la survenue d'infarctus et de contrôler les comorbidités. Les recommandations de l'ESC en 2016 pour traiter l'ICFEP concernent beaucoup de classes thérapeutiques utilisées dans l'ICFER mais les doses, les associations et les niveaux de recommandations ne sont pas les mêmes⁸.

Lors de l'essai clinique I-PRESERVE réalisé sur 4133 patients ICFEP le traitement de base des patients était constitué de diurétiques (utilisés chez 83% des patients), de bêta-bloquants (59%), de bloqueurs des canaux calciques (40%) et d'inhibiteurs du SRAA (40% avec 25% d'IEC et 15% d'ARM)⁴⁵. Cet essai clinique avait pour but d'évaluer les effets à long-terme d'un ARA-II, l'irbesartan, en addition du traitement standard sur la mortalité et les hospitalisations pour causes cardiovasculaires. Après plus de 4 ans de suivi l'étude n'a pas révélé de bénéfice de l'irbesartan pour diminuer la mortalité et le nombre d'hospitalisation pour causes cardiovasculaires.

Cet essai clinique montre que les diurétiques sont massivement utilisés afin de réguler la pression artérielle et d'améliorer les symptômes d'une surcharge de volume en empêchant la rétention hydrosodée. Cependant en absence de signes de congestion son utilisation n'est pas recommandée chez les patients ICFEP qui sont plus sensibles aux modifications de pré-charge que les patients ICFER⁶⁶.

La pression artérielle est aussi contrôlée par les inhibiteurs du SRAA qui permettent une amélioration de l'hémodynamique VG et soulagent les symptômes de l'IC (dyspnée) *via* la diminution de la pression dans l'OG et la stase pulmonaire VG en télé-diastole⁶⁷⁻⁶⁹. De plus l'utilisation d'inhibiteurs du SRAA est associée à une diminution de la fibrose interstitielle et peut donc être bénéfique sur la fonction diastolique mais sans pour autant être associée à une augmentation de la survie chez les patient avec une FE>50%. Les effets des ARMs dans l'ICFEP seront détaillés dans le chapitre III-A.

La diminution de la FC est une piste de traitement pour l'ICFEP puisque le ralentissement de la FC permet d'une part d'augmenter le temps de diastole, donc le remplissage VG et la perfusion myocardique, limitant l'ischémie et d'autre part de prévenir

la survenue de fibrillation auriculaire qui limite le remplissage VG. La diminution de la FC permet aussi de diminuer la demande myocardique en O₂ et en ATP ce qui peut améliorer l'ICFep³⁶. Ainsi les bêtabloquants, très largement utilisés chez les patients ICFep, permettent de réduire la pression artérielle, s'opposent à l'excès de stimulation adrénergique et font régresser l'hypertrophie VG. Parmi les β -bloquants, un effet bénéfique particulier peut être attribué au nébivolol, probablement lié aux propriétés de stimulation de la libération de NO exercée par cette molécule⁷⁰⁻⁷². Cependant ces effets bénéfiques sont à prendre avec précautions puisque l'utilisation des bêtabloquants ne serait bénéfique qu'en cas de FC élevée et pourrait s'avérer néfaste chez les patients avec une FC de repos normal. En effet il a été montré que les bêtabloquants augmentent principalement le temps de *diastasis*, période durant laquelle il n'y a pas ou peu de flux entre l'OG et le VG, ce qui ne permettrait pas d'augmenter le remplissage VG à FC normale. Une étude chez des femmes ICFep montre même une augmentation des hospitalisations avec utilisation de bêtabloquants⁷³.

Dans le but d'améliorer la fonction vasculaire en plus de la relaxation myocardique des traitements visant à rétablir les taux de NO et/ou de GMPc sont en cours d'évaluation⁷⁴.

Enfin les traitements non pharmacologiques de l'CFep sont également très importants. Ainsi les changements du mode de vie concernent principalement les comorbidités et il est conseillé de pratiquer une activité physique modérée⁷⁵, de perdre du poids, de contrôler sa glycémie et ses dyslipidémies (utilisation de statines) ainsi que de limiter sa consommation de sel, d'eau et d'alcool.

D. Rôle de l'Hypertension Pulmonaire et de la Dysfonction Ventriculaire Droite dans l'insuffisance Cardiaque Gauche

L'augmentation de pression et le remodelage observés dans l'IC gauche peuvent se répercuter au niveau des poumons puis du ventricule droit (VD) entraînant avec le temps une hypertension pulmonaire (HTP) et une insuffisance cardiaque droite. La survenue d'HTP et de dysfonction VD dans l'IC gauche est d'autant plus préoccupante qu'elles sont toutes deux associées à une aggravation de l'IC et à un pronostic aggravé.

1. Hypertension pulmonaire

L'HTP a été classée en 5 groupes par l'OMS selon le facteur déclenchant qui peut survenir indépendamment d'une dysfonction cardiaque gauche même si celle-ci demeure la cause la plus commune⁷⁶. Nous allons nous focaliser sur le groupe 2 qui réunit les HTP consécutives à une maladie du cœur gauche et plus particulièrement sur le sous-groupe de l'HTP consécutive à l'ICFEp⁷⁷ qui est le plus représenté. En effet la prévalence de l'HTP consécutive à l'ICFEp varierait, selon les études et les seuils de pression utilisés, entre 18 et 80% chez les patients souffrant d'ICFEp⁷⁸.

Cette grande prévalence s'explique par le fait que l'augmentation chronique de pression dans l'OG observée dans l'ICFEp va se répercuter sur les veines pulmonaires et provoquer une HTP post-capillaire caractérisée par une pression artérielle pulmonaire moyenne (PAPm) ≥ 25 mmHg et une PAP d'occlusion (PAPO) ≥ 15 mmHg reflétant la pression dans l'OG.

L'HTP peut être post-capillaire isolée, ne touchant ainsi que les veines pulmonaires, ou pré- et post-capillaire lorsque l'augmentation passive de pression dans les veines s'est répercutée au niveau des artères pulmonaires conduisant à leur remodelage.

L'HTP pré et post-capillaire est plus souvent retrouvée dans l'ICFEp chez le sujet âgé, obèse ou associant une broncho-pneumopathie chronique obstructive⁷⁹. Elle est également retrouvée chez le sujet diabétique où elle augmente la mortalité⁸⁰.

En effet les artères pulmonaire, normalement très compliantes, vont s'adapter à l'augmentation chronique de pression dans les alvéoles et les capillaires en se remodelant. Ainsi il a été montré dans des modèles animaux et chez des patients un épaississement de la

paroi artérielle consécutivement à la prolifération des myofibroblastes synthétisant du collagène⁸¹. L'HTP est également caractérisée par une dysfonction endothéliale avec une rupture de l'équilibre entre les facteurs dilatateurs et constricteurs en faveur de ses derniers. Ainsi il a été montré une diminution de la biodisponibilité en NO et une élévation du taux plasmatique d'endothéline-1⁸² qui serait la conséquence à la fois d'une augmentation de sa synthèse et d'une diminution de sa clairance par des poumons lésés⁸³.

Il faut souligner que si l'HTP post-capillaire isolée répond bien aux traitements entraînant une baisse de la pression dans l'OG, dans l'HTP post et pré-capillaire combinée ces traitements ne permettent pas de reverser l'HTP⁸⁴.

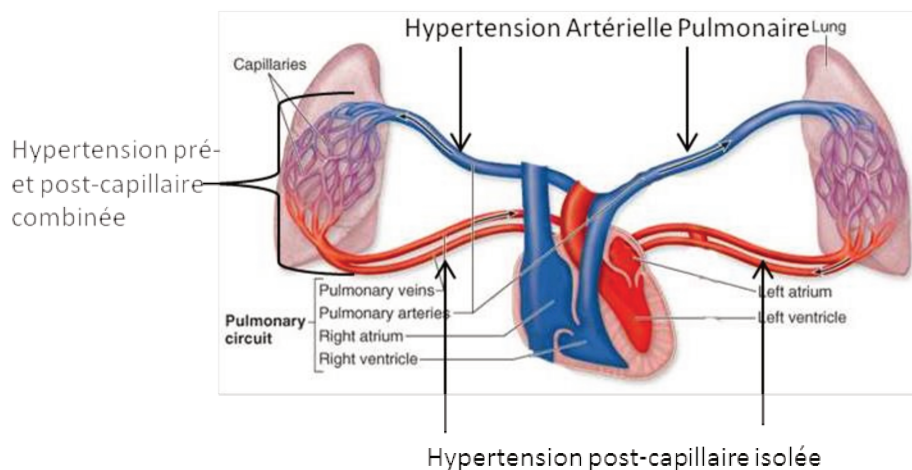


Figure 5 : Visualisation des différents lits vasculaires impliqués dans l'hypertension pulmonaire artérielle, pré-capillaire isolée ou pré- et post-capillaire combinée. Image adaptée de pdhpe.net « pulmonary and systemic circulation ».

2. La Dysfonction Ventriculaire Droite

Le VD présente des particularités le rendant sensible aux augmentations de pression observées dans l'ICFEp et l'HTP. En effet le « cœur droit » est un système à basse pression recevant le sang désoxygéné provenant de la circulation périphérique *via* les veines caves inférieure et supérieure et l'éjectant vers la circulation pulmonaire. Il fonctionne de manière synchrone avec le « cœur gauche » et doit éjecter le même volume de sang que le VG à chaque battement. Cependant en conditions physiologiques le VD est soumis à de faibles pressions de remplissage et d'éjection et présente une paroi beaucoup plus fine comparée à

celle du VG. Le VD est très compliant et s'adapte bien aux variations de volume engendrées par le retour veineux mais est très sensible aux variations de pression.

L'HTP est la cause la plus fréquente de survenue de dysfonction ventriculaire droite⁸⁵. En effet dans l'HTP le remodelage et la vasoconstriction réduisent la lumière des vaisseaux faisant ainsi obstacle à l'écoulement du sang. Le VD fait face à une augmentation de la post-charge au prix d'un épaissement de sa paroi et d'une dilatation de sa cavité, ce remodelage entraînant avec le temps une insuffisance VD qui vient majorer l'insuffisance diastolique VG. En effet le « cœur droit » et le « cœur gauche » partageant un septum et le même sac péricardique, une dilatation du VD et de l'OD va limiter le remplissage VG. La dysfonction VD retrouvée dans l'ICFEp peut concerner la diastole et la systole.

3. Pronostic et traitements

La PA pulmonaire augmente avec l'âge dans la population générale en absence d'IC et est associée à une augmentation de la pression VG diastolique ainsi qu'à un mauvais pronostic⁸⁶. La présence d'une HTP seule augmente la morbi-mortalité qui s'accroît encore lorsque l'HTP est combinée à une ICFEp et cela même lorsque l'HTP est plus modérée⁸⁴. De même la présence d'une dysfonction VD augmente la mortalité dans l'ICFEp et cela indépendamment de celle provoquée par l'HTP⁸⁷.

Concernant les traitements il existe un paradoxe puisque aujourd'hui plusieurs classes de médicaments permettent de réduire la mortalité dans l'HTP pré-capillaire isolée mais pas dans l'HTP post-capillaire isolée ou combinée.

Ainsi les vasodilatateurs⁸⁸ et les antagonistes des récepteurs de l'endothéline tels que le bosentan⁸⁹ et le macitentan⁹⁰ sont associés à une augmentation de la survie dans l'HTP du groupe I de l'OMS. Cependant les vasodilatateurs pourraient provoquer des œdèmes pulmonaires lorsque les pressions VG sont élevées et sont donc peut étudiés dans l'HTP associée à l'ICFEp. Les résultats en terme de survie avec les antagonistes des récepteurs de l'endothéline dans l'ICFEr sont plutôt décevants (cf chapitre III-2) et les rares essais cliniques dans l'HTP associée à l'ICFEp ne regardent pas ses effets sur la mortalité⁹¹.

Ainsi l'HTP post-capillaire seule ou en association avec l'ICFEp reste une pathologie mortelle pour laquelle il n'a actuellement pas de traitement.

E. Rôle du vaisseau dans l'Insuffisance Cardiaque Chronique

1. *Rappels sur le vaisseau physiologique*

Le système circulatoire a pour rôle de distribuer le sang riche en dioxygène (O_2) et nutriments à l'ensemble de l'organisme ainsi que de récupérer les déchets métaboliques et le dioxyde de carbone (CO_2) en vue de leur élimination. Le système circulatoire est composé d'artères, d'artérioles, de capillaires, de veinules et de veines qui présentent des particularités anatomiques selon leur fonction.

Structure des vaisseaux

Les artères partent du cœur et assurent le transport du sang oxygéné vers la périphérie, elles sont formées de trois couches aussi appelées tuniques. La tunique la plus externe, l'adventice est composée de tissu conjonctif et de fibres musculaires et est le lieu d'insertion des fibres nerveuses sympathiques et parasympathiques ainsi que des *vasa-vasorum* nourrissant l'artère. La tunique médiane, la media, présente des variations en fonction du type de vaisseaux, en effet on y trouve en proportions variables des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV), des fibres élastiques et des fibres de collagène. On distingue les artères de conduction, élastiques, caractérisées par une media épaisse et remplie de fibres d'élastine et les artères de distribution, musculaires, dont la media contient plus de CMLV. Les artères élastiques ont un gros diamètre et doivent s'adapter à la pression provenant du cœur alors que les artères de distribution, de diamètre plus petit, régulent la distribution sanguine et maintiennent la pression grâce aux CMLV. Enfin la tunique interne, intima, est composée d'une monocouche de cellules endothéliales reposant sur une lame basale et un tissu conjonctif lâche.

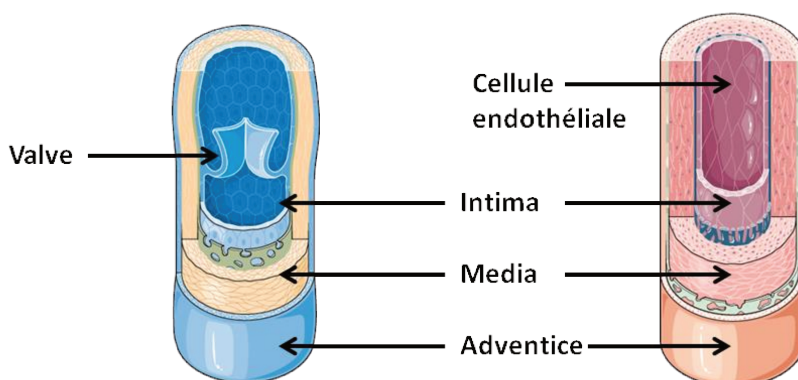


Figure 6 : Illustration des différentes tuniques de la paroi veineuse (gauche) et artérielle (droite). Image adaptée de la banque d'image Servier.

Les artérioles ont un petit diamètre, une media très épaisse et musculaire et sont fortement innervées par le SN sympathique, ces deux paramètres permettant un contrôle précis du flux sanguin. Ils rejoignent les capillaires, plus petits vaisseaux de l'organisme composés uniquement d'une couche de cellules endothéliales reposant sur une lame basale, où s'effectuent les échanges gazeux et métaboliques. Les capillaires rejoignent les veinules qui transportent le sang désoxygéné et riche en déchets métaboliques vers les veines périphériques puis la veine cave inférieure et supérieure qui rejoignent l'OD. Les veines sont également composées des 3 couches retrouvées dans les artères mais leur paroi est plus fine. Les veines sont très compliantes; ainsi elles peuvent contenir un grand volume de sang avec une pression très faible. Ce système à basse pression doit lutter contre l'apesanteur pour renvoyer le sang au cœur. Le retour veineux est assuré par l'action synergique de la contraction musculaire des membres inférieurs et des mouvements respiratoires en association avec l'ouverture et la fermeture des valvules sanguines qui empêchent le reflux de sang.

L'endothélium vasculaire

Longtemps considéré comme une interface inerte entre le sang et la paroi des vaisseaux sanguins on estime maintenant que l'endothélium est un organe à part entière jouant un rôle important dans le contrôle de nombreuses fonctions physiologiques. L'endothélium tapisse la face interne de tous les vaisseaux sanguins, il est donc en contact avec le sang sur sa face apicale et avec les CMLV sur sa face basale. Les cellules endothéliales ont de nombreux récepteurs à leur surface et synthétisent un grand nombre de molécules conférant à l'endothélium un rôle primordial dans l'homéostasie vasculaire.

En conditions physiologique l'endothélium permet de réguler l'homéostasie vasculaire en inhibant l'agrégation plaquettaire, la coagulation⁹², l'inflammation et la prolifération des CMLV ainsi qu'en favorisant la vasodilatation des vaisseaux. Les cellules endothéliales synthétisent en effet des facteurs vasodilatateurs et vasoconstricteurs qui vont agir au niveau de la CMLV pour moduler le diamètre des vaisseaux et ainsi adapter le flux sanguin à la demande de l'organisme.

Parmi les facteurs vasodilatateurs synthétisés par l'endothélium on peut citer la prostaglandine I₂ (PGI₂, ou prostacycline) qui provient du métabolisme de l'acide arachidonique, les facteurs hyperpolarisants dérivés de l'endothélium (EDHF)⁹³, dont des

dérivés de l'acide arachidonique, les acides éicosatriénoïques particulièrement importants chez l'homme⁹⁴. L'endothélium vasculaire synthétise également des facteurs vasoconstricteurs tels que le thromboxane A2, la prostaglandine H2 (PGH2) tous deux dérivés de l'acide arachidonique, l'angiotensine II et l'endothéline 1 (ET)⁹⁵.

Le NO

Le NO est un gaz radicalaire avec une demi-vie très courte (inférieure à 5 secondes), jouant un rôle majeur non seulement dans la vasorelaxation⁹⁶ mais aussi dans les processus d'anti-agrégation plaquettaire et d'anti adhésion leucocytaire. Il diffuse dans les tissus proches de son lieu de synthèse, ainsi au niveau de l'endothélium vasculaire une grande partie du NO synthétisé diffuse vers les CMLV et induit leur relaxation *via* l'activation de la Guanylate Cyclase soluble (GCs). La GCs dégrade le Guanosine Tri-Phosphate (GTP) en GMPc, l'augmentation du taux intracellulaire de GMPc active la protéine kinase G (PKG) qui en phosphorylant différentes cibles induit la relaxation musculaire. Ainsi en phosphorylant le phospholamban, la PKG lève son inhibition sur la SERCA favorisant la recapture de Ca^{2+} dans le RS entraînant ainsi la relaxation musculaire. La PKG en phosphorylant de nombreuses autres cibles, dont le canal Ca^{2+} -ATPase permettant la sortie du calcium intracellulaire et le canal potassique dépendant du calcium KCa^{2+} qui hyperpolarise la membrane cellulaire, entraîne la relaxation musculaire.

Le NO qui diffuse dans la lumière des vaisseaux sanguins va lui être à l'origine de ses actions anti-thrombotiques, anti-athéromateuses et anti-inflammatoires. En effet le NO inhibe l'agrégation plaquettaire et diminue l'expression de molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales empêchant ainsi l'adhésion des leucocytes sur l'endothélium et leur transformation en cellule spumeuse.

Les NO Synthases

Le NO est synthétisé à partir de la L-arginine par une enzyme homodimérique la NOSynthase (NOS). Chaque monomère de NOS est constitué d'un domaine réductase permettant la fixation des cofacteurs de la réaction que sont le Nicotinamide Adénine Dinucleotide Phosphate réduit (NADPH), la Flavine Adénine Dinucléotide (FAD), la Flavine Mononucleotide (FMN) et d'un domaine oxygénase comprenant l'hème, la tétrahydrobioptérine (BH4) ainsi que le site de fixation de la calmoduline et de la L-Arginine.

Il existe trois isoformes très proches de NOS, chacune découverte dans un tissu différent, à savoir les NOS I, II et III ou NOS neuronale, inductible et endothéliale respectivement, dont les spécificités résident dans leur expression et leur activation. Ainsi les NOS neuronale (NOSn) et endothéliale (NOSe) sont constitutivement exprimées mais nécessitent une activation par des stimuli physiques ou chimiques et produisent une faible quantité de NO. Au contraire l'expression génomique de la NOS inductible (NOSi) n'est pas constitutive mais induite par des cytokines pro-inflammatoires telles que le facteur de nécrose tissulaire- α (TNF α), l'interféron γ et l'interleukine-1 (IL-1). Cependant une fois exprimée et sous forme d'homodimère elle ne nécessite pas d'activation et produit de grandes quantités de NO. La NOSi a d'abord été retrouvée dans les macrophages où le NO joue un rôle bactéricide important mais est présente dans d'autres types cellulaires comme les CMLV, les cardiomyocytes et les cellules endothéliales en conditions inflammatoires et pathologiques. Ainsi la surproduction de NO par la NOSi serait impliquée dans la vasoplégie et la dysfonction cardiaque observées dans le sepsis⁹⁷.

La NOS endothéliale

La NOSe a d'abord été retrouvée au niveau des cellules endothéliales et est essentielle pour garantir les propriétés de l'endothélium et la fonction vasculaire. Son expression a également été retrouvée dans les cardiomyocytes⁹⁸ et les cellules épithéliales bronchiques⁹⁹.

Comme évoqué précédemment afin que la NOSe puisse produire du NO elle doit être activée, cette activation pouvant être dépendante ou indépendante du calcium.

L'activation dépendante du calcium se fait en deux temps, un premier où la concentration intracellulaire de calcium augmente dans la cellule endothéliale et limite l'interaction inhibitrice de la NOSe avec la cavéoline-1¹⁰⁰ et un deuxième temps où le calcium se lie à la calmoduline qui va alors se fixer sur la NOSe. La liaison de la calmoduline à la NOSe facilite le transport d'électrons et la formation de NO. Cette forme d'activation est observée par fixation d'un agoniste sur les récepteurs de la cellule endothéliale tels que l'acétylcholine (Ach), la bradykinine, ou l'histamine.

L'activation indépendante du calcium est la forme d'activation principale de la NOSe en conditions physiologiques. Elle dépend des forces de cisaillement exercées au niveau de

l'endothélium qui vont engendrer des modifications post-traductionnelles de la NOSe, telle que la phosphorylation activatrice des résidus Ser¹¹⁷⁷ et Ser⁶³⁵ par la protéine kinase A et la déphosphorylation la thréonine⁴⁹⁵ par des protéines phosphatases. Cette voie est notamment activée par l'insuline.

En conditions expérimentales la voie d'activation de la NOSe indépendante du calcium est plus rapidement altérée que celle dépendante du calcium puisque une abolition de la dilatation médiée par le flux (FMD) est parfois observée alors que la relaxation dépendant de l'acétylcholine n'est pas altérée.

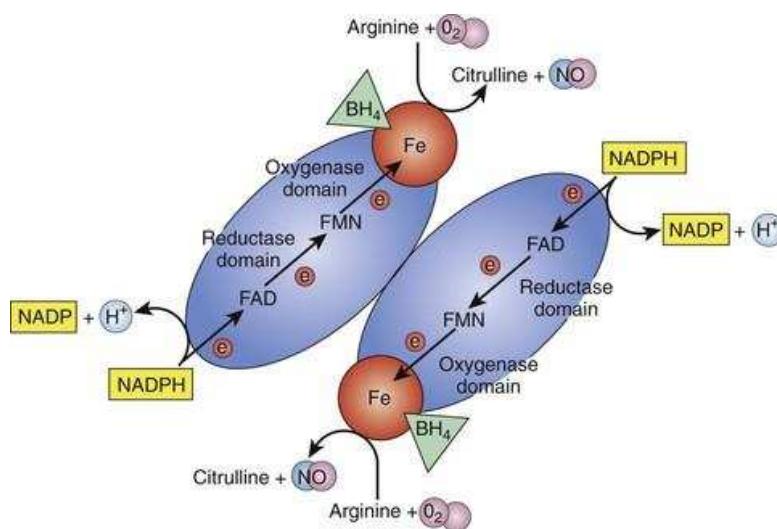


Figure 7 : Représentation schématique d'un dimère de la NO synthase endothéliale.

Illustration issue de Velazquez et Wang¹⁰¹

2. Le vaisseau pathologique

Dans de nombreuses pathologies cardiovasculaires, dont l'insuffisance cardiaque, une diminution de la FMD est observée chez les patients¹⁰² témoignant d'une dysfonction vasculaire.

Cette diminution de la FMD est due à une altération des fonctions de l'endothélium vasculaire qui subit un changement de phénotype et devient pro-agrégant, pro-inflammatoire et pro-vasoconstricteur. On parle alors de dysfonction endothéliale et on observe une rupture dans la balance entre production de facteurs vasodilatateurs (NO, EETs) et facteurs vasoconstricteurs (ET-1, Ang-II) en faveur de ces derniers. En effet certaines études montrent une augmentation des taux circulants d'ET-1 et d'Ang-II dans l'IC et

d'autres une diminution de la biodisponibilité du NO qui peut résulter d'une diminution de sa production ou d'une augmentation de sa dégradation.

Diminution de la production de NO

La diminution de la production de NO peut avoir différentes origines comme la diminution de la disponibilité des substrats et co-facteurs mais nous nous focaliserons sur la diminution de l'expression ou de l'activité de la NOSe.

La NOSe est très finement régulée au niveau génomique ainsi qu'au niveau protéique par des modifications post-traductionnelles. Une étude a montré une diminution de l'expression de la NOSe dans le plasma de patients ICC et *in vitro* lors de l'incubation avec du TNF- α ¹⁰³ montrant un rôle des molécules pro-inflammatoires sur la dysfonction endothéliale. Le TNF- α déstabilise l'ARNm de la NOSe chez l'homme¹⁰⁴ et est associé à la dysfonction endothéliale chez le rat Zucker obèse *fa/fa* qui est un modèle de syndrome métabolique¹⁰⁵.

Une diminution de l'activité de la NOSe peut être la conséquence d'une modification dans la balance entre la phosphorylation et la déphosphorylation de certains acides aminés participant à son activation. Ainsi une augmentation des phosphorylations réprimant l'activité de la NOSe a été rapportée en parallèle d'une diminution des phosphorylations favorisant son activité. De plus, une augmentation de déphosphorylation par des protéines phosphatases a été observée. Au sein de notre groupe il a été montré grâce à des KO totaux¹⁰⁶ et endothéliaux¹⁰⁷ l'implication délétère de la protéine phosphatase 1B dans la dysfonction endothéliale et cardiaque après IDM *via* une diminution de biodisponibilité en NO.

Un autre phénomène participant à la diminution de la production du NO est le découplage de la NOSe en conditions de stress oxydant qui, active sous forme de monomère, produit l'anion superoxyde (O_2^-) au lieu du NO. L'oxydation du cofacteur BH4 en conditions de stress oxydant participe au découplage de la NOSe¹⁰⁸ et amplifie la dysfonction endothéliale.

Enfin la diminution des forces de cisaillements observée lors de la dysfonction endothéliale est associée à une diminution de l'expression génique de la NOSe¹⁰⁹ et de son activité en modifiant le profil de phosphorylation de la NOSe¹¹⁰ diminuant ainsi la production de NO.

Augmentation de la dégradation du NO

Le NO étant une espèce radicalaire il peut interagir avec d'autres molécules radicalaires lorsque leur concentration augmente lors d'un stress oxydant. L'anion superoxyde est un radical produit dans les cellules par la NADPH oxydase, les mitochondries, la xanthine oxydase ainsi que la NOSe découplée^{111,112}. Lors d'un stress oxydant le NO produit par la NOSe va interagir avec l'anion superoxyde pour former du peroxynitrite (ONOO⁻).

Outre le fait que le NO qui forme du peroxynitrite n'assure plus ses fonctions physiologiques (vasodilatation, inhibition de l'adhésion plaquettaire et leucocytaire...), l'augmentation de la production de peroxynitrite induit des dommages cellulaires en oxydant les protéines et en peroxydant les acides gras.

Il existe donc un cercle vicieux entre découplage de la NOSe produisant de l'anion superoxyde qui va interagir avec le peu de NO synthétisé pour former du peroxynitrite augmentant ainsi le stress oxydant et donc la dysfonction endothéliale.

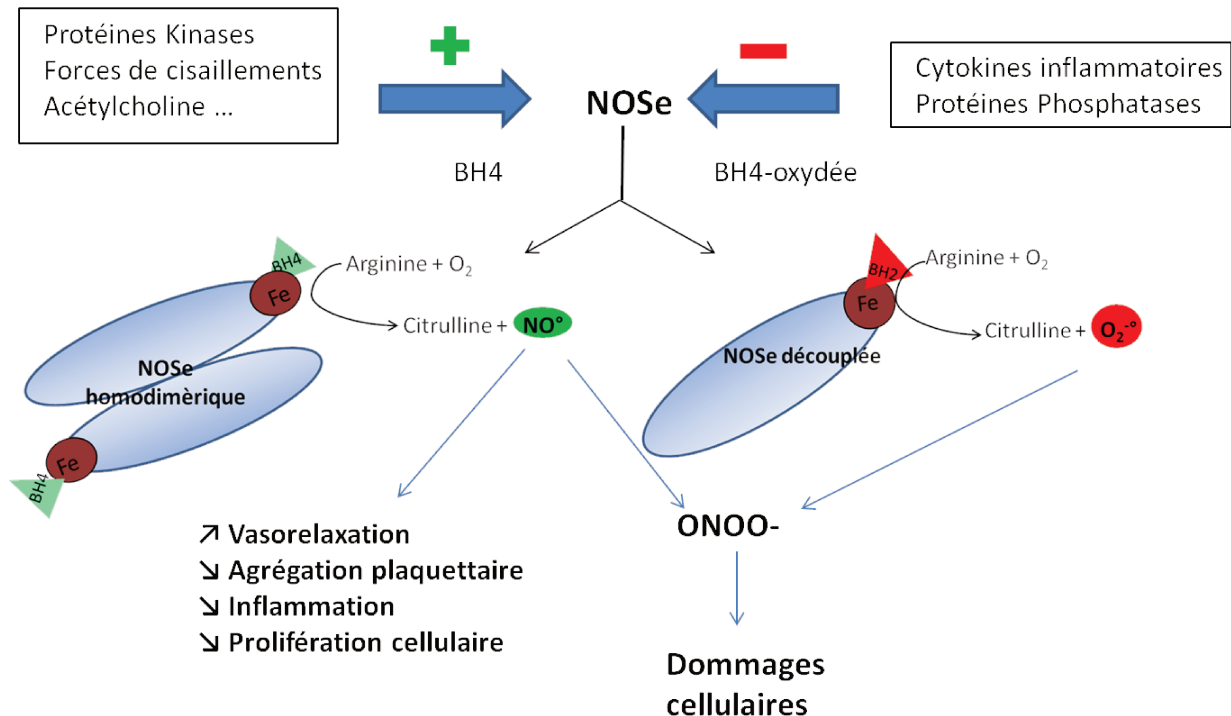


Figure 8 : Régulateurs de l'activité de la NOS endothéliale et fonctionnement de la NOSe en conditions physiologiques (gauche) et lors d'un stress oxydant (droite).

La dysfonction coronaire dans l'ICFep

La prévalence d'une dysfonction endothéliale coronaire chez les patients ICFep est difficile à évaluer et concernerait selon les études entre 50% et 68 % des patients^{113,114}.

La dysfonction endothéliale coronaire est à la base du paradigme de 2013⁴⁸ mettant en avant le rôle de l'inflammation microvasculaire coronaire dans les dysfonctions et remodelages myocardiques observés dans l'ICFep. L'inflammation systémique de bas grade observée chez le patient ICFep se répercuterait au niveau de la microcirculation coronaire et provoquerait un stress oxydant. Ce stress oxydant myocardique a été visualisé dans des biopsies de patients ICFep^{50,63} et suggère une diminution de la signalisation du NO dans le myocarde. Or le NO étant impliqué dans la relaxation myocytaire la diminution de sa biodisponibilité cardiaque participe aux perturbations de la relaxation myocardique et donc à la dysfonction diastolique observée dans l'ICFep.

Des études montrent chez des patients présentant une dysfonction diastolique¹¹⁵ isolée une altération de la dilatation coronaire dépendant de l'acétylcholine et chez les patients ICFep une dysfonction microvasculaire coronarienne¹¹⁶ ainsi qu'une diminution de la réserve coronaire¹¹⁷.

Ces études suggèrent un lien entre la dysfonction endothéliale coronaire et la dysfonction diastolique impliquant probablement une diminution de la production de NO.

Ce lien semble être confirmé par l'amélioration de la fonction endothéliale en association avec une diminution des symptômes de l'intolérance à l'effort par l'utilisation du sildénafil chez le sujet IC¹¹⁸.

Cependant actuellement dans l'ICFep les traitements visant à rétablir des taux de NO ou de GMPc n'ont pas montré d'efficacité sur la capacité à l'effort⁷⁴.

Néanmoins, ces données permettent de penser que la protection de l'endothélium coronaire constitue une cible importante des traitements actuels ou futurs de l'ICFep.

II. Le syndrome métabolique

A. Définition

Le syndrome métabolique fait actuellement référence à un ensemble de perturbations physiologiques, biochimiques, cliniques et métaboliques augmentant directement le risque de survenue d'événements cardiovasculaires, de diabète de type 2 et de toute cause de mortalité^{119,120}.

La définition du syndrome métabolique (SM) ne cesse d'évoluer depuis 1920 où un médecin Suédois, Kylin, fit le lien entre hypertension, hyperglycémie et la maladie de « la goutte ». En 1988, Reaven définit le SM comme étant un ensemble de facteur de risque pour le diabète et les maladies cardiovasculaires et introduit le concept d'insulinorésistance¹²¹. Depuis cette date plusieurs modifications du nom du syndrome ainsi que des critères pour son diagnostic ont eu lieu, l'obésité abdominale devenant un des critères majeurs car considéré comme le plus corrélé à l'insulinorésistance. Le tableau 2 regroupe les évolutions des critères du SM des principales institutions de santé entre 1998 et 2005, date à laquelle la Fédération Internationale du Diabète (IDF) a proposé des nouveaux critères et à pris en compte l'origine ethnique dans la valeur seuil d'obésité.

Selon la définition de l'IDF on parle de syndrome métabolique lorsqu'un patient présente une obésité abdominale et deux autres critères parmi la liste suivante :

- Taux de triglycérides ≥ 1.7 mmol/L
- Taux d'HDL-C < 1.03 mmol/L chez les hommes, et < 1.29 mmol/L chez les femmes
- Hyperglycémie à jeun > 5.6 mmol/L
- Pressions artérielles systolique ≥ 130 mmHg et/ou diastolique ≥ 85 mmHg

Le nombre de personnes atteintes du SM est tellement important qu'on parle au niveau mondial d'épidémie pour laquelle la prévalence augmente avec l'âge et les changements de mode de vie ainsi qu'en fonction des critères utilisés pour le diagnostic. En effet cette « épidémie » a commencé dans les pays industrialisés au mode de vie sédentaire et se développe fortement dans les pays « s'occidentalisant ». Ainsi aux Etats-Unis selon la dernière étude sur la période 2007-2012 la prévalence moyenne du SM était de 34%¹²². En France en 2008, 18% des femmes et 23% des hommes âgés de 35 à 65 ans étaient atteints

du SM ¹²³. La prévalence importante du SM et son retentissement sur la santé des patients induisent un coût socio-économique considérable qui risque de s'accroître dans les années à venir.

TABLE 1: Diagnostic criteria proposed for the clinical diagnosis of the MetS.

Clinical measures	WHO (1998) [5]	EGIR (1999) [6]	ATPIII (2001) [7]	AACE (2003) [8]	IDF (2005) [9]
Insulin resistance	IGT, IFG, T2DM, or lowered insulin Sensitivity ^a plus any 2 of the following	Plasma insulin >75th percentile plus any 2 of the following	None, but any 3 of the following 5 features	IGT or IFG plus any of the following based on the clinical judgment	None
Body weight	Men: waist-to-hip ratio >0.90; women: waist-to-hip ratio >0.85 and/or BMI > 30 kg/m ²	WC ≥94 cm in men or ≥80 cm in women	WC ≥102 cm in men or ≥88 cm in women	BMI ≥ 25 kg/m ²	Increased WC (population specific) plus any 2 of the following
Lipids	TGs ≥150 mg/dL and/or HDL-C <35 mg/dL in men or <39 mg/dL in women	TGs ≥150 mg/dL and/or HDL-C <39 mg/dL in men or women	TGs ≥150 mg/dL HDL-C <40 mg/dL in men or <50 mg/dL in women	TGs ≥150 mg/dL and HDL-C <40 mg/dL in men or <50 mg/dL in women	TGs ≥150 mg/dL or on TGs Rx. HDL-C <40 mg/dL in men or <50 mg/dL in women or on HDL-C Rx
Blood pressure	≥140/90 mm Hg	≥140/90 mm Hg or on hypertension Rx	≥130/85 mm Hg	≥130/85 mm Hg	≥130 mm Hg systolic or ≥85 mm Hg diastolic or on hypertension Rx
Glucose	IGT, IFG, or T2DM	IGT or IFG (but not diabetes)	>110 mg/dL (includes diabetes)	IGT or IFG (but not diabetes)	≥100 mg/dL (includes diabetes) ^b
Other	Microalbuminuria: Urinary excretion rate of >20 mg/min or albumin: creatinine ratio of >30 mg/g.			Other features of insulin resistance ^c	

^aInsulin sensitivity measured under hyperinsulinemic euglycemic conditions, glucose uptake below lowest quartile for background population under investigation.

^bIn 2003, the American Diabetes Association (ADA) changed the criteria for IFG tolerance from >110 mg/dl to >100 mg/dl [10].

^cIncludes family history of type 2 diabetes mellitus, polycystic ovary syndrome, sedentary lifestyle, advancing age, and ethnic groups susceptible to type 2 diabetes mellitus.

BMI: body mass index; HDL-C: high density lipoprotein cholesterol; IFG: impaired fasting glucose; IGT: impaired glucose tolerance; Rx: receiving treatment; TGs: triglycerides; T2DM: type 2 diabetes mellitus; WC: waist circumference.

Tableau 2 : Critères diagnostiques du Syndrome Métabolique de différentes institutions. Obtenu à partir de Kaur et al.¹²⁴

B. Physiopathologie et conséquences cardiovasculaires du syndrome métabolique

Malgré des difficultés à définir le SM et les variations selon les institutions dans les critères diagnostiques, la physiopathologie et les conséquences du SM sont plutôt bien connus. Nous nous intéresserons plus particulièrement aux conséquences cardiovasculaires de chaque critère du SM¹²⁵⁻¹²⁷. En effet chaque critère pris individuellement est un facteur de risque pour la survenue d'évènements cardiovasculaires et la présence de plusieurs facteurs de risque peut majorer la dysfonction cardiovasculaire et augmenter la mortalité. De plus chaque critère individuel peut favoriser l'apparition d'une autre perturbation métabolique entraînant ainsi un cercle vicieux.

1. Caractéristique du syndrome métabolique : l'obésité abdominale

L'obésité abdominale est selon la définition de l'IDF le critère *sine qua non* du SM. Il est néanmoins important de souligner que l'obésité abdominale fait référence au dépôt d'adipocytes au niveau des viscères et ne concerne pas les adipocytes sous-cutanés.

L'obésité abdominale est associée à plusieurs troubles cardiovasculaires parmi lesquelles on peut citer l'hypertension¹²⁸, la formation ou rupture de plaque d'athérome ainsi que l'insulinorésistance¹²⁹.

Le tissu adipeux, longtemps considéré comme un simple organe de stockage, est maintenant reconnu comme organe endocrine synthétisant de nombreuses adipokines dont certaines sont des cytokines inflammatoires. En effet chez les personnes obèses il a été montré dans le tissu adipeux viscéral une infiltration de macrophages conduisant à une inflammation de bas grade capable par la suite de diffuser à l'état systémique. De fait, plusieurs études pré-cliniques permettent de relier les modifications du tissu adipeux aux altérations cardiovasculaires, par exemple dans le contexte du vieillissement¹³⁰.

Ainsi les adipocytes peuvent sécréter des cytokines inflammatoires telles que l'interleukine-6 et le TNF- α , cette dernière étant directement impliquée dans le développement de l'insulinorésistance¹³¹. En effet il a été démontré une augmentation de la concentration en TNF- α dans le tissu adipeux d'animaux obèses ainsi que chez des humains

obèses et insulino-résistants. Le TNF- α est impliqué dans le développement de l'insulino-résistance *via* une diminution de la phosphorylation du Récepteur à l'Insuline (RI) ainsi que de l'IRS-1, *Insulin Receptor Substrate-1* diminuant la transduction du signal « insuline »¹³².

Une autre adipokine, la leptine, une hormone agissant au niveau du SN central pour permettre le contrôle de la prise alimentaire en stimulant la voie de la satiété, est retrouvée dans le sang de manière proportionnelle à la masse de tissu adipeux. Un phénomène de résistance à la leptine peut-être observé chez le sujet obèse où les taux plasmatiques sont plus élevés mais ne permettent plus de réguler la prise alimentaire. La résistance à la leptine est également associée à une activation du système nerveux sympathique (SNS) engendrant une augmentation de la pression artérielle et de la résistance vasculaire périphérique¹³³. La résistance à la leptine provoquée par l'obésité conduit donc au maintien de cette obésité et favorise la survenue d'un autre paramètre du SM à savoir l'hypertension artérielle. L'obésité consécutive à un défaut dans la signalisation de la voie de la leptine est retrouvée dans le modèle murin *ob/ob* avec mutation dans le gène de la leptine et dans le modèle de rat Zucker *fa/fa* pour lequel la mutation est au niveau du récepteur de la leptine^{134,135}. Le rat Zucker *fa/fa* développe un SM ainsi que des dysfonctions cardiovasculaires, notamment diastolique et endothéliale^{70,136,137} comme chez l'homme permettant une meilleure compréhension de la pathologie¹³⁸.

Parallèlement à l'augmentation de la libération de ces adipokines on observe chez le sujet ayant un SM une diminution des taux plasmatiques d'adiponectine¹³⁹. Cette diminution peut sembler paradoxale puisque l'adiponectine est une hormone exclusivement synthétisée par les adipocytes¹⁴⁰ abondamment présente dans le plasma d'individus sains mais dont la concentration diminue fortement dans l'obésité seule¹⁴⁰ ou en association avec le SM¹⁴¹ ainsi que dans le diabète¹⁴² et les coronaropathies¹⁴³. Sa synthèse est stimulée par l'*insulin-like growth factor-1* (IGF-1) et est inhibée par le TNF- α , les glucocorticoïdes, les agonistes adrénergiques¹⁴⁴. Ainsi l'état inflammatoire du tissu adipeux peut diminuer sa synthèse. Cette hormone a de multiples propriétés permettant l'augmentation de la sensibilité à l'insuline et la régulation du métabolisme lipidique et glucidique ainsi que des propriétés anti-inflammatoires et anti athéromateuses¹⁴⁴. Ces dernières s'exercent en inhibant l'activation endothéliale, la prolifération des CMLV et le remodelage vasculaire ainsi que la conversion des macrophages en cellules spumeuses¹⁴⁵. La diminution de la concentration

plasmatique en adiponectine dans l'obésité viscérale couplée à une augmentation d'adipocytokines pro-athérogènes accélère le processus d'athérosclérose et le risque de rupture de plaque.

2. Caractéristique du syndrome métabolique : les dyslipidémies

Les dyslipidémies retrouvées dans le SM sont caractérisées par une augmentation du taux de triglycérides parallèlement à une diminution du taux de HDL-C (lipoprotéine de haute densité) plasmatique et sont directement liées à l'obésité androïde et à l'insulinorésistance. Elles augmentent le risque de survenue d'événements cardiovasculaires *via* la formation de plaque d'athérome. En parallèle, le lien entre dyslipidémies et ICFEp est bien illustré par le fait que les régimes riches en graisse (high fat diet) induisent une dysfonction diastolique dans les modèles murins¹⁴⁶.

Triglycérides

L'augmentation du taux de triglycérides (TG) plasmatique chez le sujet obèse provient d'une part d'un excès d'apport calorique et d'une autre part d'une augmentation de sa formation au niveau hépatique. Cette augmentation des TG est aussi associée à une augmentation de la concentration plasmatique en acides gras libres. L'hyperinsulinémie participe à l'augmentation des taux de TG et d'acides gras en activant un facteur de transcription favorisant la lipogénèse. D'autre part l'insulinorésistance au niveau du tissu adipeux engendre une lipolyse accrue, l'insuline n'exerçant plus son effet inhibiteur sur la lipase, ce qui conduit à une élévation des acides gras circulants¹⁴⁷. L'augmentation des taux de TG est associée à une augmentation de la survenue de maladie cardiaque ischémique¹⁴⁸.

Lipoprotéine de basse densité (LDL)

L'insulinorésistance est également responsable d'une augmentation de la synthèse de *lipoprotéine de très basse densité* (VLDL) et d'une diminution de leur clairance ce qui augmente leur concentration plasmatique et le risque athérogène. En effet les molécules de LDL pénétrant dans l'intima des vaisseaux subissent une oxydation et sont captés par les macrophages formant ainsi des cellules spumeuses à l'origine des lésions athérosclérotiques¹⁴⁹.

Lipoprotéine de haute densité (HDL-C)

L'HDL-C permet le transport du cholestérol et des triglycérides de la circulation sanguine vers le foie et est associé à une diminution de formation de plaque d'athérome et des pathologies cardiovasculaire en général¹⁵⁰. Sa concentration plasmatique est diminuée dans le SM. Ceci s'explique en partie par l'augmentation de la concentration en VLDL entraine une augmentation de la concentration en HDL riche en triglycérides qui est dégradé par les lipases hépatiques diminuant *in fine* le nombre de molécules de HDL pouvant assurer le transport du cholestérol des vaisseaux vers le foie.

3. Caractéristique du syndrome métabolique : l'hyperglycémie à jeun

L'hyperglycémie à jeun est un critère diagnostique du SM dans la définition de l'IDF de 2005 qui peut faire l'objet de débats. En effet il est possible qu'une personne ne présente pas d'hyperglycémie à jeun mais présente des perturbations dans le métabolisme glucidique avec une élévation élevée de la glycémie postprandiale qui perdure dans le temps. Ainsi, afin de ne pas exclure une personne de la définition du SM sur ce critère il semble plus pertinent de s'intéresser à une perturbation de la signalisation de l'insuline.

Rôles physiologiques de l'insuline

L'insuline est une hormone synthétisée par les cellules β des îlots de Langerhans jouant un rôle très important dans le maintien de l'homéostasie énergétique mais aussi dans le tonus vasculaire. L'insuline diminue la glycémie *via* plusieurs mécanismes tels que l'entrée du glucose plasmatique dans les tissus insulino-sensibles, la stimulation de la glycolyse et de la transformation du glucose en glycogène. La signalisation de l'insuline engendre également une inhibition de la lipolyse dans le tissu adipeux, ainsi que l'inhibition de la néoglucogenèse dans le foie et le muscle squelettique.

L'insuline doit se lier sur son récepteur RI qui est une glycoprotéine transmembranaire appartenant à la superfamille des récepteurs à activité tyrosine kinase afin de pouvoir exercer ses actions hypoglycémiantes. Seuls les tissus insulino-sensibles que sont le foie, le muscle squelettique (et cardiaque) et le tissu adipeux expriment le RI. La liaison de l'insuline sur son récepteur entraine un changement de conformation de celui-ci à l'origine de la fixation d'ATP sur la partie intra-cytoplasmique du récepteur et de

l'autophosphorylation du récepteur sur des résidus tyrosine permettant son activation¹⁵¹. Le récepteur activé va phosphoryler des partenaires protéiques intracellulaires comme les protéines IRS dont il existe 4 isoformes, ou la protéine Shc (*Src homologous and collagen protein*).

Les réponses à l'insuline passent par deux voies de signalisation que sont la voie PI3K/AKT (phosphatidyl inositol-3 kinase) responsable de la plupart des effets métaboliques de l'insuline et la voie MAPK (Mitogen-activated protein kinase) qui contrôle principalement les effets prolifératifs et mitogènes de l'insuline :

1) Voie PI3K

La liaison des protéines IRS-1 et IRS-2 sur le récepteur activé permet l'ancrage d'autres protéines dont la PI3K qui va phosphoryler le Phosphatidylinositol 4,5 biphosphate (PIP2) en phosphatidyl inositol 3,4,5 triphosphate (IP3) au niveau interne de la membrane plasmique. Cette phosphorylation va permettre le recrutement de la phosphatidyl inositol-dependent kinase 1 (PDK1) qui va à son tour activer par phosphorylation plusieurs protéines à activité sérine-thréonine kinases dont Akt (aussi appelée protéine kinase B) qui joue un rôle important non seulement dans le métabolisme mais aussi dans la vasodilatation.

2) Voie MAPK

La voie MAPK peut être activée *via* les protéines IRS mais aussi par l'enzyme Shc. L'activation de Shc va initier une cascade de phosphorylations stimulant une suite de kinases dont MEK1/2 (MAPK-ERK Kinase 1/2) qui phosphoryle les MAPK. Les MAPK sont des sérine-thréonine kinases régulant l'activation ou l'inhibition de la transcription de gènes cibles, la différenciation, la croissance cellulaire ainsi que la synthèse protéique.

Les rôles métaboliques de l'insuline passent principalement par la voie PI3K-Akt qui permet, entre autres, de diminuer l'hyperglycémie post-prandiale en permettant la translocation du transporteur de glucose GLUT-4 (Glucose Transporter-4) au niveau de la membrane plasmique des muscles squelettiques¹⁵². Cette action est primordiale pour réguler la glycémie puisqu'il a été montré dans un test de clamp hyperinsulinémique/euglycémique chez le sujet sain que le muscle squelettique est responsable de la captation de 80% du glucose sanguin¹⁵³. Le foie participe, sous la

dépendance de l'insuline, au maintien de l'homéostasie glucidique en fonction de la glycémie. Ainsi l'insuline inhibe la libération du glucose hépatique par inhibition de la néoglucogenèse et de la glycogénolyse tout en favorisant la captation et la transformation hépatique du glucose sanguin en glycogène. L'hyperglycémie à jeun retrouvée dans le SM et le diabète serait dû à un excès de néoglucogenèse reflétant une insulino-résistance hépatique¹⁵¹.

Au niveau du tissu adipeux l'insuline favorise la lipogenèse transformant les acides gras en triglycérides et inhibe la lipolyse.

En plus de ses rôles sur le métabolisme glucidique l'insuline, qui est une hormone anabolisante, favorise la captation des acides aminés par ses tissus-cibles ainsi que la synthèse de protéines tout en inhibant la protéolyse et peut donc jouer un rôle dans l'hypertrophie cardiaque.

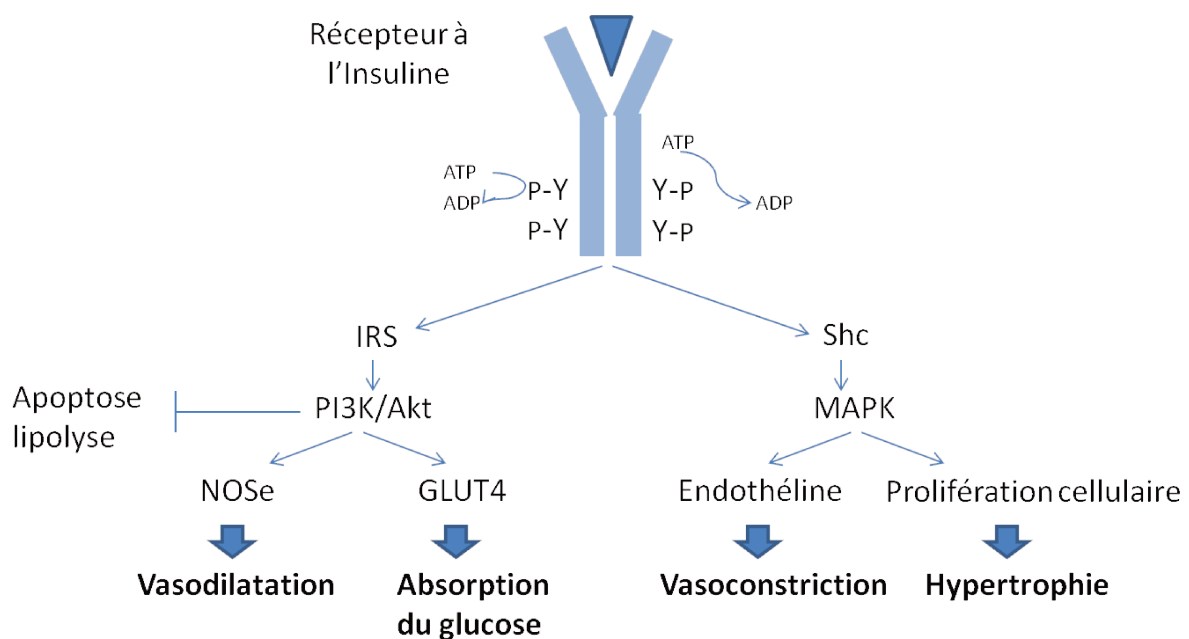


Figure 9 : Représentation schématique de la signalisation de l'insuline.

Actions sur le système cardiovasculaire

Au-delà de ses rôles métaboliques l'insuline et sa cascade de signalisation agit de manière plus ou moins directe sur le cœur et les vaisseaux.

Les rôles de l'insuline dans le système cardiovasculaire n'ont pas été faciles à comprendre puisque des réponses diamétralement opposées ont été observées en fonction de la voie de signalisation exprimée. En effet au niveau de l'endothélium l'insuline peut soit

induire une vasodilatation par activation de la NOSe *via* la voie PI3K-Akt soit induire une vasoconstriction en stimulant la production d'endothéline *via* la voie MAPK¹⁵⁴. Cependant dans les conditions physiologiques la voie PI3K prédominerait et l'insuline aurait une action vasodilatatrice permettant une meilleure perfusion des tissus périphériques et du myocarde. L'activation de la voie MAPK par l'insuline augmenterait la synthèse de molécule d'adhésion au niveau de l'endothélium telles que la E-Selectine et VCAM-1 (*Vascular cell adhesion protein 1*) permettant une interaction avec les leucocytes et serait ainsi associée à un risque athérogène.

Au niveau cardiaque l'insuline est un régulateur clé la croissance des cardiomyocytes puisqu'on observe une diminution de la taille des cardiomyocytes chez des souris KO pour le RI dans le cœur¹⁵⁵. Ainsi lors de l'hyperinsulinisme compensatoire de l'insulinorésistance l'excès de signalisation participe à l'hypertrophie des cardiomyocytes et au remodelage ventriculaire.

L'insuline permet également la survie des cardiomyocytes en inhibant l'apoptose par phosphorylation de BCL2 (B-cell leukemia/lymphoma 2) *via* la voie PI3K /Akt¹⁵⁶.

Conséquences d'une dérégulation dans la signalisation de l'insuline

Une intolérance à l'insuline est retrouvée dans la majorité des patients atteints du SM et se traduit par une diminution de la sensibilité et/ou de la réponse à l'insuline. *Cusi et al* démontrèrent que lors de l'insulinorésistance seule la voie PI3K-Akt est altérée alors que la voie MAPK reste fonctionnelle¹⁵⁷. La voie PI3K/Akt étant responsable de la plupart des effets métaboliques de l'insuline il en résulte une perturbation de l'homéostasie glucidique et lipidique. Celle-ci se traduit par une hyper-insulinémie compensatoire, une augmentation de la concentration plasmatique en glucose ainsi qu'une levée d'inhibition de la lipolyse dans le tissu adipeux conduisant à une libération d'acides gras libres dans la circulation sanguine.

Au-delà des effets métaboliques, la résistance à l'insuline diminue l'activité de la NOSe conduisant à une diminution de la synthèse de NO et à une dysfonction endothéliale. Ceci est aggravé par le fait que la voie MAPK reste fonctionnelle et continue de stimuler la synthèse d'endothéline entraînant une vasoconstriction et une augmentation des résistances périphériques s'opposant au travail cardiaque¹⁵⁷.

Enfin, le lien entre hyperglycémie et IC est indirectement suggéré par plusieurs grands essais cliniques récents démontrant les effets bénéfiques sur la morbi-mortalité liée à l'insuffisance cardiaque de traitements antidiabétiques, en particulier les inhibiteurs du co-transporteur sodium-glucose de type 2^{158,159}, même s'il est probable que ces effets soient partiellement indépendants du contrôle de la glycémie.

4. Caractéristique du syndrome métabolique : l'hypertension artérielle

L'hypertension artérielle (HTA) augmente le risque d'évènements cardiovasculaire délétères tels que l'athérosclérose majorant ainsi le risque de survenue d'accident vasculaire cérébral (AVC) et d'IC. En France l'hypertension artérielle toucherait pratiquement une personne sur trois¹⁶⁰. Cependant l'étude ESTEBAN prenait comme valeurs seuil d'hypertension une PAS >140 mmHg et une PAD>90 mmHg alors que dans les recommandations de la Fédération Internationale du Diabète on parle d'HTA lorsqu'on dépasse 135 et 85 mmHg respectivement laissant présager d'un nombre plus important de personnes souffrant d'HTA et présentant un SM.

L'HTA, bien que la plupart du temps sans étiologie connue, est souvent associée aux désordres métaboliques tels que l'obésité, l'intolérance au glucose et la dyslipidémie¹⁶¹. L'insulinorésistance en favorisant la voie MAPK et la synthèse d'endothéline engendre une vasoconstriction participant à l'HTA¹⁶².

De plus, l'insulinorésistance est associée à une activation du SRAA et l'angiotensine II est impliquée dans l'établissement de l'HTA¹⁶³.

III. Nouvelles cibles thérapeutiques de la dysfonction cardiovasculaire associée au syndrome métabolique

A. Cibler le Récepteur Minéralocorticoïde

Le SRAA est un système jouant un rôle essentiel dans la régulation de la balance hydro-sodée et par conséquent dans la régulation de la pression artérielle qui se retrouve suractivé dans les pathologies cardiovasculaires¹⁶⁴ et rénales^{165,166} et participe à leur physiopathologie. Il existe plusieurs effecteurs dans le SRAA mais nous allons nous concentrer dans cette partie sur l'aldostérone et son récepteur appelé récepteur minéralocorticoïde (RM).

1. Synthèse de l'aldostérone

L'aldostérone est une hormone minéralocorticoïde synthétisée dans le cortex de la glande surrénale à partir du cholestérol en réponse à divers stimuli comme l'angiotensine II, l'hyperkaliémie et l'endothéline-1. L'aldostérone exerce ses actions de maintien de l'homéostasie hydrosodée principalement *via* sa liaison au récepteur minéralocorticoïde.

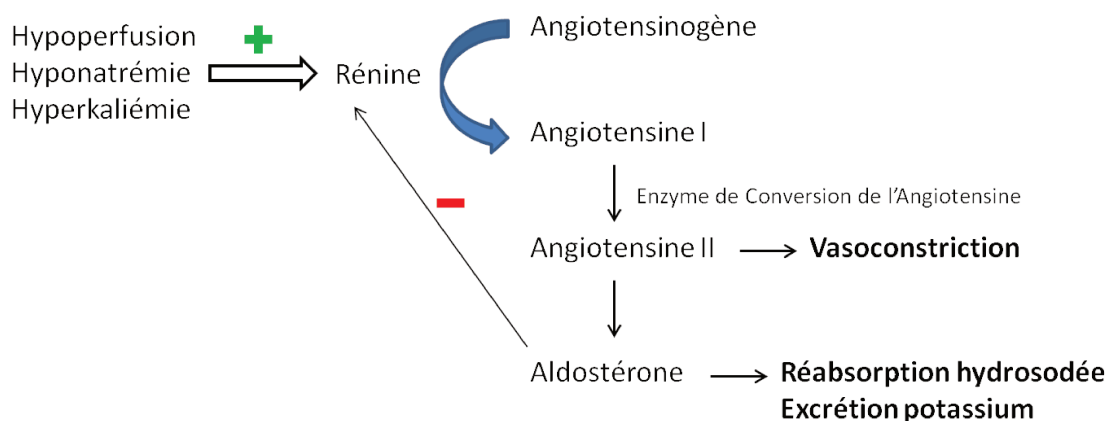


Figure 10 : Représentation schématique de la stimulation de la synthèse de l'aldostérone.

2. Le Récepteur Minéralocorticoïde

Le RM appartient à la famille des facteurs de transcriptions nucléaires stéroïdiens et est présent dans un grand nombre de types cellulaires tel que les cellules épithéliales rénales, les cardiomyocytes, les CMLV¹⁶⁷, les cellules endothéliales¹⁶⁸ ainsi que les adipocytes¹⁶⁹. Le RM n'est pas sélectif de l'aldostérone et peut être activé par le cortisol mais une enzyme, la 11 β HSD2, transforme le cortisol en cortisone qui n'a pas d'affinité pour le RM¹⁷⁰. Cette enzyme d'abord trouvée dans les tissus épithéliaux est également exprimée dans les CMLV¹⁶⁷.

En absence de ligand le RM est retenu dans le cytoplasme par un complexe de protéines dont les HSP (*heat shock proteins*), une fois activé par l'aldostérone il va être transloqué dans le noyau et se fixer sur des HRE (*hormone response element*) de gènes cibles. Au niveau du tissu épithélial rénal parmi les gènes activés on peut citer ceux impliqués dans la formation du canal sodique épithélial (ENaC) et de la pompe Na⁺/K⁺-ATPase permettant une réabsorption de sodium et celui de la serine/thréonine protéine kinase SGK1 qui inhibe indirectement la dégradation d'ENaC.

Au niveau vasculaire et cardiomyocytaire le RM « activé » conduit à l'augmentation de l'expression d'une large variété de gènes tels que ceux codant pour l'ECA, le collagène I, III et IV ou encore ceux impliqués dans la régulation de la MEC et de l'inflammation¹⁶⁷. L'activation du RM permet d'autre part d'augmenter la formation d'angiotensine II et peut entraîner un cercle vicieux en cas d'activation chronique.

Le RM est faiblement exprimé dans le tissu cardiaque, rénal et vasculaire en conditions physiologiques et en conditions pathologiques sa surexpression est corrélée chez l'homme avec la gravité de l'insuffisance cardiaque¹⁶⁴ et rénale¹⁶⁵. Des travaux effectués dans notre laboratoire ont montrés qu'une surexpression tissu-spécifique du RM, aussi bien au niveau des cardiomyocytes¹⁷¹ que des CMLV¹⁷², entraîne une dysfonction coronaire. D'autres études montrent qu'une délétion tissu-spécifique du RM (cardiomyocytaire en l'occurrence) est bénéfique dans des modèles expérimentaux d'infarctus du myocarde¹⁷³ et de surcharge de pression¹⁷⁴ ce qui renforce l'hypothèse d'une activation délétère du MR en conditions pathologiques.

Chez l'homme on retrouve lors d'une activation trop importante du RM une hypertension, une augmentation de la production d'EROS, une inflammation ainsi qu'un

remodelage de la MEC avec accumulation de collagène¹⁷⁵ aussi bien au niveau rénal que cardiaque et vasculaire.

Différentes approches thérapeutiques ont été mises au point afin d'inhiber le SRAA dans les pathologies cardiovasculaires dont les IEC qui permettent de diminuer la synthèse d'angiotensine II et d'aldostérone. Cependant un phénomène d'échappement au traitement a été observé chez des patients dont la concentration plasmatique en aldostérone restait élevée malgré la prise d'IEC¹⁷⁶. Une autre approche permettant d'inhiber les effets biologiques de l'aldostérone a été développée *via* l'utilisation d'antagonistes du RM.

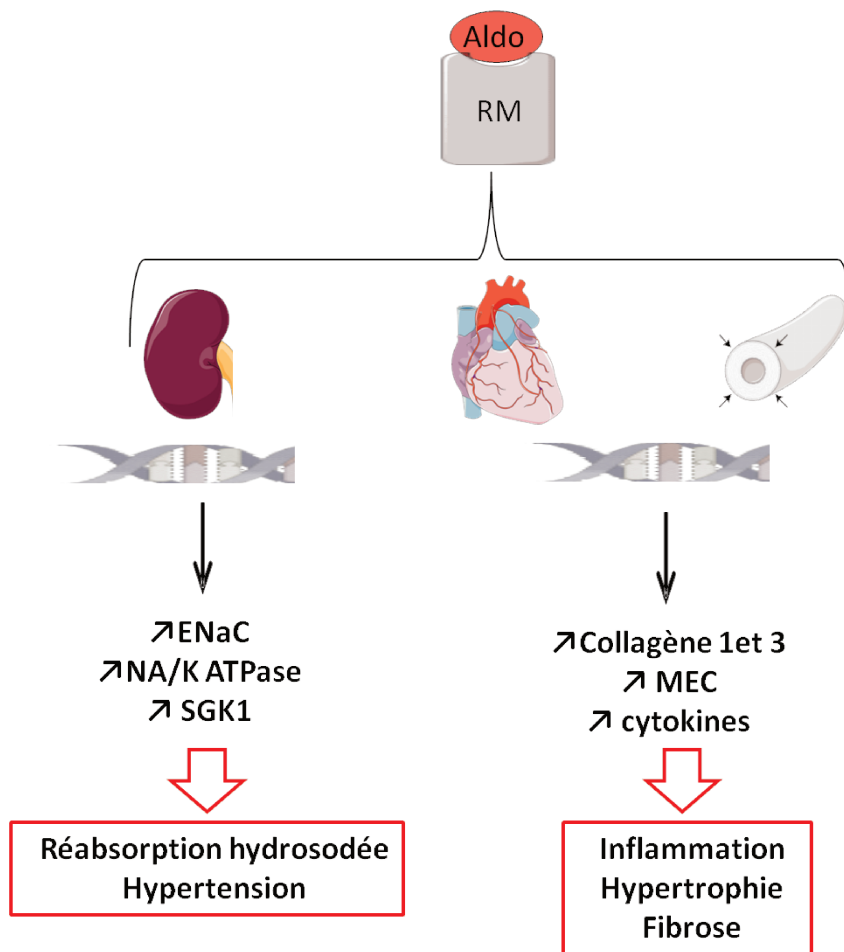


Figure 11 : *Représentation schématique de la signalisation du Récepteur Minéralocorticoïde.*

3. Antagonistes du Récepteur Minéralocorticoïde

Les antagonistes du RM (ARM) font partie des traitements recommandés par les grandes sociétés de cardiologie telles que l'ESC dans l'ICF et après infarctus en complément du traitement standard (IEC et bêtabloquants) chez les patients restant symptomatiques⁸. Les deux premiers ARM utilisés chez l'homme sont la spironolactone et

l'éplérénone qui ont tous deux montrés leur efficacité en termes de survie et de diminution d'hospitalisation dans l'ICF Er lors de deux grands essais cliniques RALES ²⁴ et EPHEsus ²⁵. Les effets bénéfiques de ces ARMs est d'autant plus remarquable que les patients présentaient des IC sévères de classe NYHA III et IV.

Ces effets bénéfiques ont été confirmés pour des patients ICF Er en classe NYHA II avec l'éplérénone lors de l'essai clinique EMPHASIS sur la diminution de la mortalité (totale et cardiovasculaire) et d'hospitalisation¹⁷⁷ et a donc confirmé l'intérêt des ARMs dans le traitement de l'IC.

Concernant l'ICFEp les résultats sont plus contrastés puisque l'essai clinique TOPCAT (Treatment of Preserved Cardiac Function Heart Failure With an Aldosterone Antagonist) n'a pas démontré dans un premier temps d'effet bénéfique de la spironolactone dans l'ICFEp¹⁷⁸. Cependant une nouvelle analyse réalisée sur un sous-groupe de patients dont le diagnostic d'ICFEp était certain et dont la prise de traitement était avérée, a permis de mettre en évidence une diminution de la mortalité et du nombre d'hospitalisation avec la spironolactone¹⁷⁹ chez des patients avec une FEVG >45%. Cependant la FEVG n'étant pas supérieure à 50% on ne peut pas réellement parler d'ICFEp.

Il faut souligner que malgré les effets bénéfiques clairement démontrés des ARM dans l'ICF Er ceux-ci restent actuellement sous-utilisés notamment à cause de risque sévère d'hyperkaliémie et de la contre-indication chez les patients avec une insuffisance rénale grave. D'autres facteurs expliquent cette faible utilisation des ARMs tels que la forte affinité mais la faible sélectivité de la spironolactone pour le RM et la meilleure sélectivité mais la très faible affinité de l'éplérénone envers le RM¹⁸⁰.

Le manque de sélectivité ou d'efficacité ainsi que les hyperkaliémies empêchant les ARMs de montrer leur potentiel thérapeutique, les recherches se sont intensifiées et ont permis d'obtenir des ARM non stéroïdiens et nous nous focaliserons sur la finérénone.

La finérénone :

La finérénone est un antagoniste non stéroïdien du RM qui a la même affinité que la spironolactone envers le RM tout en présentant une sélectivité 500 fois supérieure à celle de l'éplérénone¹⁸¹. De manière intéressante les études précliniques chez le rat ont révélés que la finérénone permettait, à des doses ne baissant pas la pression artérielle (1 mg/kg), de

prévenir les dommages structuraux et fonctionnels du cœur et des reins dans un modèle d'hypertension ainsi que d'améliorer la fonction cardiaque VG dans un modèle d'ICC¹⁸². De plus son affinité pour le RM permet d'utiliser des doses plus faibles qu'avec l'éplérénone puisque une dose de 10 mg/kg diminue plus efficacement la PA que 100 mg/kg d'éplérénone. Cette même étude a montré que la distribution tissulaire de la finérénone était la même au niveau du cœur et des reins contrairement à ce qui était observé avec les deux ARM stéroïdiens qui se lient principalement au RM rénal.

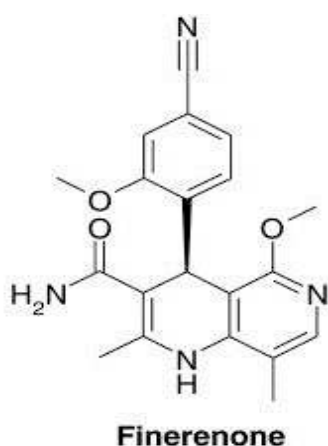


Figure 12 : Structure chimique de la finérénone un antagoniste non stéroïdien du Récepteur Minéralocorticoïde. Issu de Kolkhof et al.¹⁸²

Un essai clinique de phase 2 réalisé afin de tester la tolérance et l'innocuité de la finérénone chez des patients ICFer présentant une maladie rénale chronique modérée (ARTS : minerAlocorticoid Receptor Antagonist Tolerability Study) a montré un moindre risque d'hyperkaliémie et d'aggravation de la dysfonction rénale en comparaison à la spironolactone¹⁸³. Cette étude montre qu'une dose de 10 mg de finérénone est aussi efficace qu'une dose de 50 mg de spironolactone pour diminuer les marqueurs de stress cardiaque (BNP, NT-pro-BNP) et rénal (albumine) et induit moins de dysfonction rénale. Ces résultats encourageants ont conduit à deux nouveaux essais cliniques actuellement en cours sur des patients diabétiques avec néphropathie pour évaluer les effets de la finérénone ajouté au traitement standard, soit dans la progression de la maladie rénale (étude FIGARO-DKD) soit dans la réduction de la morbi/mortalité cardiovasculaire (étude FIDELIO-DKD).

A la vue des résultats prometteurs obtenus avec la finérénone dans l'ICF_{Er} et les néphropathies diabétiques il serait intéressant d'évaluer les effets de la finérénone dans l'ICF_{Ep} seule ou en association avec le syndrome métabolique.

B. Cibler l'endothéline-1

1. Synthèse de l'endothéline

L'endothéline-1, (ET-1) est un peptide vasoconstricteur découvert en 1988 par *Yanagisawa et al* au niveau de cellules endothéliales vasculaires⁹⁵. L'endothéline-1 fait partie d'une famille de 3 peptides produits à partir de 3 gènes différents et est responsable de la majorité des effets biologiques du système endothélinergique chez l'adulte^{184,185}, ainsi dans la suite de l'exposé nous utiliserons l'abréviation ET pour désigner l'ET-1. L'ET est synthétisée sous forme d'un précurseur inactif appelé pré-pro ET, un premier clivage effectué par une protéase conduit à la Big-ET, intermédiaire biologiquement inactif, lui-même clivé par des enzymes de conversion de l'endothéline (ECE) (ou par d'autres enzymes comme la neprilysine) conduisant à la forme active constituée de 21 acides aminés. L'ET n'est pas uniquement synthétisée par les cellules endothéliales mais également par d'autres types cellulaires comme les CMLV et les fibroblastes¹⁸⁶ et exerce ses actions biologiques *via* sa liaison à deux sous types de récepteurs.

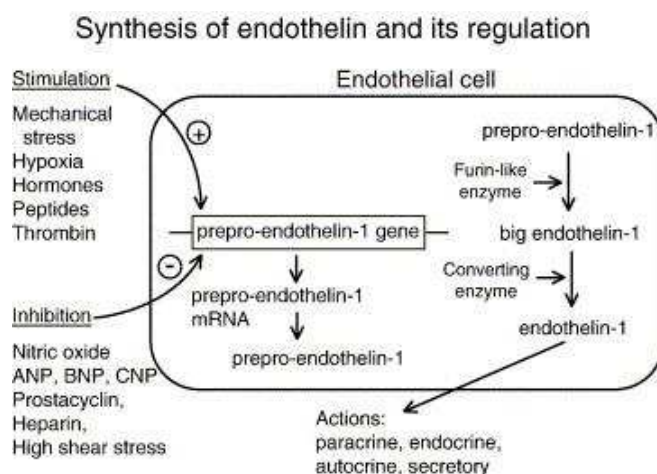


Figure 13 : Représentation schématique des facteurs et étapes permettant la synthèse de l'endothéline-1. Illustration issue de Brunner 2006¹⁸⁷

2. Les récepteurs de l'endothéline

Dès 1989 des expérimentations sur le rat montrent une réponse biphasique de l'ET sur la PA suggérant l'existence de différents types récepteurs responsable de ces effets de

l'ET¹⁸⁸. En effet l'injection intraveineuse d'ET induit premièrement une diminution transitoire de la PA et dans un second temps une augmentation maintenue de la PA. Deux sous-types de récepteurs appelés récepteurs ET_A et ET_B ont été découverts et expliquent les différences de réponse à l'ET de par leur localisation sur des types cellulaires différents et leur couplage à des protéines G différentes. Il faut noter que les deux sous-types de récepteurs de l'ET s'activent à des concentrations subnanomolaires d'ET circulante¹⁸⁹ et que la plus forte densité des récepteurs est retrouvée au niveau du cœur et des poumons¹⁹⁰.

Ainsi le récepteur ET_A, responsable des effets vasoconstricteurs de l'ET, est retrouvé au niveau des CMLV, des cardiomyocytes et des cellules inflammatoires mais pas au niveau de l'endothélium. Ce récepteur est couplé à deux protéines G différentes, la G_s et la G_q ; la voie majoritaire étant celle de la protéine G_q qui active la phospholipase C catalysant la dégradation du PIP₂ en IP₃ et DAG. L'IP₃ va se fixer sur le RS et entraîner une libération de Ca²⁺ provoquant la contraction de la cellule cible (CMLV provoquant la vasoconstriction ou cardiomyocyte favorisant la contraction cardiaque). Le DAG est responsable des effets génomiques de l'ET en activant la PKC qui active la MAPK conduisant à l'activation de facteurs de transcription. L'activation de la PKC participe à la contraction musculaire en favorisant l'ouverture des canaux calciques membranaires.

Le rôle des récepteurs ET_B à quant à lui été difficile à comprendre puisque ses réponses sont diamétralement opposées selon sa localisation cellulaire. En effet il entraîne une vasodilatation lorsqu'il est retrouvé sur les cellules endothéliales alors que les récepteurs ET_B localisés au niveau des CMLV induisent une vasoconstriction. L'équipe de *Tsukahara* montra en 1994 que l'ET se fixant sur les récepteurs ET_B présents sur les cellules endothéliales humaines de veine ombilicale (HUVEC) conduit à la libération de NO et cela de manière dose-dépendante¹⁹¹. Au contraire les récepteurs ET_B situés sur les CMLV sont couplés à des protéines G_q et induisent une vasoconstriction *via* les mêmes mécanismes que le récepteur ET_A.

La synthèse d'inhibiteur spécifique du récepteur ET_B a permis de mieux appréhender ses différents rôles et en particulier dans la clairance de l'ET qui se fait au niveau de la circulation pulmonaire et dépendrait exclusivement du récepteur ET_B^{192,193} situé sur l'endothélium pulmonaire. En effet l'utilisation d'antagoniste du récepteur ET_A n'induit pas d'augmentation de la concentration plasmatique d'ET alors qu'elle augmente en présence d'antagoniste spécifique du récepteur ET_B.

Il semblerait que les expérimentations sur cultures cellulaire et *in vivo* avec injection intraveineuse d'ET aient surestimés l'action vasodilatatrice de l'ET se liant à son récepteur ET_B endothélial. En effet des travaux suggèrent une libération polarisée d'ET vers le pôle basal de la cellule endothéliale activant les récepteurs situés sur les CMLV et très peu les récepteurs situés au pôle apical de la cellule endothéliale à savoir le récepteur ET_B¹⁹⁴.

3. Le système endothelinergique en conditions physiologiques

Le système endothelinergique est très finement régulé au niveau de l'expression génique de l'ET et de celle de ses récepteurs ainsi qu'au niveau de son activité. Ainsi dans les conditions physiologiques, la production et les effets biologiques de l'ET sont inhibés par des facteurs dilatateurs comme le NO, la prostacycline et les peptides natriurétiques ainsi que par l'héparine. Au contraire l'expression génique de l'ET ou son activité vont être stimulées par l'angiotensine II, certaines cytokines pro-inflammatoires, l'hypoxie, un stress oxydant ainsi que par une diminution du « shear stress ».

Dans les conditions physiologiques la synthèse et la libération d'ET se fait en continu, cependant les concentrations plasmatiques d'ET sont faibles de l'ordre de 0,3 à 10 pg/mL chez des sujets sains¹⁹⁵. Selon certains auteurs cette concentration serait insuffisante pour engendrer une vasoconstriction mais il faut rappeler que la concentration plasmatique n'est pas le reflet de la concentration tissulaire de l'ET, notamment au niveau du cœur et des poumons, et cela à la fois de par la libération polarisée d'ET et de par la clairance pulmonaire de l'ET. Ainsi, il est probable que l'ET, libérée en continu au niveau tissulaire, joue un rôle important dans la régulation de la pression artérielle et de la natriurèse et soit inotrope positive au niveau des cardiomyocytes¹⁹⁶.

Lors de la dysfonction endothéliale, une diminution de la biodisponibilité en NO va lever l'inhibition de synthèse de la pré-pro-ET au niveau génique et démasquer les effets délétères du peptide. Ainsi dans de nombreuses pathologies engendrant une dysfonction endothéliale une sur-activation du système endothelinergique est aussi observée comme dans l'ICC, l'HTAP, l'insuffisance rénale et l'athérosclérose. Il faut ajouter qu'une diminution de la clairance de l'ET a lieu en conditions pathologiques du fait d'une diminution de la densité des récepteurs ET_B notamment au niveau de l'endothélium pulmonaire.

4. Le système endothélinergique en conditions pathologiques

Au-delà de la dysfonction endothéliale, l'hypoxie et l'inflammation sont aussi des facteurs augmentant la synthèse d'ET notamment au niveau cardiaque où il a été montré que HIF-1 α (Hypoxia Inducible Factor-1 α) se fixe sur la partie promoteur du gène codant l'ET^{197,198}. Ainsi dans les pathologies associant une dysfonction endothéliale avec de l'hypoxie et une inflammation telle que dans l'ICC, l'augmentation de la concentration plasmatique en ET active les récepteurs ET_A et ET_B au niveau des CMLV. Il en résulte une vasoconstriction prolongée augmentant la PA contribuant ainsi au maintien de la pathologie *via* une augmentation du travail cardiaque. L'action de l'ET sur la PA passe également par la stimulation de la synthèse d'aldostérone engendrant une augmentation de la volémie.

La suractivation du système endothélinergique est aussi associée à des arythmies *via* une activation du SNS¹⁸⁹. De plus, la stimulation des récepteurs ET_A et ET_B situés sur les fibroblastes cardiaques et vasculaires entraîne leur prolifération ainsi que leur activation conduisant alors à une production accrue de collagène. Cela induit une fibrose cardiaque et vasculaire augmentant la rigidité du cœur et des vaisseaux et par conséquent le travail cardiaque. L'ET induit également une hypertrophie des cardiomyocytes en activant les kinases Raf et MAPK *via* la liaison sur son récepteur ET_A¹⁹⁹ et stimule la prolifération des CMLV. Enfin, un cercle vicieux s'installe puisque l'ET provoque un stress oxydant et une inflammation accentuant la dysfonction endothéliale et la sur activation du système endothélinergique.

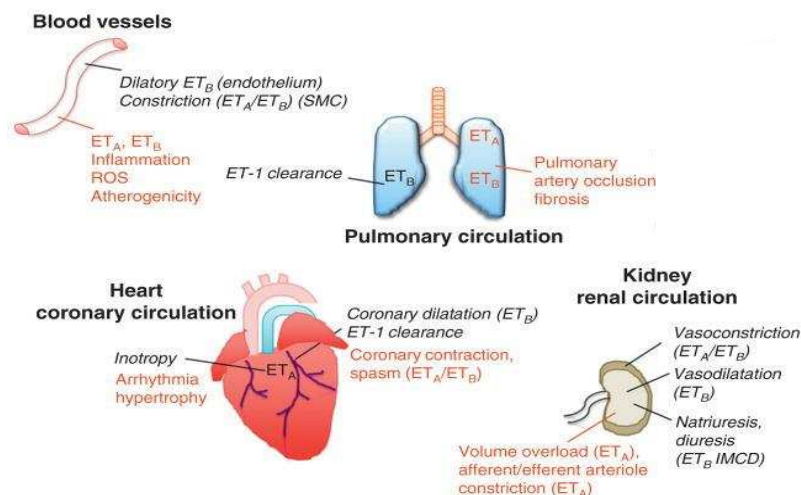


Figure 14 : Illustration des effets de l'endothéline sur le système vasculaire, cardiaque, pulmonaire et rénale en physiologie (noir) et en conditions pathologiques (rouge). Issu de Thorin et Clozel¹⁸⁹

Inhibition du système endothelinergique en conditions pathologiques

Dès la mise en évidence du rôle délétère de l'activation du système endothelinergique dans de nombreuses pathologies telles que l'HTAP, l'ICC et la sclérodermie des recherches pour inhiber pharmacologiquement ce système ont été entreprises. Deux approches différentes ont été explorées : la première visant à empêcher la synthèse de l'ET en inhibant les ECE dont ne nous parlerons pas dans cet exposé et la seconde visant à inhiber les effets biologiques de l'ET en utilisant des antagonistes mixtes ou sélectifs d'un des deux sous-types de récepteur.

Ces recherches ont permis de synthétiser, 3 ans après la découverte de l'ET, le bosentan un antagoniste mixte ET_A - ET_B qui en 2001 a été le premier traitement oral dans l'HTAP permettant d'augmenter le délai avant aggravation des signes cliniques²⁰⁰.

D'autres antagonistes sélectifs du récepteur ET_A (permettant de maintenir les effets « positifs » des récepteurs ET_B endothéliaux) tels que l'ambrisentan et le sitaxentan ont été développés. Cependant le sitaxentan a été retiré du marché pour cause de toxicité hépatique qui reste également un des problèmes majeurs du bosentan et de l'ambrisentan.

Essais cliniques dans l'ICC

Les concentrations plasmatiques d'ET étant élevée chez les patients ICC et corrélant avec la mortalité, des essais chez l'animal et chez l'homme ont été réalisées afin de contrer ses effets délétères. De nombreuses études précliniques réalisées au sein de notre laboratoire et par d'autres équipes sur des modèles d'ICC ont montrés des effets bénéfiques de l'utilisation d'antagoniste des récepteur de l'ET sur l'hémodynamique et la mortalité^{201,202}
203.

Les premiers essais cliniques réalisés avec le bosentan ont montré une amélioration de l'hémodynamique cardiaque mais les essais cliniques de grande envergure se sont révélés décevants. Ainsi deux essais cliniques avec le bosentan n'ont pas montré de différence significative par rapport au placebo. L'étude REACH-I (Randomized Endothelin Antagonism in Chronic Heart Failure) a dû être arrêtée prématurément à cause d'une augmentation excessive des transaminases hépatiques²⁰⁴. Cependant dans un sous-groupe de patients ayant continué le traitement, une amélioration significative du statut clinique à 6 mois a été observée. Ces résultats ont permis à l'étude ENABLE (Endothelin Antagonist Bosentan for Lowering Events in Heart Failure) de voir le jour en dosant plus faiblement le bosentan (125 mg/bid contre 500 mg/bid). Cependant après 9 mois de suivi il n'y avait pas d'amélioration significative du tableau clinique. La survenue d'œdème chez les patients est certainement une cause de cet échec puisque dans un sous-groupe de patients sans œdème le bosentan augmentait la survie sans événement²⁰⁵.

Ces résultats montrent que l'ET reste une cible privilégiée dans l'ICC mais que l'innocuité et l'efficacité des antagonistes des récepteurs de l'ET doit être améliorée afin de montrer leurs bénéfices. Cet objectif semble avoir été obtenu avec le macitentan.

Le macitentan

Le macitentan est un antagoniste mixte des récepteurs de l'ET développé à partir de la structure du bosentan par la société Actelion Biopharmaceuticals. Cette molécule a été sélectionnée parmi un grand nombre de candidats pour ses propriétés physicochimiques augmentant son innocuité²⁰⁶ (notamment au niveau hépatique), sa pénétration tissulaire²⁰⁷ et son affinité pour les récepteurs²⁰⁸. Il a été montré chez le rat que la demi-vie du macitentan était de 2h et qu'un métabolite actif avec une demi-vie de 8h participait aux

effets pharmacologiques du macitentan permettant donc de prendre une unique dose par jour²⁰⁹.

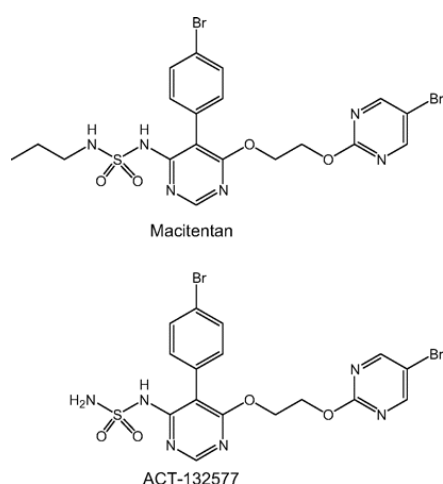


Figure 15 : Structure chimique du macitentan et de son métabolite actif, un antagoniste mixte des récepteurs de l'endothéline-1. Représentation issue d'Iglarz et al.²⁰⁹

Le macitentan a été le premier médicament montrant une réduction de la mortalité dans l'HTAP lors du grand essai clinique SERAPHIN (Study with an Endothelin Receptor Antagonist in Pulmonary arterial Hypertension to Improve cliNical outcome) réalisé sur des patients en classe fonctionnelle II et III⁹⁰.

Le macitentan a été approuvé par la FDA (Food and Drug Administration) en 2013 pour le traitement à long terme de l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) chez les patients en classes fonctionnelles II à III de l'OMS afin de ralentir la progression de la maladie et le risque d'hospitalisation pour HTAP. Cependant en France la HAS (Haute Autorité de Santé) a estimé que le macitentan n'améliorait pas le service médical rendu dans la stratégie thérapeutique de prise en charge de ces patients et la molécule n'est pas commercialisée en France.

Cependant le profil de tolérance et d'efficacité du macitentan étant supérieur aux précédents antagonistes des récepteurs de l'ET, il semble pertinent d'évaluer ses effets dans l'IC et plus particulièrement dans l'ICFep. En effet dans l'ICFep une proportion importante de patients présente une hypertension pulmonaire post-capillaire⁴⁴ qui constitue un facteur aggravant de l'IC ainsi qu'une dysfonction ventriculaire droite. Ainsi le macitentan pourrait

être bénéfique en agissant sur les dysfonctions vasculaires pulmonaires, cardiaques et périphériques ainsi que sur l'hémodynamique ventriculaire gauche et droite.

Un essai clinique a été commencé fin 2017 chez des patients présentant une ICFEp et une maladie vasculaire pulmonaire (SERENADE) afin d'évaluer si le macitentan diminue le taux de NT-Pro-BNP.

C. Cibler la dysfonction mitochondriale

Un nombre croissant de travaux suggère un lien entre la dysfonction mitochondriale et l'IC^{210,211} et plus particulièrement sur la dysfonction diastolique. L'insulinorésistance, qui est retrouvée dans de nombreuses pathologies comme l'ICFEp, l'obésité et le SM est associée à la dysfonction mitochondriale dans différents tissus tels que le cœur, le foie et le tissu musculaire²¹²⁻²¹⁵. Ainsi la dysfonction mitochondriale semble être impliquée dans l'établissement de ces pathologies mais il n'a pas été clairement établi si elle est la cause ou la conséquence de la pathologie. Néanmoins la dysfonction mitochondriale exacerbe la pathologie menant à un cercle vicieux et représente donc une cible intéressante pour traiter ces dysfonctions cardio-vasculaires et métaboliques.

1. Rappels sur la mitochondrie

La mitochondrie est un organe cellulaire essentiel pour la fonction des cellules puisqu'elle fournit jusqu'à 90% de l'énergie²¹⁶ utilisée par ces dernières sous forme d'ATP. Le nombre de mitochondrie varie entre 500 et 2000 en fonction du type cellulaire et dans le cœur les mitochondries remplissent jusqu'à 30% du cytoplasme^{217,218}. La mitochondrie est constituée d'une membrane externe, d'une membrane interne où se déroulent les phosphorylations oxydatives (OXPHOS) et d'une matrice où se déroule la réaction de β -oxydation des acides gras.

La production d'énergie sous forme d'ATP dépend dans un premier temps de la production d'acétyl-coenzyme A (acetylCoA) issu soit de la bêta-oxydation des acides gras soit de la décarboxylation du pyruvate dans la mitochondrie suite à la glycolyse qui a lieu dans le cytoplasme. L'acetylCoA est dégradée par les enzymes du cycle de Krebs conduisant à la formation de produits réduits : le NADH et FADH₂ qui vont permettre, par oxydations phosphorylantes au niveau des complexes enzymatiques de la chaîne respiratoire, d'établir un gradient de protons qui sera utilisé par l'ATP synthase pour produire l'ATP à partir de l'ADP.

La biogenèse des mitochondries est finement régulée par différents éléments tels que le ratio ATP/ADP et l'activation de l'AMPK (Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase) qui par phosphorylation va activer PGC-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ) coactivator) un coactivateur de la transcription jouant un rôle

essentiel dans la régulation du métabolisme énergétique et dans la biogénèse mitochondriale²¹⁹⁻²²¹.

Il est important de souligner que la synthèse des protéines de la chaîne respiratoire est sous la dépendance non seulement de l'ADN nucléaire mais également de l'ADN mitochondrial permettant la synthèse de 13 protéines de ce complexe.

En plus de son rôle essentiel de production d'énergie la mitochondrie est impliquée dans la voie intrinsèque de l'apoptose en réponse à un stress.

2. Dysfonction mitochondriale et pathologies cardio-métaboliques

Le cœur, de par son activité contractile permanente, est très fortement dépendant de la production mitochondriale d'ATP, et par conséquent dépend de la présence d'oxygène et des substrats de la chaîne respiratoire. Il a été démontré dans les cardiomyocytes que 60 à 70% de l'ATP est utilisé pour la contraction, le reste étant utilisé pour le fonctionnement des pompes ioniques²²² soulignant l'importance de la production d'ATP non seulement pour la contraction du myocarde mais également pour sa relaxation. Comme dit précédemment on retrouve dans le SM une dysfonction mitochondriale associée à la dysfonction diastolique ainsi qu'à l'insulinorésistance. Plusieurs mécanismes de la dysfonction mitochondriale expliquent ces retentissements cardiaques et métaboliques comme la diminution du nombre de mitochondries, l'altération de leur morphologie et la diminution de la production d'ATP comme cela a déjà été montré in vivo et sur des biopsies de patients insulinorésistants^{223,224}. Ainsi une diminution de la production d'ATP consécutive à la dysfonction mitochondriale peut altérer la relaxation cardiaque, qui est un processus actif, consommateur d'ATP et dépendant de signalisations calciques. D'autre part une production excessive des EROs lors de la dysfonction mitochondriale mène à l'activation de protéines kinases spécifiques des résidus sérine (dont la PKC). Or la phosphorylation d'IRS1 sur certaines sérine est associée à une diminution des phosphorylations sur les thréonines diminuant ainsi le signal insulinique et par conséquent l'utilisation du glucose par le muscle squelettique en réponse à l'insuline²¹².

Cette production excessive d'EROs peut être le fait de la mitochondrie elle-même où de systèmes extérieurs tels que la NADPH oxydase, la XO ainsi que la NOSe

découplée^{112,217,225,226}. En conditions physiologiques la mitochondrie produit des EROs qui sont soit capturés par des systèmes de défense antioxydants (superoxyde dismutase-manganese (Mn-SOD) soit joue un rôle dans la signalisation cellulaire²²⁷. Cependant en conditions pathologiques un déséquilibre entre le nombre d'électrons apportés à la chaîne respiratoire et ceux utilisés pour produire l'ATP va faire réagir les électrons en surplus avec l'oxygène et former soit des anions superoxyde soit du peroxyde d'hydrogène *via* l'action de la Mn-SOD. Ce phénomène est observé par exemple lors d'un excès d'apport alimentaire et/ou une faible dépense énergétique. Ces EROs peuvent induire des dommages de l'ADN, particulièrement au niveau de l'ADN mitochondrial qui est proche du lieu de formation des EROs et pas protégé par des histones comme l'ADN nucléaire²¹⁰. L'accumulation de mutations dans le génome mitochondrial peut altérer la formation des sous-unités de la chaîne respiratoire^{213,228} et accentuer ainsi la production d'EROs et la dysfonction mitochondriale.

La dysfonction mitochondriale peut être induite par la dysfonction endothéliale comme cela a été montré chez des souris déficientes en NOSe présentant une insulino-résistance, une hypertension et une diminution du nombre de mitochondries²²⁹. La dysfonction endothéliale est retrouvée dans des pathologies avec dysfonction mitochondriale comme le SM et l'ICFep, et impliquerait la voie du NO/GMPc qui activerait PGC-1 α .

PGC-1 α est un coactivateur de facteurs de transcriptions comme NRF-1 (nuclear respiratory factor) favorisant la synthèse des protéines d'origine nucléaire de la chaîne respiratoire et de Tfam (facteur de transcription mitochondrial A)²²². Ainsi une diminution de la biodisponibilité en NO et en GMPc empêcherait la biogenèse mitochondriale et la synthèse des protéines de la chaîne respiratoire participant ainsi à la diminution du nombre de mitochondries et de synthèse d'ATP observées dans les pathologies présentant une dysfonction endothéliale²¹¹. Un cercle vicieux peut s'installer puisque la production excessive d'EROs observée lors de la dysfonction mitochondriale diminue la biodisponibilité du NO et participe à la dysfonction endothéliale.

3. Traitements ciblant la dysfonction mitochondriale

Le bon fonctionnement de la mitochondrie étant essentiel pour maintenir l'homéostasie énergétique et la dysfonction mitochondriale étant au cœur de nombreuses pathologies plusieurs pistes thérapeutiques ciblant les mitochondries ont été développées.

Ainsi les traitements ont pour objectif de restaurer le nombre de mitochondrie en favorisant la biogenèse mitochondriale, de rétablir la production d'ATP et/ou de diminuer la production d'EROs. Parmi ces traitements on peut citer la metformine, antidiabétique de référence en France dont les effets sur la mitochondrie ont été compris plus récemment et impliquent une diminution de la production d'EROs, une augmentation de l'expression de PGC-1 ainsi que la stimulation de l'AMPK²³⁰.

D'une manière plus globale les traitements diminuant le stress oxydatif peuvent limiter la dysfonction mitochondriale notamment en prévenant le « ROS-induced ROS release ». Ainsi l'antioxydant Tempol permet d'améliorer la morphologie et la fonction mitochondriale dans un modèle de rats hypertendus²³¹.

L'iméglimine

L'iméglimine, ((6R) -(+) -4-diméthylamino-2-imino-6méthyl-1,2,5,6-tetrahydro-1,3,5, triazine hydrochloride) est le premier antidiabétique d'une nouvelle classe thérapeutique appelée glimines, développé par la société POXEL.

Cette molécule cible la mitochondrie et agit au niveau des trois composants majeurs du diabète de type 2 à savoir la surproduction hépatique de glucose, la diminution de l'entrée de glucose dans le muscle squelettique ainsi que la diminution de la sécrétion d'insuline par les cellules bêta-pancréatiques²³².

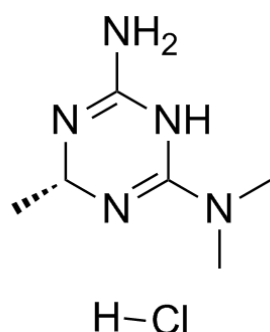


Figure 16 : *Structure chimique de l'iméglimine, premier représentant de la classe pharmacologique des glimines.* Représentation issue de Mesangeau et al.²³³

Une étude sur des modèles animaux diabétiques (le rat Goto-Kakizaki GK et le modèle de diabète induit par injection de streptozotocine) montre que l'iméglumine exerce des effets antidiabétiques *via* l'activation directe de la sécrétion d'insuline par les cellules β sans affecter la sensibilité hépatique à l'insuline²³⁴.

Une autre étude réalisée sur des souris rendues diabétiques par un régime riche en graisse et en fructose montre que l'administration d'iméglumine pendant 6 semaines permet de diminuer la glycémie, de restaurer la tolérance au glucose et d'améliorer la sensibilité à l'insuline²³⁵. De plus cette étude a mis en évidence une diminution de la production d'EROS par les mitochondries hépatiques et suggère une augmentation de l'oxydation des acides gras et donc une production plus efficace d'ATP.

Une autre étude a montré qu'*in vitro* l'iméglumine prévenait la mortalité de cellules endothéliales soumises à un stress oxydant d'origine hyperglycémique²³⁶. Cette étude a confirmé que l'iméglumine agit sur la mitochondrie et diminue la production d'EROS, et a mis en évidence que cette action n'entraîne ni de modification de la respiration mitochondriale ni d'altération dans le statut énergétique de la cellule.

Les effets de l'iméglumine ont été évalués dans plusieurs essais cliniques de phase I puis de phase II chez des patients présentant un diabète de type 2. Les 10 études de phase I réalisées, impliquant un total de 301 sujets sains et des doses d'iméglumine allant de 100 à 8000 mg/jour, ont montré l'innocuité et un bon profil de tolérance de l'iméglumine ainsi que sa demi-vie estimée entre 10 et 12h.

Les essais cliniques de phase II, divisés en 8 études incluant un total de 910 patients et des doses d'iméglumine comprises entre 500 et 2000mg, ont permis d'évaluer l'efficacité de la molécule sur des paramètres glycémiques ainsi que son innocuité et sa tolérance.

Brièvement ces essais cliniques ont démontré que l'iméglumine permet de diminuer significativement le taux d'hémoglobine glyquée (HbA1c) aussi bien en monothérapie²³⁷ que lors d'une utilisation en combinaison avec de la metformine²³⁸ ou de la sitagliptine, un inhibiteur de la dipeptidyl peptidase-4 (DPP4)²³⁹.

Une autre étude, réalisée sur un faible nombre de patients, a démontré qu'après 7 jours de traitement l'iméglumine permettrait d'améliorer la sensibilité des cellules β au glucose et d'augmenter la sécrétion d'insuline en réponse au glucose et tendrait à diminuer l'élimination hépatique de l'insuline²⁴⁰.

Ainsi au-delà de ses rôles sur le métabolisme glucidique, l'iméglimine permettant la diminution de production d'EROs par la mitochondrie et de protéger les cellules endothéliales face à un stress oxydant semble être une molécule intéressante pour le traitement des dysfonctions cardiovasculaires associées au syndrome métabolique.

Objectifs de la thèse

L'ICFEP est une pathologie d'origine multifactorielle pour laquelle il n'existe pas à ce jour de traitement permettant d'augmenter la survie. On retrouve dans l'ICFEP une dysfonction cardiaque diastolique prédominante ainsi qu'une dysfonction vasculaire endothéliale. L'ICFEP est associée à de nombreuses comorbidités comme l'hypertension artérielle, le diabète, le syndrome métabolique, les néphropathies etc.

Les objectifs de cette thèse étaient d'évaluer dans trois études séparées les effets de trois nouveaux médicaments sur la fonction cardiaque et vasculaire dans un contexte d'ICFEP associée au syndrome métabolique. Nous avons choisi le rat obèse Zucker *fa/fa* comme modèle d'ICFEP associée au syndrome métabolique puisqu'il récapitule les dysfonctions cardiovasculaires et métaboliques observées chez l'homme présentant cette double pathologie^{70,136,241}.

Les molécules utilisées ciblaient des systèmes biologiques décrits comme suractivés ou défectueux dans l'ICFEP et le syndrome métabolique. Nous nous sommes intéressés aux effets du blocage du récepteur minéralocorticoïde par un antagoniste non stéroïdien du RM, la finérénone, aux effets du blocage des récepteurs ETA et ET_B par un antagoniste mixte des récepteurs de l'ET, le macitentan ainsi qu'aux effets de la prévention de la dysfonction mitochondriale par l'iméglimine

Le choix du rat Zucker *fa/fa* pour évaluer ses composés nous a semblé d'autant plus pertinent qu'il présente d'autres dysfonctions pouvant participer à l'établissement de l'ICFEP associée au SM et pouvant être ciblées par nos traitements. En effet une dysfonction rénale^{242,243} ainsi qu'une dysfonction mitochondriale^{244,245} ont déjà été montrées chez le rat Zucker *fa/fa*. En addition une étude préliminaire effectuée au sein du laboratoire suggérait également une possible hypertension pulmonaire ainsi qu'une dysfonction VD chez le Zucker *fa/fa*.

Dans ce contexte nos objectifs étaient :

- L'évaluation de l'efficacité de la finérénone pour contrer la dysfonction cardiaque mais aussi rénale dans l'ICFEP.
- L'évaluation de l'efficacité de l'iméglimine pour diminuer le stress mitochondrial et son impact sur la dysfonction cardiaque mais aussi vasculaire dans l'ICFEP.

- La mise en évidence d'une hypertension pulmonaire et d'une dysfonction ventriculaire droite associée à l'ICFep chez le rat Zucker *fa/fa* et l'évaluation de la capacité du macitentan à améliorer la dysfonction cardiaque gauche mais aussi l'hypertension pulmonaire et la dysfonction VD.

Partie expérimentale

I. Modèle animal : le rat zucker *fa/fa* et traitements

L'ensemble des 3 études a été réalisée sur des rats mâles Zucker *fa/fa* âgés de 12 semaines en début de protocole et sur leur contrôles, les rats lean *fa/+*. Chaque étude était divisée en deux parties afin d'évaluer dans l'étude à court-terme (7 à 9 jours) les effets cardio-vasculaires de la molécule indépendamment d'un remodelage et dans l'étude à long-terme (90 jours) les effets additifs des modifications de structure. Les animaux ont reçu une nourriture standard.

Pour chaque étude les rats Zucker *fa/fa* ont été répartis de manière aléatoire en 2 groupes :

- un groupe non traité
- un groupe traité avec
 - de la finérénone mélangée à de la nourriture en poudre à la dose de 2 mg/kg/j
 - du macitentan mélangé à de la nourriture en poudre à la dose de 10 mg/kg/j
 - de l'iméglimine (150mg/kg) par gavage deux fois par jour à 9h et 18h

Le poids des animaux était mesuré chaque semaine afin d'adapter les doses de traitement, les rats *lean* servaient de contrôle sain.

II. Paramètres Etudiés

A. Paramètres cardiaques

1. Echocardiographie

Les échographies cardiaques ont été réalisées dans les études avec l'iméglimine et la finérénone après 7 ou 9, 30 et 90 jours de traitement à l'aide d'un échographe Vivid7 Ultrasound (General Electric Healthcare), équipé d'une sonde linéaire de 14 MHz (M12L) et d'un système d'analyse (Echopac, PC).

L'acquisition des images en mode temps-mouvement a été réalisée en coupe parasternale petit axe au niveau des muscles papillaires du VG. Les dimensions du ventricule gauche ont ainsi été déterminées par la mesure de l'épaisseur des parois antérieure et postérieure du VG en télé-systole et en télé-diastole (EPATS ; EPPTS ; EPATD ; EPPTD) ainsi que les diamètres de la cavité (dTS ; dTD respectivement).

La fraction de raccourcissement (FR, %), indice de contractilité cardiaque, a été calculée selon la formule suivante : $FR (\%) = \frac{(dTD - dTS)}{dTD} * 100$

L'acquisition des images en mode Doppler-pulsé a permis ; en se plaçant au niveau de l'aorte thoracique ; de visualiser le flux sanguin sortant du VG et de mesurer l'intégrale temps vitesse (ITV, cm) ainsi que la fréquence cardiaque (FC, bpm).

Le volume d'éjection systolique ; indice de la capacité du cœur à éjecter le sang vers le système périphérique ; a été calculé selon la formule suivante :

$$VES (ml) = ITV * \pi * \frac{(dAorte * dAorte)}{4}$$

Le débit cardiaque (DC, ml/min) a été estimé en multipliant le VES par la FC.

2. IRM

Détermination des volumes ventriculaires gauche et droit par IRM

Des IRM cardiaques ont été réalisées après 7,30 et 90 jours de traitement dans l'étude sur le macitentan à l'aide d'une IRM Brucker BioSpec 4.7 T/30 (Brucker, Allemagne) afin d'étudier le remodelage cardiaque VG et VD. Les animaux, anesthésiés au methohexital sodique (brietal® ; 60mg/kg, IP, Sigma-Aldrich, France) ont été placés en décubitus dorsal sur une plaque chauffante afin de maintenir leur température corporelle, et reliés à un électrocardiogramme. Un système de monitoring (SA Instruments Inc., NY, USA) relié à des électrodes placées sur les rats, a permis la synchronisation des périodes d'acquisition avec les FC et respiratoire lors de l'acquisition de l'image. En utilisant la séquence « Intragate » (Bruker, France) basée sur des échos de gradient, l'ensemble du VG et VD a été parcouru durant les différentes phases du cycle (16 images par cycle) et 8 tranches contiguës de 1.5 mm d'épaisseur dans le petit axe ont ainsi été « photographiquement découpées ». Les données ont été analysées en utilisant le logiciel FARM-CAAS 2.0 (Pie Medical, Pays-Bas) en sélectionnant les phases correspondantes à la télé-systole (volume ventriculaire minimal) et à la télé-diastole (volume ventriculaire maximal). Les volumes ventriculaires gauches et

droits ont été déterminés à partir des images prises en télé-systole et télé-diastole en faisant le contour de l'endocarde sur chacune des 8 coupes. Le volume total a été calculé comme étant la somme du volume de chaque tranche. La fraction d'éjection (FE, %) a été calculée à partir des volumes en télé-systole (VTD) et télé-diastole (VTS) selon la formule suivante :

$$FE (\%) = \frac{VTD - VTS}{VTD} * 100$$

Le débit cardiaque VG et VD a été calculé selon la formule suivante :

$$DC (ml/min) : (EDV - ESV) * FC$$

Détermination de la perfusion tissulaire ventriculaire gauche par IRM

A la fin de chaque étude à court et long-terme la perfusion myocardique ventriculaire gauche a été évaluée par « Arterial spin labeling » (ASL) permettant de marquer de manière électromagnétique les noyaux d'hydrogène de l'eau présente dans le sang en amont du cœur. Des coupes du cœur sont imagées et les changements d'intensité du signal dans ces images dépendent de l'apport de sang dans le tissu. Le bruit de fond provenant des spins statiques est enlevé par acquisition d'image sans marquage avec les spins et la différence entre les deux images peut être utilisée pour quantifier la perfusion (Waller, Hiller et al. 2001; Kober, Iltis et al. 2005)

3. Pression artérielle systémique chez le rat vigile

Afin de mesurer sur animal vigile et mobile les effets du traitement par le macitentan sur l'hémodynamique systémique 8 animaux non traités et 8 animaux traités ont été utilisés. Un capteur de télémétrie (HD-S10, DSI) a été fixé dans l'aorte abdominale. Pour cela les animaux ont été anesthésiés (xylazine ,kétamine) posés sur une plaque chauffante et intubés, une laparotomie a été effectuée, le mésentère a été déplacé sur le côté, l'aorte abdominale a été délicatement isolée et percée avec une aiguille, la canule du capteur a été placée dans l'aorte abdominale et collée avec de la colle chirurgicale.

Un temps de récupération de 1 semaine a été observé avant de mesurer la pression artérielle systolique (PAS), la pression artérielle diastolique (PAD), et la fréquence cardiaque (FC). Les mesures ont été effectuées sur 24h avant l'initiation du traitement puis après 1, 7 et 90 jours de traitement.

4. Hémodynamique ventriculaire gauche

A la fin de chaque étude (après 7, 9 ou 90 jours de traitement) les animaux ont été anesthésiés avec du thiopental sodique (60 mg kg, IP). L'artère carotide droite a été isolée soigneusement du nerf vague et canulée avec un micro-manomètre électronique (SR-839 type 1.4F, Millar instrument, USA). Les pressions artérielle systolique (PAS ; mmHg) et diastolique (PAD ; mmHg) ainsi que la fréquence cardiaque (FC, bpm) ont été mesurées au niveau de la carotide avant que le capteur ne soit inséré dans le ventricule gauche.

Au niveau ventriculaire gauche le micro-manomètre a mesuré les pressions en fin de diastole et en fin de systole (PTD et PTS, respectivement, mmHg) ; la dérivée minimale et maximale de la pression en fonction du temps ($dP/dt_{\min}$ et $dP/dt_{\max}$ respectivement, mmHg/sec) ainsi que la constante de relaxation tau (ms). Les courbes de relation pression-volume en télé-systole (RPVTS) et en télé-diastole (RPVTD) ont été enregistrées puis analysées à l'aide du logiciel IOX (EMKA, France). Les courbes ont été obtenues sur plusieurs cycles cardiaque après occlusion de l'aorte abdominale afin d'augmenter la post-charge. La pente de ces courbes est un indice de la compliance myocardique en télé-diastole et de l'élastance en télé-systole.

5. Hémodynamique ventriculaire droite

Afin de connaître l'atteinte VD chez les rats Zucker fa/fa et l'effet à long terme du traitement par le macitentan sur la fonction VD et les pressions pulmonaires, l'étude de l'hémodynamique VD a été réalisée sur un sous-groupe d'animaux.

La veine jugulaire interne a été soigneusement isolée et canulée avec un micro-manomètre électronique (SR-839 type 1.4F, Millar instrument, USA). Le cathéter a ensuite été avancé de manière rétrograde afin d'entrer dans le ventricule droit. Au niveau ventriculaire droit le micro-manomètre a mesuré les pressions en télé-diastole et en télé-systole (PTD et PTS, respectivement, mmHg), la dérivée minimale et maximale de la pression en fonction du temps ($dP/dt_{\min}$ et $dP/dt_{\max}$ respectivement, mmHg/sec) ainsi que la constante de relaxation tau (ms).

B. Paramètres vasculaires

1. Myographe de Mulvany

La fonction coronaire a été déterminée en utilisant le myographe de Mulvany (Dual Myograph 410A, DMT, Aarhus, Danemark). Pour cela, directement après sacrifice de l'animal, le cœur a été plongé dans une solution de Krebs froide (4°C) et oxygénée (95% O₂, 5% CO₂) dont la composition (en mM) est la suivante : NaCl 120, KCl 4.96, CaCl₂ 2.61, NaHCO₃ 24, KH₂PO₄ 1.21, MgSO₄ 1.2, glucose 5 (Sigma-Aldrich, France). Un segment (≈1,5 mm) d'artère coronaire septale (diamètre compris entre 190 et 280 μm) a été soigneusement isolé sous loupe binoculaire avant d'être monté sur deux fils de tungstène de 25 μm de diamètre chacun, dans la cuve du myographe contenant 10ml de solution de Krebs froide et oxygénée. Un des deux fils de tungstène a été fixé sur un support relié à une vis micrométrique tandis que le deuxième fil a été fixé sur un transducteur permettant d'étudier les variations de tension isométrique du muscle lisse vasculaire. Par la suite, un processus de normalisation a été effectué après augmentation progressive de la température de la cuve à 35.8°C.

Normalisation des artères

La normalisation de l'artère coronaire avait pour objectif de rétablir le diamètre interne de l'artère pour une pression transmurale de 100 mmHg (ou 13.33 KPa). Pour cela l'artère a été progressivement étirée par augmentation de la force de 0.5mN en 0.5mN en utilisant la vis micrométrique. La tension a été calculée en divisant la force par la longueur de l'artère. Pour chaque niveau de tension l'indice micrométrique était relevé ce qui a permis de mesurer le diamètre interne.

La pression effective a été calculée selon la loi de Laplace :

$$\text{Pression effective} = (\text{tension} \times 2\pi) \div \text{circonférence interne}$$

L'étirement du vaisseau a été interrompu lorsque la pression effective calculée était supérieure à 100mmHg. La relation entre la pression effective et la circonférence interne (CI) de l'artère suivant une courbe exponentielle cela a permis d'obtenir la valeur de la circonférence interne correspondant à une pression de 100 mmHg (CI100). L'artère a ensuite été étirée de façon à obtenir une circonférence interne correspondant à 90 % de CI100. Afin d'optimiser la pression transmurale une force de 1 mN a été ajoutée. La température a

progressivement été augmentée à 37°C et une période de repos de 30 minutes a été observée avant le début de l'étude de la réactivité vasculaire.

Evaluation de la réactivité vasculaire

La réactivité vasculaire des artères coronaires a été évaluée sur des artères pré-contractées à la Sérotonine (10^{-5} M, Sigma-Aldrich, France). Tout d'abord la relaxation dépendante de l'endothélium a été évaluée en réalisant une courbe de concentration-réponse utilisant des concentrations croissantes et additives d'acétylcholine (ACh : 10^{-9} à 3.10^{-5} M, Sigma-Aldrich, France). Un temps de 2 minutes a été observé entre chaque ajout de concentration et la force exercée sur le fil par la contraction de l'artère a été lue sur l'enregistreur. A la fin de la première courbe de relaxation les artères ont été rincées 3 fois avec du Krebs chaud et oxygéné. La part du NO• dans la relaxation endothélium-dépendante a ensuite été évaluée. Pour cela les artères ont été l'incubées pendant 30 minutes avec un inhibiteur non spécifique des NOS, la L-NNA (N ω -nitro-L-arginine, 10^{-4} M, Sigma-Aldrich, France) et une courbe de concentration réponse à l'ACh a de nouveau été réalisée. De nouveau à la fin de cette courbe les artères ont été rincées et un temps de repos de 30min a été observé. Afin de déterminer la relaxation indépendante de l'endothélium une courbe concentration-réponse utilisant des concentrations croissantes et additives d'un donneur de NO•, le Nitroprussiate de Sodium (SNP ; 10^{-9} à 3.10^{-5} M, Sigma-Aldrich, France) a été réalisée.

2. Artériographe d'Halpern

La fonction vasculaire périphérique a été évaluée ; lors de l'étude avec l'iméglimine ; sur des artères mésentériques en utilisant l'artériographe d'Halpern (Perfusion Myograph System DMT).

A la fin du protocole expérimental le mésentère a été ligaturé au niveau proximal, prélevé et immédiatement placé dans une solution de Krebs froide et oxygénée (mêmes conditions que pour l'artère coronaire décrites précédemment).

L'artère mésentérique de troisième ordre (diamètre interne de 370 à 470 μ m) a soigneusement été disséqué sous loupe binoculaire, un segment d'environ 2mm a été canulé et perfusé entre 2 micropipettes de verre de l'artériographie.

L'artère a été maintenue dans un bain de Krebs thermostaté (37°C) et oxygéné avec un mélange 95 % O₂ et 5 % CO₂. Le vaisseau a été placé sous microscope inversé afin de le visualiser sur un écran relié à une caméra CCD et un analyseur d'image permettant ainsi de suivre et mesurer son diamètre interne tout au long de l'expérimentation. Le débit intraluminal a été contrôlé grâce à un débitmètre connecté en aval de l'artère.

Evaluation de la réactivité vasculaire

La réactivité vasculaire des artères mésentères a été évaluée sur des artères pré-constrictées par la phényléphrine (10⁻⁵ M) afin d'obtenir une réduction stable du diamètre basal d'environ 50 %. La dilatation endothélium-dépendante a été évaluée dans un premier temps en réalisant une courbe de concentration-réponse utilisant des concentrations croissantes et additives d'ACh (ACh : 10⁻⁹ à 3.10⁻⁵M, Sigma-Aldrich, France). Après 3 lavages, une période de repos de 30 minutes a été observée. Dans un deuxième temps la dilatation endothélium-dépendante a été évaluée par mesure de la dilatation flux dépendante (DFD). Pour cela le débit intraluminal a progressivement été augmenté de 25µl/min jusqu'à atteindre 200µl/min. Une courbe de dilatation au SNP (même concentrations que pour le myographe) était réalisée à la fin de l'expérience.

C. Paramètres métaboliques

1. Test de tolérance au glucose

Un test de tolérance au glucose a été réalisé lors de l'étude sur l'iméglimine après 9 et 90 jours de traitement. Les animaux ont été mis à jeun durant 16 heures puis ont reçu par gavage du glucose concentré à 2g/kg. La glycémie a été prise avant et 15, 30, 60, 90 et 120 minutes après le gavage à partir de goutte de sang prélevée au niveau de la queue.

2. Test de tolérance à l'insuline

Un test de tolérance à l'insuline a été réalisé dans les études à court et à long terme sur l'iméglimine. Les animaux ont été mis à jeun durant 16 heures puis ont reçu par injection intra-péritonéale d'insuline (Actrapid, 1 u/kg). Le suivi de la glycémie a été effectué à partir d'une goutte de sang prélevée au niveau de la queue avant et 15, 30, 60, 90 et 120 minutes après injection d'insuline.

3. Dosages plasmatiques

A la fin de chaque protocole du sang a été prélevé, centrifugé (10min à 3000 tr/min), du plasma a été récupéré, aliquoté dans des cryotubes et conservé à -80°C. Les concentrations de cholestérol, triglycérides, ont été mesurées avec l'appareil IDEXX Catalyst One.

4. Dosages urinaires

Les animaux ont été placés en cage métabolique afin de récolter les urines de 24h, les volumes ont été mesurés et 2ml d'urine a été aliquoté et congelé à -20°C avant d'être analysé.

5. Composition corporelle par Echo MRI

La mesure de la composition corporelle a été réalisée avec l'échoMRI EMR.185 (EchoMRI, Houston, TX) au sein de l'U1073 (Dr M Coeffier). Cette méthode repose sur la résonance magnétique nucléaire chez l'animal vigile et permet de mesurer la masse grasseuse, la masse maigre ainsi que l'eau libre et l'eau totale chez les animaux.

D. Evaluation expression génique par q RT-PCR

Afin d'extraire l'ARN total au trizol un morceau du VG (et du VD pour la macitentan) est décongelé sur glace puis placé dans un tube à bille avec 1 mL de trizol (invitrogen) pour être homogénéisé à l'aide du Precellys 24.

Les broyats sont incubés 5 min à température ambiante avant ajout de 0.1 mL de chloroforme puis de nouveaux laissés 2 min à température ambiante.

Les surnageants sont récupérés après centrifugation (12000g, 15min, 4°C) et incubés 10 min avec de l'isopropanol (dont le volume est égal à celui du surnageant). Les culots d'ARN sont obtenus après une deuxième centrifugation (12000g, 20min, 4°C) et lavés avec 0.5 mL d'éthanol à 75%. Après une dernière centrifugation (7500g, 5min, 4°C) le surnageant est jeté et le culot d'ARN séché à l'air libre (5 à 10min) avant d'être dissous dans 30 µL d'eau RNAase-free. La concentration et la qualité des ARN sont évaluées à l'aide d'un

spectrophotomètre ND1000 (Nanodrop Technologies Thermo Scientific, USA) en déposant 2 µL d'échantillon.

Après le dosage le volume correspondant à 2 µg d'ARN est prélevé et tous les tubes sont complétés à 16 µL avec de l'eau RNase free. Les échantillons sont traités afin d'éliminer l'ADN avec un mix contenant 2 µL de DNase I (1U/µL) et 2 µL de tampon DNase 10X pendant 15 min à température ambiante. La DNase I est ensuite désactivée par ajout de 2 µL d'EDTA et incubation des tubes à 65°C pendant 10 min. Les ARNs sont finalement redosés grâce au spectrophotomètre et le volume correspondant à 1 µg est prélevé et placé dans un microtube. Dans chaque tube le volume d'ARN est complété avec de l'eau RNase-free à 16,75 µL et un mix de *reverse transcription* (RT) contenant des dNTP, random primers, RNase out et du tampon 5X est ajouté. Les échantillons sont incubés 5 min à 65°C puis 1 µL de transcriptase inverse est ajouté (M-MLV Reverse transcriptase, invitrogen). Une nouvelle incubation d'une heure à 37°C a alors été réalisée avant de dénaturer l'enzyme par chauffage 5 min à 95°C. Les ADN complémentaires ainsi obtenus ont été congelés à -20°C avant d'effectuer les PCR.

Afin de réaliser l'étape d'amplification par réaction de polymérisation les échantillons sont dilués au 1/10^{ème} avec de l'eau extra-pure. Puis 2,5 µL d'ADNc (1/10^{ème}) est mélangé avec 7,5 µL d'un mix contenant 1,5 µL d'eau ultra pure, 5 µL du kit *LightCycler*® 480 SYBR Green I Master (Roche), 0,5 µL d'amorces sens et 0,5 µL d'amorce anti-sens (10 µM) pour chaque gène ciblé.

Les PCR se sont déroulées sur un appareil de RT-PCR (LightCycler 480 Roche) en plusieurs étapes commençant par la dénaturation de l'ADN (95°C, 10 min) suivie de l'étape d'amplification puis par l'élongation.

Le logiciel LightCycler 480 calcule la concentration d'ADNc cible à partir d'une gamme de dilution allant de 1/2 à 1/164 obtenue suite au mélange de quelques µL d'ADNc prélevés dans chaque tube d'échantillon pur. Les résultats ont été normalisés par rapport à des gènes de ménage (tableau 3).

Gene	Séquence sens	Séquence anti-sens
GAPDH	GGCTGCCTTCTCTTGTGACA	ACCAGCTTCCATTCTAGC
Tubuline	GTGTCCACCATCATGTCAGC	GAGGAAGTGTAGTCGAGGGG
EEF2	AATCTGACCCTGTCGTGTCC	GTTGTGCTTGTGTTGGGACT
ANP	AGCCGAGACAGCAAACATCA	TGGACACCGCACTGTATACG
BNP	AGCTCTCAAAGGACCAAGGC	TCCGGTCTATCTTCTGCCCA
SOD2	GACATTGTGCCTCTGGGTTT	GCCCTGCATACTTTGTCCAT
SOD1	GCTTCTGTCGTCTCCTTGCT	CTCGAAGTGAATGACGCCCT
NOX 4	TTGGTGAACGCCCTGAACTT	TACCACCACCATGCAGACAC
Xantine Oxydase	TGCCAGACCATACTGAAAAGG	AAGCCACCCCATAACTGAAAT

Tableau 3 : Séquences des amorces utilisées pour la PCR.

E. Histologie/ Immunohistochimie

1. Histologie cardiaque

A la fin de chaque étude le cœur a été prélevé et immédiatement rincé dans une solution de KCl afin de l'arrêter en diastole. Les oreillettes, le VD et le VG ont été pesés séparément puis le VG a ensuite été congelé dans de l'azote liquide et stocké à -80°C. Des coupes de 7 µm ont été réalisées au cryostat (Microm HM525) à -20°C puis congelées à -80°C.

Après décongélation à température ambiante les coupes ont été plongées dans un bain de liquide de Bouin pendant 30 minutes, puis dans un bain de rouge Sirius, colorant spécifique des collagènes I et III, pendant 30 minutes et rincées dans un bain d'eau, puis dans un bain d'éthanol à 95 % et 3 fois dans un bain d'éthanol à 100%. Les coupes ont été conservées dans du xylène avant d'être montées dans un milieu aqueux (Microscopy aquatex, Merck).

Afin d'évaluer la fibrose les coupes ont été photographiées au grossissement x40 avec un microscope optique (Zeiss ; logiciel : AxioVision) au niveau des bordures de l'attache du VD, du septum et du VG. Les images ont été analysées à l'aide du logiciel Image Pro Plus 6.3 en sélectionnant les pixels colorés en rouge par le rouge Sirius. La densité en collagène a ensuite été évaluée pour chaque animal selon la formule suivante :

$$\text{Densité collagène (\%)} = (\text{nbr pixel rouge}) / (\text{pixel total}) * 100$$

2. Histologie vasculaire

A la fin du protocole à court et à long terme avec l'iméglumine un segment de l'aorte thoracique a été prélevé et immergé dans du liquide Bouin pour coloration ultérieure. Les segments ont ensuite été inclus en paraffine, coupés à l'aide d'un microtome puis colorés au rouge Sirius afin de déterminer dans un premier temps l'aire de la média et dans un deuxième temps sa teneur en collagène. Pour cela des photographies prises au grossissement x1.25 au microscope photonique (Zeiss,) ont été analysées à l'aide du logiciel *Image Pro plus*. Les contours de la paroi interne et externe de la média ont été tracés à la main, le logiciel a calculé le périmètre de l'aorte ainsi que l'aire de la lumière et l'aire de l'adventice. L'aire de la média a été obtenue en faisant la soustraction de ces deux aires. Six photographies au grossissement x63 ont ensuite été prises dans l'aorte et retouchées afin de ne voir que la média et pouvoir ainsi déterminer la surface couverte par le collagène.

3. Histologie rénale

A la fin du protocole à court et à long terme avec l'iméglumine, un rein a été prélevé et immergé dans du liquide de Bouin pour coloration ultérieure. Une coupe frontale a été réalisée sur chaque rein avant qu'ils ne soient inclus en paraffine et coupé au microtome. Une coloration au trichrome de Masson a été effectuée afin de visualiser les fibres de collagène (en vert).

L'analyse rénale a été effectuée au niveau du cortex et a été basée sur l'estimation de l'atteinte glomérulaire, tubulaire et de l'interstitium (dépôt de collagène et infiltrat inflammatoire) en appliquant des scores allant de 0 à 4 pour chaque entité rénale. Vingt photos de glomérules ont été prises au grossissement x10.

F. Biochimie

1. Étude des EROs ventriculaires par Résonance Paramagnétique Electronique

La résonance paramagnétique électronique (RPE) est une technique de spectroscopie permettant en utilisant un spin probe de quantifier la production d'EROs en mesurant le champ magnétique de la sonde oxydée par les EROs présents dans le tissu qui

est stable. La sonde utilisée est le CMH (1-hydroxy-3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine, Noxygen, Allemagne) réagit principalement avec l' O_2^- et le peroxy-nitrite pour former du $CM^\bullet$ (3-methoxycarbonyl-proxyl), de façon proportionnelle à la quantité d'espèces radicalaires présente dans le milieu.

Le dosage des EROs a été effectué pour chaque étude à court et long-terme à partir d'un petit morceau de VG (50 mg environ) obtenu lors du sacrifice des animaux et immédiatement congelé. Après décongélation sur glace le morceau de VG a été homogénéisé par l'utilisation d'un potter électronique dans une solution de Krebs-HEPES (NaCl: 0,1 M, KCl: 5 mM, $CaCl_2$: 2,5 mM, $NaHCO_3$: 1.2 mM, KH_2PO_4 : 1 mM, D(+)-Glucose: 5.6 mM, Na-HEPES: 20 mM, pH 7.4) (Sigma-Aldrich, France). 30 μ L des homogénats ont ensuite été incubés 1 heure à 37°C dans 1 mL de solution de Krebs-Hepes préalablement privée d'oxygène par bullage avec de l'azote. Les échantillons ont été placés dans une seringue de 1 mL et la réaction a été stoppée par congélation rapide dans l'azote liquide puis stockés à -80°C pour une lecture ultérieure.

Les lectures ont été réalisées sur le spectromètre Miniscope MS 400 de bande X (Magnetech, Allemagne) selon les paramètres suivants: champs magnétique Bo-field 3356,98 G, microwave power 1 mW, microwave attenuation 20 dB, modulation frequency 9,74 GHz, modulation amplitude 5 G, scan time 60s. L'échantillon congelé a été placé dans le dewar du spectromètre préalablement et constamment refroidi par de l'azote liquide. Chaque échantillon a été lu deux fois en utilisant le logiciel Analysis (Magnetech, Allemagne) permettant d'estimer l'intensité du spectre à partir de la hauteur du pic de la ligne centrale.

L'intensité du signal RPE a ensuite été normalisée par rapport à la quantité de protéine présente dans chaque échantillon. La méthode de Bradford a été utilisée afin de doser les protéines et la quantité d'EROs a été exprimée en UA/mg de protéines.

Afin de doser les protéines une gamme étalon de BSA (de 2.5 à 60 μ g/ml) en 10 points a été réalisée, 152 μ L de PBS 1X et 8 μ L d'échantillon ont été déposés dans chaque puit. 40 μ L de bleu de Coomassie (BioRad, France) a été ajouté dans chaque puits, les échantillons ont été incubés 10 minutes à température ambiante avant d'être lus à la longueur d'onde de 595 nm en utilisant un lecteur de microplaque (Biotek, USA).

2. Etude des nitrites plasmatiques par chemiluminescence

Cette technique permet d'estimer indirectement la production de NO° puisque ce gaz labile se métabolise principalement en nitrite et en nitrate.

La technique repose sur l'émission de photon des nitrites NO₂ excités lors de leur retour à un état non excité. Les mesures ont été effectuées sur du plasma à l'aide *du NO Analyser modèle 280, SIEVERS*.

3. Étude du stress oxydant mitochondrial

L'étude de la production des EROs par les mitochondries cardiaques interfibrillaires et subsarcolemmales a été réalisée, lors de l'étude sur l'iméglimine, sur des rats Zucker *fa/fa* recevant ou non une unique dose d'iméglimine (150mg/kg, gavage) une heure avant sacrifice.

En parallèle une étude sur la production des EROs mitochondriaux a été réalisée *in vitro* en incubant l'iméglimine dans l'homogénat de mitochondries interfibrillaires ou subsarcolemmales.

La production d'EROs par les deux populations mitochondriales a été mesurée par résonnance paramagnétique électronique comme précédemment décrit.

G. Test de tolérance à l'effort

Le test à l'effort a été réalisé au Service Commun d'Analyse Comportementale (SCAC), sur des animaux choisis au hasard à la fin du protocole avec l'iméglimine. Les animaux ont été accoutumés au tapis de course (Bioseb, Paris France) en courant 2 fois dans la même journée pendant 5 minutes à une vitesse de 10m min⁻¹ (accélération progressive de 2m min⁻¹ toutes les 30 secondes). Le test à l'effort a été réalisé le lendemain avec une vitesse initiale de 2.4m min⁻¹ et une pente de 5°. La vitesse augmentait de 2.4m min⁻¹ toutes les minutes jusqu'à atteindre la vitesse de 14.4 m·min⁻¹. La fatigue de l'animal a été observée du stade où il modifiait sa posture et son allure jusqu'au stade où l'animal ne pouvait plus rester sur le tapis roulant. Lorsque ce degré de fatigue arrivait et que l'animal malgré les chocs électriques (fréquence du courant 3.0 Hz à 1.6mA avec un voltage de 115 mV) ne retournait pas sur le tapis il était enlevé de l'appareil et le temps était noté afin de calculer la distance parcourue.

III. Analyses Statistiques

Les données sont présentées sous la forme de valeurs moyenne $\pm$ ESM et la normalité des valeurs a été évaluée par le test de Shapiro-Wilk.

Une simulation pour chaque paramètre cardiaque obtenu chez les animaux traités afin de démontrer une différence significative ($p < 0.05$) avec une puissance minimale de 80% par rapport aux animaux non traités a été réalisée. Cette simulation était basée sur des données historiques du laboratoire obtenues avec d'autres traitements améliorant la fonction cardiaque chez le rat Zucker *fa/fa*^{246,247}.

Les paramètres cardiaques obtenus par échographie et hémodynamique invasive étaient évalués comme critères d'évaluations principaux.

Dans le but d'évaluer les effets du syndrome métabolique chez les Zucker *fa/fa* non traités les paramètres obtenus ont été comparés avec ceux des rats *lean* par un test de Student bilatéral et non apparié.

Dans le but d'évaluer les effets des traitements à court ou à long terme chez les Zucker *fa/fa* traités les paramètres obtenus ont été comparés avec ceux des rats Zucker *fa/fa* non traités par un test de Student bilatéral et non apparié.

Pour les études sur la fonction vasculaire les différences entre les groupes ont été analysées par une ANOVA à mesures répétées.

Résultats

Les résultats des trois études sont présentés sous forme d'articles soit publié (article sur la finérénone) ou en cours de soumission (études iméglimine et macitentan).

Etude 1

La finérénone, un antagoniste non stéroïdien du récepteur minéralocorticoïde s'oppose aux dysfonctions cardio-rénales associées au syndrome métabolique

Résumé :

Une suractivation du récepteur minéralocorticoïde (RM) a été décrite dans l'ICFep et participe à l'établissement de la pathologie. La ré-analyse de l'étude TOPCAT suggère que la spironolactone, un antagoniste du RM (ARM) pourrait être bénéfique chez ces patients mais cette molécule présente des effets indésirables graves. Nous avons voulu évaluer les effets à court (7j) et long-terme (90j) de la finérénone, un nouvel ARM présentant un meilleur profil de sécurité dans un modèle de dysfonctions cardio-rénales associées au SM chez le rat Zucker *fa/fa*.

Dans cette étude nous avons retrouvé une dysfonction diastolique prédominante chez le rat Zucker âgé de 12 et de 24 semaines objectivée par l'augmentation de pression et de la relation pression-volume en fin de diastole (fig2).

Ces animaux présentent aussi à ces deux âges une diminution de la perfusion myocardique ainsi qu'une protéinurie, cette dernière suggérant une dysfonction rénale et cela d'autant plus qu'à 24 semaines l'expression rénale de nGAL est augmentée (fig3). A l'âge de 12 semaines une augmentation du stress oxydant myocardique est observée ainsi qu'une diminution de la concentration plasmatique en nitrites, suggérant une diminution globale de la biodisponibilité en NO (fig 4).

Ces animaux présentent donc dès l'âge de 12 semaines une dysfonction cardio-rénale associée au syndrome métabolique.

La finérénone, administrée à une dose non-hypertensive permet à court terme d'améliorer la dysfonction diastolique en réduisant le temps de relaxation du myocarde et en augmentant la compliance cardiaque (objectivée par la diminution de la relation pression-volume en fin de diastole) (fig2).

Le traitement pendant 7 jours entraine une diminution de la production d'EROs, une augmentation de la concentration plasmatique en nitrite ainsi qu'une augmentation de la perfusion myocardique.

Le traitement à long-terme est aussi associé à une amélioration de la dysfonction diastolique et à une augmentation de la perfusion myocardique et permet en plus de prévenir l'augmentation de collagène interstitiel myocardique. Au niveau rénal le traitement à long-terme réduit la dysfonction rénale comme le suggère la diminution de la protéinurie ainsi que l'expression rénale de nGAL.

Les effets de la molécule à la dose de 2 mg/Kg/j, sont indépendants, d'une prévention de l'hypertension artérielle observée à l'âge de 24 semaines et de toute amélioration du SM.

Ainsi dans un modèle de dysfonctions cardio-vasculaires associées au SM l'utilisation d'antagoniste non stéroïdien du RM, et plus particulièrement de la finérénone semble être une piste thérapeutique intéressante. Cependant son efficacité et innocuité sur l'homme doivent être vérifiés et font l'objet d'essais cliniques de phase III.

ORIGINAL ARTICLE

Short- and long-term administration of the non-steroidal mineralocorticoid receptor antagonist finerenone opposes metabolic syndrome-related cardio-renal dysfunction

Marianne Lachaux BS¹ | Jonatan Barrera-Chimal PhD² | Lionel Nicol PhD¹ |
 Isabelle Rémy-Jouet PhD¹ | Sylvanie Renet BS¹ | Anais Dumesnil BS¹ | Didier Wecker PhD³ |
 Vincent Richard PhD¹ | Peter Kolkhof PhD⁴ | Frederic Jaisser MD² |
 Antoine Ouvrard-Pascaud PhD¹ | Paul Mulder PhD¹ 

¹Normandie Univ, UNIROUEN, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U1096, FHU- REMOD-VHF, 76000 Rouen, France

²Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U1138, Paris, France

³Bruker Biospin MRI GmbH, Ettlingen, Germany

⁴Bayer AG, Wuppertal, Germany

Correspondence

Prof. Paul Mulder, PhD, INSERM U1096, UFR de Santé, 22 Bd Gambetta, Rouen 76000, France.
 Email: paul.mulder@univ-rouen.fr

Aim: To determine whether non-steroidal mineralocorticoid receptor (MR) antagonists oppose metabolic syndrome-related end-organ, i.e. cardiac, damage.

Materials and methods: In Zucker *fa/fa* rats, a rat model of metabolic syndrome, we assessed the effects of the non-steroidal MR antagonist finerenone (oral 2 mg/kg/day) on left ventricular (LV) function, haemodynamics and remodelling (using echocardiography, magnetic resonance imaging and biochemical methods).

Results: Long-term (90 days) finerenone modified neither systolic blood pressure nor heart rate, but reduced LV end-diastolic pressure and LV end-diastolic pressure-volume relationship, without modifying LV end-systolic pressure and LV end-systolic pressure-volume relationship. Simultaneously, long-term finerenone reduced both LV systolic and diastolic diameters, associated with reductions in LV weight and LV collagen density, while proteinuria and renal nGAL expression were reduced. Short-term (7 days) finerenone improved LV haemodynamics and reduced LV systolic diameter, without modifying LV diastolic diameter. Moreover, short-term finerenone increased myocardial tissue perfusion and reduced myocardial reactive oxygen species, while plasma nitrite levels, an indicator of nitric oxide (NO) bio-availability, were increased.

Conclusions: In rats with metabolic syndrome, the non-steroidal MR antagonist finerenone opposed metabolic syndrome-related diastolic cardiac dysfunction and nephropathy. This involved acute effects, such as improved myocardial perfusion, reduced oxidative stress/increased NO bioavailability, as well as long-term effects, such as modifications in the myocardial structure.

KEYWORDS

animal pharmacology, cardiovascular disease, diabetes complications, drug development, experimental pharmacology, type 2 diabetes

1 | INTRODUCTION

Metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus increase cardiovascular morbidity and mortality.^{1–3} This augmentation of cardiovascular risk is, at least in part, related to the development of cardiovascular remodelling and dysfunction. Indeed, left ventricular (LV) diastolic dysfunction,⁴ as well as impaired endothelium-dependent

vasodilation,^{5–7} are often observed in patients with type 2 diabetes or obesity. Inappropriate mineralocorticoid receptor (MR) extra-renal signalling has been shown to play an important role in the progression of cardiovascular diseases.^{8–10} Indeed, inappropriate MR activation promotes cardiovascular remodelling in experimental models,¹¹ while inversely, clinical trials (RALES, EPHEsus and EMPHASIS-HF) have shown that the addition of MR antagonists to standard of care

markedly reduces overall and cardiovascular mortality in patients with systolic heart failure.^{12–15} Moreover, a retrospective analysis of the recent clinical TOPCAT trial showed that the steroidal MR antagonist spironolactone exerted beneficial effects in a properly diagnosed US population, who had heart failure with preserved ejection fraction.

Finerenone is a novel, potent and selective non-steroidal MR antagonist with a different binding mode in comparison to the two available steroidal MR antagonists spironolactone and eplerenone within the MR, thereby inducing differential recruitment of transcriptional cofactors.^{16,17} Furthermore, finerenone exhibits a more balanced cardio-renal organ distribution in comparison with the steroidal MR antagonists because of their differing physicochemical properties.¹⁸ These differences might ultimately lead to a different pharmacology of steroidal MR antagonists and non-steroidal finerenone;¹⁹ however it is not known whether finerenone opposes metabolic syndrome-related end-organ damage. The aim of the present study, therefore, was to determine whether finerenone opposes the development of metabolic syndrome-related cardiac and renal dysfunction, and to investigate the possible mechanisms involved.

2 | METHODS

The present investigation conformed to the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996).

2.1 | Animals and treatment

This study was performed in 12-week-old male Zucker *fa/fa* (lean) and Zucker fatty *fa/fa* rats (Charles River Laboratory, Lyon, France), the latter having developed only moderate cardiovascular and renal dysfunction. The rats were kept, 3 per cage, in standard laboratory conditions, and drugs were administered as food additive.

Two distinct studies were performed in order to evaluate the effects of long-term (study 1) and short-term (study 2) finerenone treatment. In study 1, Zucker *fa/fa* rats were randomized at the age of 12 weeks into either an untreated group ($n = 12$) or a group treated with finerenone at a dose of 2 mg/kg/day for a 90-day period ($n = 12$), and 9 untreated Zucker *fa/fa* rats were used as healthy controls. In study 2, Zucker *fa/fa* rats were randomized at the age of 12 weeks into either an untreated group ($n = 10$) or a group treated with finerenone at a dose of 2 mg/kg/day for a 7-day period ($n = 10$) and 9 untreated Zucker *fa/fa* rats were used as healthy controls. This experimental design allowed the evaluation of the acute effects of finerenone independently of the potential beneficial effects induced by the improvement of cardiac remodelling after chronic treatment.

2.2 | LV and renal haemodynamic measurements

We assessed LV haemodynamics by determination of LV pressure-volume curves at the end of the long-term and short-term study, as previously described.²⁰ In brief, the rats were anaesthetized (intraperitoneal Brieat 50 mg/kg) and the right carotid artery was cannulated with a micro-manometer-tipped catheter (SPR 838; Millar

Instruments, Houston, Texas) for the recording of arterial blood pressure/heart rate, after which the catheter was advanced into the left ventricle for recording of LV pressures. LV pressure-volume loops were obtained at baseline and during loading by gently occluding the abdominal aorta with a cotton swab. Data were stored and analysed by using Millar conductance data acquisition and analysis software (IOX; EMKA, Bourré, France). Finally, LV end-systolic pressure (LVESP), LV end-diastolic pressure (LVEDP), LV relaxation constant Tau, LV end-systolic pressure-volume relationship (LVESPVR) and LV end-diastolic pressure-volume relationship (LVEDPVR) were measured or calculated.

Renal blood pressure was determined in randomly selected rats ($n = 5$ per group) in the long-term study using the transit-time technique (Transonic Inc., Ithaca, New York) as previously described.²¹

2.3 | Echocardiographic studies

In the long-term treatment (study 1), transthoracic Doppler echocardiographic studies were performed in anaesthetized rats (intraperitoneal Brieat 50 mg/kg) before treatment, and after 7 and 90 days of treatment using an echocardiographic system (HDI 5000; Advanced Technology Laboratories Inc., Bothell, Washington) equipped with an 8 to 5 MHz transducer, as described previously.^{22,23} Briefly, a two-dimensional short-axis view of the left ventricle was obtained at the level of the papillary muscle in order to record M-mode tracings. LV diameters were measured according to the American Society of Echocardiography leading-edge method from at least three consecutive cardiac cycles.²⁴ Measurements were performed by one observer blinded to prior results and treatment groups. LV outflow velocity was measured by pulsed-wave Doppler, and cardiac output was calculated as $CO = aortic\ VTI \times [\pi \times (LV\ outflow\ diameter/2)^2] \times heart\ rate$, where VTI is velocity-time integral.

2.4 | Myocardial perfusion

At the end of the long- and short-term studies, myocardial tissue perfusion was evaluated using magnetic resonance imaging (Biospec 4.7 Tesla; Bruker France, Wissembourg, France) by arterial spin labelling, in which the blood in the arteries upstream from the imaging volume is magnetically “labelled”. As a consequence, image intensity changes will occur depending on the blood supply to the tissue in the imaged slice. On subtraction of an image acquired without spin labelling, the background signal from static spins is removed and the difference image can be used to quantify perfusion. The difference of the inverse of the apparent T1 images then yields a measure of the regional cardiac blood flow according to regional cardiac blood flow $= I (1/T1_{sel} - 1/T1_{nonsel})$, where I is the blood-tissue partition coefficient.^{25,26}

2.5 | LV histomorphology

After assessment of LV haemodynamics, atria and right and left ventricles were weighed separately, and sections of the LV were either immersed in fixative solution or snap-frozen in liquid nitrogen for subsequent assessment of LV collagen or LV tissue biochemical activities. LV collagen density was determined as described previously.²⁷ In

brief, after fixation, sections were dehydrated, embedded in paraffin, and 5- μ m thick histological slices were obtained and stained with Sirius Red for collagen determination by image analysis. Collagen density was expressed as the surface occupied by collagen divided by the surface of the image.

2.6 | LV oxidative stress

Production of LV reactive oxygen species (ROS) was determined in the short-term study by electron paramagnetic resonance spectroscopy, as previously described.²⁸ Snap-frozen biopsies of LV tissues collected in the ventricle were homogenized and incubated at 37 °C for 60 minutes in 50 mmol/L phosphate buffer, containing 25 μ mol/L deferrioxamine, 5 μ mol/L diethyldithiocarbamate and 500 μ mol/L 1-hydroxy-3-methocarbonyl-2,2,5,5-tetramethyl pyrrolidine hydrochloride (CMH; Noxygen, Hamburg, Germany). The oxidation of CMH into the paramagnetic nitroxide hydroxy-3-methocarbonyl-2,2,5,5-tetramethyl pyrrolidine hydrochloride (CM), driven mainly by superoxide and peroxynitrite reactions, was measured by electron paramagnetic resonance exactly 60 minutes after the beginning of incubation. Tissues were introduced into an insulin syringe and frozen in liquid nitrogen. Spectra were recorded at 77 K in a liquid nitrogen cooled dewar using an MS200 spectrometer (Magnetech, Berlin, Germany) with the following acquisition parameters: microwave power: 20 mW; microwave frequency: 9.54 GHz; modulation amplitude: 5 G; modulation frequency: 100 kHz; gain: 2×10^2 ; sweep time 120 s and number of scans 2. Intensity of the spectra was measured from the height of the central line and expressed in arbitrary units per mg of protein.

Plasma nitrite concentrations, an indicator of nitric oxide (NO) bioavailability as nitrite is a stable, non-volatile end-product of NO, were determined using a triiodide/ozone-based chemiluminescence assay.²⁹

2.7 | Plasma metabolic profile

Plasma fasting glucose, triglyceride and total cholesterol were measured using an Idexx Catalyst Dx (Paris, France).

2.8 | Proteinuria measurements

The rats were placed in metabolic cages on day 7 and day 90 for a 24-hour urine collection. Next, the urine protein excretion was analysed using the trichloroacetic acid turbidimetric method.³⁰

2.9 | nGAL mRNA quantification

The total RNA was extracted from kidneys with the TRIZOL reagent (Life Technologies, Carlsbad, California) according to the instructions provided by the manufacturer. cDNA was synthesized with 2 μ g of RNA and an M-MLV Reverse transcriptase kit (Life Technologies). The mRNA levels of nGAL and 18S as an endogenous control were analysed by real-time PCR and fluorescence detection of SYBR green in an iCycler iQ apparatus (Bio-Rad, Hercules, California). The primer sequences for nGAL were F: 5' TCACCCTGTACGGAAGAACC 3', R: 5' GGGAACAGAGAAAACGA 3' and for 18S were F: 5' CGCCGC-TAGAGGTGAAATTC 3', R: 5' TCTTGGCAAATGCTTTCGC 3'.

2.10 | Statistical analysis

All results are given as mean $\pm$ SEM. LV diastolic/systolic diameters and haemodynamic variables were assessed as a primary endpoint, whereas all other variables, that is, the molecular mechanisms, were assessed as secondary endpoints. Based on historical data obtained with finerenone in mice with chronic heart failure on remodelling and haemodynamics,³¹ as well as using our historical data with other drugs in Zucker *fa/fa* rats,^{20,32} we made a simulation for each parameter obtained in untreated rats to demonstrate statistical significance ($P < .05$) with a minimal power of 80%. The minimal expected effect size or difference between untreated and treated rats was fixed at 10% and 30%, with the coefficient of variation to 25% and 15% for echocardiographic and haemodynamic studies, respectively. For all significant differences concerning primary endpoints, a posteriori powers $>80\%$ were also checked.

To evaluate the effect of metabolic syndrome, all results obtained in untreated Zucker *fa/fa* and lean rats were compared using Student's unpaired two-tailed *t* test. To evaluate the effects of long- or short-term finerenone, all results obtained in short- and long-term treated Zucker *fa/fa* rats were compared with time-matched untreated Zucker *fa/fa* rats using Student's unpaired two-tailed *t* test.

Before applying parametric tests as Student's unpaired two-tailed *t* test, the Gaussian distribution of data was assessed by the Shapiro-Wilk normality test and Kolmogorov-Smirnov test, and graphically by the QQplot and normal probability plot.

3 | RESULTS

3.1 | Short-term study

At the end of the short-term study, body weight, fasting glucose, total cholesterol and triglyceride plasma levels were increased in untreated (13-week-old) Zucker *fa/fa* rats when compared with age-matched lean rats. Simultaneously, total peripheral resistance was increased as systolic arterial pressure was slightly increased and cardiac output was not modified, while heart rate was not modified in untreated Zucker *fa/fa* rats when compared with age-matched lean rats (Tables 1 and 2). At this time point, LV systolic diameter was already significantly increased. LV diastolic diameter was not significantly modified, resulting in a reduced LV fractional shortening (Figure 1), while LVESP and LVEDP, Tau and LVEDPVR were already significantly increased, without any modification of LVESPVR (Figure 2). A moderate but statistically significant LV hypertrophy and LV collagen accumulation were observed, at the end of the short-term study, and this was associated with a marked reduction in LV tissue perfusion (Figure 3). Moreover, LV ROS production was increased in untreated Zucker *fa/fa* rats (Figure 4), while plasma nitrite levels decreased.

At the renal level, untreated Zucker *fa/fa* rats showed already a marked increase in proteinuria (Figure 3).

3.1.1 | Short-term effects of finerenone

Administration of finerenone for 7 days did not significantly modify systolic blood pressure, cardiac output, total peripheral resistance or any of the plasma metabolic variables (Tables 1 and 2), but reduced

TABLE 1 Systemic and renal haemodynamics after 7 and 90 days

Group	Period	Lean	Zucker <i>fa/fa</i>	
			Untreated	Finerenone
Body weight, g	D ₇	383 ± 18 (367-398)	490 ± 11* (483-498)	476 ± 13 (485-477)
	D ₉₀	446 ± 10 (425-468)	573 ± 13* (544-605)	512 ± 13† (483-542)
Systolic blood pressure, mm Hg	D ₇	116 ± 3 (113-125)	125 ± 4* (115-134)	120 ± 3 (113-128)
	D ₉₀	117 ± 4 (109-125)	145 ± 8* (128-163)	144 ± 5 (132-156)
Cardiac output, L/min	D ₇	131 ± 6 (118-144)	130 ± 6 (117-143)	125 ± 4 (116-133)
	D ₉₀	116 ± 7 (106-132)	118 ± 6 (106-129)	126 ± 5 (116-125)
Total peripheral resistance, mm Hg/mL/min	D ₇	-	-	-
	D ₉₀	0.81 ± 0.04 (0.72-0.90)	1.00 ± 0.06* (0.87-1.13)	0.97 ± 0.06 (0.79-1.14)
Heart rate, beats/min	D ₇	370 ± 15 (356-387)	365 ± 18 (353-378)	351 ± 16 (340-363)
	D ₉₀	347 ± 13 (320-375)	331 ± 11 (305-356)	345 ± 12 (317-372)
Renal blood flow, mL/min	D ₉₀		3.15 ± 0.23 (2.87-3.43)	3.25 ± 0.59 (3.05-3.45)
Renal resistance, mm Hg/mL/min	D ₉₀		52.9 ± 6.1 (45.1-61.8)	49.2 ± 11.0 (44.4-55.3)

Data are mean ± SEM and 95% CI at each time point.

**P* < .05 vs. Lean.

†*P* < .05 vs. Untreated Zucker.

LV systolic diameter (means for untreated and finerenone-treated Zucker rats 3.30 mm [95% CI 3.11-3.49] and 2.96 mm [95% CI 2.75-3.17], respectively) without modifying diastolic diameter (6.49 mm [95% CI 6.29-6.70] and 6.32 mm [95% CI 6.13-6.52], respectively), resulting in an increased LV fractional shortening (49% [95% CI 46-51] and 53% [95% CI 52-56]; Figure 1). Furthermore, short-term finerenone treatment reduced LVEDPVR (means for untreated and finerenone-treated Zucker rats 3.09 mm Hg/RVU [95% CI 2.94-3.25] and 2.11 mm Hg/RVU [95% CI 2.00-2.22], respectively) and LV relaxation constant Tau (5.48 ms [95% CI 5.57-5.39] and 4.87 ms [95% CI 4.73-5.01], respectively), but only tended to reduce LVEDP (*P* = .08) without modifying LVESP and LVESPVR (Figure 2). Simultaneously, short-term finerenone administration increased LV

tissue perfusion, without modifying LV weight or LV collagen accumulation. Moreover, short-term finerenone slightly reduced proteinuria without reaching statistical significance (*P* = .09; Figure 3), decreased LV ROS production and increased plasma nitrite levels, a marker for NO bio-availability (Figure 4).

3.2 | Long-term study

At the end of the long-term study, body weight, fasting glucose, total cholesterol and triglyceride plasma levels were increased in untreated (24-week-old) Zucker *fa/fa* rats when compared with age-matched lean rats. Simultaneously, total peripheral resistance was increased as systolic arterial pressure was slightly increased, while cardiac output and

TABLE 2 Metabolic profile after 7 and 90 days

Group	Period	Lean	Zucker <i>fa/fa</i>	
			Untreated	Finerenone
Fasting glucose plasma levels, mg/mL	D ₇	4.98 ± 0.17 (4.60-2.35)	5.22 ± 0.25 (4.60-5.84)	5.62 ± 0.67 (4.13-7.11)
	D ₉₀	5.83 ± 0.09 (5.63-6.02)	6.53 ± 0.30 (5.85-7.20)	6.01 ± 0.50 (4.90-7.13)
Triglyceride plasma levels, mmol/mL	D ₇	1.03 ± 0.20 (0.59-1.47)	3.02 ± 0.24* (2.47-3.56)	2.68 ± 0.45 (1.67-3.70)
	D ₉₀	1.44 ± 0.08 (1.27-1.61)	5.32 ± 0.90* (3.29-7.34)	4.20 ± 0.57 (2.92-5.47)
Total cholesterol plasma, mmol/L	D ₇	2.93 ± 0.21 (2.46-3.4)	4.11 ± 0.24* (3.58-4.64)	4.26 ± 0.18 (3.86-4.66)
	D ₉₀	3.39 ± 0.49 (2.29-4.49)	6.14 ± 0.53* (4.96-7.33)	5.15 ± 0.46 (4.12-6.17)

Data are mean ± SEM and 95% CI at each time point.

**P* < .05 vs. Lean.

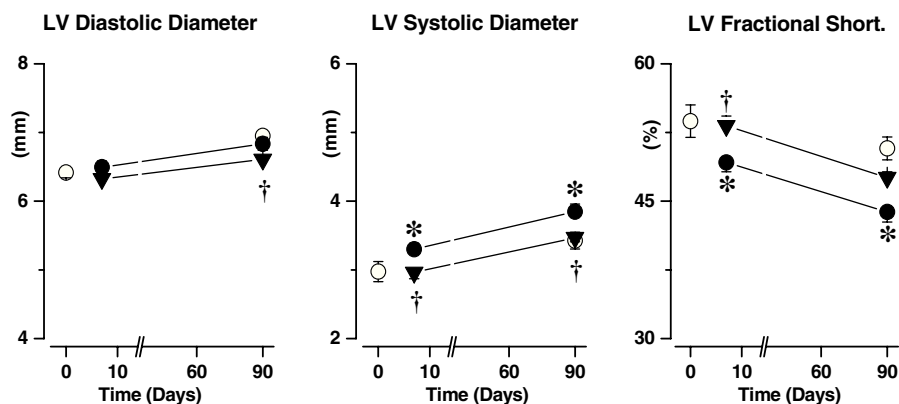


FIGURE 1 Left ventricular (LV) diastolic, LV systolic diameter and LV fractional shortening determined in Zucker *fa/+* rats (open circles; $n = 10$) before and at the end of the 90-day experimental period, and after 7 and 90 days in untreated (filled circles; $n = 15$) and finerenone-treated Zucker *fa/fa* rats (down-triangles; $n = 14$). * $P < .05$ vs untreated Zucker *fa/+*; † $P < .05$ vs untreated Zucker *fa/fa* rats

heart rate were not modified in untreated Zucker *fa/fa* rats when compared with age-matched lean rats (Tables 1 and 2). At this time point, LV systolic diameter was significantly increased, but LV diastolic diameter was not significantly modified, resulting in reduced LV fractional shortening (Figure 1), associated with increases in LVESV and LVEDP, Tau and LVEDPVR, but LVESVPR was not modified (Figure 2). Moreover, LV weight and LV collagen were increased at the end of the long-term study and LV tissue perfusion was reduced (Figure 3). In addition, LV ROS production was increased in untreated Zucker *fa/fa* rats (Figure 4), while plasma nitrite levels decreased at the end of the study.

At the renal level, untreated Zucker *fa/fa* rats showed enhanced proteinuria and renal nGAL expression (Figure 3).

3.2.1 | Long-term effects of finerenone

Administration of finerenone for 90 days did not modify body weight, systolic blood pressure, cardiac output, total peripheral resistance,

heart rate, plasma glucose levels, triglyceride levels or total cholesterol plasma levels (Tables 1 and 2); however, long-term finerenone treatment reduced both LV diastolic (means for untreated and finerenone-treated Zucker rats 6.88 mm [95% CI 6.68–7.09] and 6.61 mm [95% CI 6.50–6.71], respectively) and systolic diameters (means 3.85 mm [95% CI 3.59–4.10] and 3.45 mm [3.33–3.60], respectively) resulting in an increased LV fractional shortening (means 43% [95% CI 41–46] and 47% [95% CI 46–49], respectively; Figure 1), as already observed after 7 days of finerenone administration. This was associated with reduced LVEDP (means for untreated and finerenone-treated Zucker rats 3.99 mm Hg [95% CI 2.98–5.00–3.69] and 3.10 mm Hg [95% CI 2.57–3.36], respectively) and LVEDPVR (3.36 mm Hg/RVU [95% CI 2.63–4.09] and 1.89 mm Hg/RVU [95% CI 1.56–2.23], respectively) and tended to reduce LV relaxation constant Tau (6.51 ms [95% CI 5.75–7.27] and 5.81 ms [95% CI 5.45–6.18], respectively; $P = .08$) without modifying LVESV and LVESVPR (Figure 2). Simultaneously,

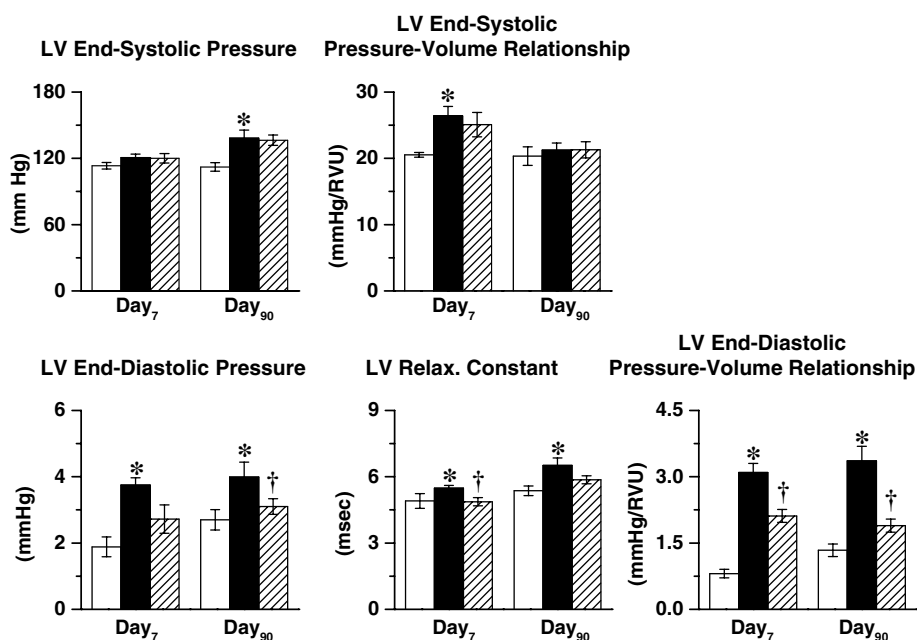


FIGURE 2 Left ventricular (LV) end-systolic pressure, LV end-systolic pressure-volume relationship, LV end-diastolic pressure, LV relaxation constant Tau and LV end-diastolic pressure-volume relationship determined after 7 or 90 days in Zucker *fa/+* rats (white bars; $n = 10$), untreated rats (black bars; $n = 15$) and finerenone-treated Zucker *fa/fa* rats (hatched bars; $n = 14$). * $P < .05$ vs untreated Zucker *fa/+* rats. † $P < .05$ vs untreated Zucker *fa/fa* rats

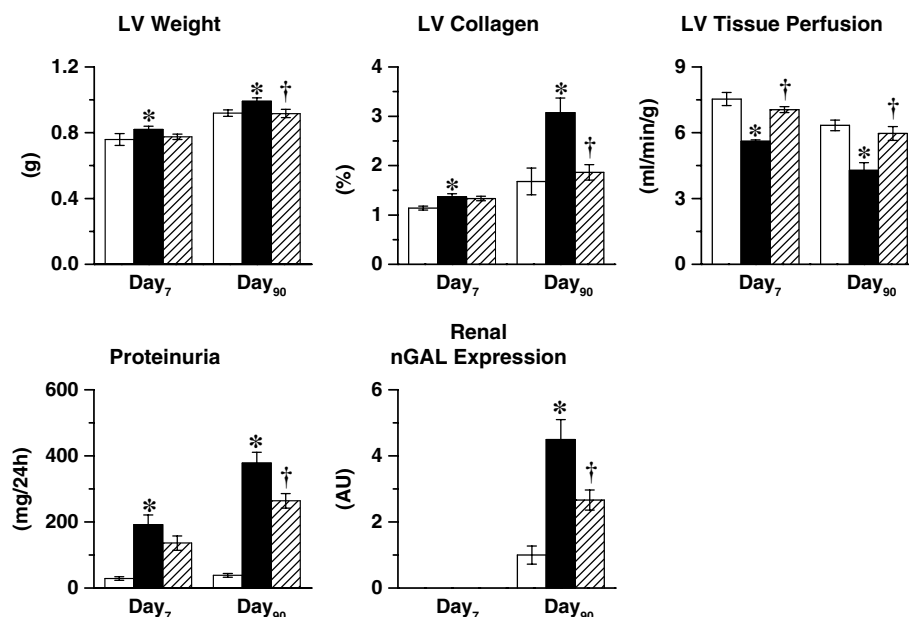


FIGURE 3 Upper panel: Left ventricular (LV) weight, LV collagen density and LV tissue perfusion determined after 7 and 90 days in Zucker *fa/+* rats (white bars; $n = 10$), untreated rats (black bars; $n = 15$) and finerenone-treated Zucker *fa/fa* rats (hatched bars; $n = 14$). Lower panel: Proteinuria determined after 7 and 90 days in Zucker *fa/+* rats (white bars; $n = 10$), untreated rats (black bars; $n = 15$) and finerenone-treated Zucker *fa/fa* rats (hatched bars; $n = 14$) and renal nGAL expression after 90 days. * $P < .05$ vs untreated Zucker *fa/+* rats. † $P < .05$ vs untreated Zucker *fa/fa* rats

long-term finerenone administration reduced both LV hypertrophy and LV collagen accumulation, and increased LV tissue perfusion (Figure 3). These cardiac effects were associated with a reduction of proteinuria and reduced renal nGAL expression (Figure 4) and the absence of any modification in renal blood flow or renal vascular resistance. (Table 1).

4 | DISCUSSION

This study, using a rat model of metabolic syndrome, shows that MR blockade with the third-generation non-steroidal MR antagonist finerenone opposes the development of metabolic syndrome-related diabetic cardiomyopathy. This beneficial effect probably involves several distinct but complementary mechanisms, depending on treatment duration. While after short- and long-term MR blockade, increased myocardial tissue perfusion and reduced oxidative stress might account for the improvement in LV diastolic dysfunction, modification(s) in the LV structure (i.e. reduced LV collagen accumulation) probably contribute to the further improvement of LV compliance after long-term MR blockade.

The effects of the non-steroidal MR antagonist finerenone were studied in an animal model of metabolic syndrome, presenting characteristics similar to those observed in humans with metabolic syndrome, namely, obesity, hypertension, hypercholesterolaemia and increased triglyceride plasma levels. In this model, the development of metabolic syndrome was associated with a progressive decline in LV diastolic function, illustrated by the reduction in LV fractional shortening attributable to the increase in the LV systolic diameter in a context of “preserved” diastolic diameter; however, it should be stressed that, while the absolute values of LV fractional shortening remained within

a “normal” range, LVEDP, LV relaxation constant Tau as well as LVEDPVR were increased, illustrating the development of predominant LV diastolic dysfunction with preserved systolic function. The latter was confirmed by the fact that LVESF and LVESFVR were not modified. Moreover, LV diastolic dysfunction was associated with LV remodelling, as illustrated by the significant increase in interstitial LV collagen density. In addition to LV diastolic dysfunction, the reduction in plasma nitrite levels, a marker of NO bio-availability,³³ suggests an impaired endothelium-dependent vascular dilator response in both 13- and 24-week-old untreated Zucker *fa/fa* rats,^{20,32} illustrating that, as observed in humans with metabolic syndrome,^{6,7} a marked vascular endothelial dysfunction develops in this model of metabolic syndrome. The reduction of NO bio-availability, probably attributable to an increased “NO neutralization” by the enhanced ROS production, involving, at least in part, an imbalance between the eNOS to iNOS

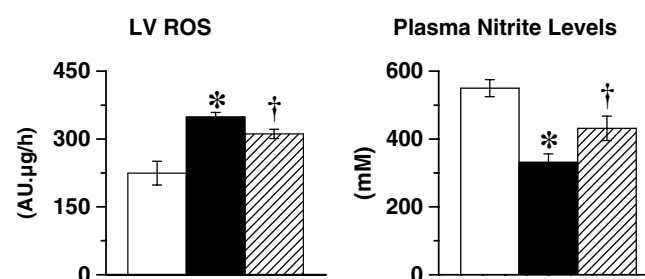


FIGURE 4 Left ventricular (LV) reactive oxygen species and plasma nitrite levels determined after 7 days in Zucker *fa/+* rats (white bars; $n = 10$) untreated rats (black bars; $n = 15$) and finerenone-treated Zucker *fa/fa* rats (hatched bars; $n = 14$). * $P < .05$ vs untreated Zucker *fa/+* rats. † $P < .05$ vs untreated Zucker *fa/fa* rats. Abbreviations: AU, arbitrary units; ROS, reactive oxygen species

ratio, as already recently described by Toblli et al,³⁴ as well as increased levels of the endogenous NOS inhibitor asymmetric dimethyl arginine,³⁵ contributes not only to vascular endothelial dysfunction but also to LV diastolic cardiac dysfunction.^{36,37}

In this context, both short- and long-term administration of the non-steroidal MR antagonist finerenone, at a rather low dose of 2 mg/kg/day (i.e. a dose that does not reduce systemic blood pressure), markedly improved LV diastolic dysfunction, while LV systolic function was not modified. Indeed, after 7 and 90 days of treatment, LVEDP, Tau and LVEDPVR, obtained by invasive cardiac catheterization, were significantly reduced, while LVESPVVR was not modified. While a similar improvement of metabolic-related diastolic dysfunction after long-term MR blockade has already been suggested by the echographic data obtained by Bender et al³⁸ with a non-pressure-lowering dose of spironolactone, the acute improvement of metabolic-related LV diastolic dysfunction has never been reported, illustrating a primary role of MR in metabolic syndrome-related LV diastolic dysfunction.

Several distinct but complementary mechanisms are probably involved in the improvement of LV diastolic function. Indeed, the reduction in LV tissue ROS production, as observed in the present study, will limit the neutralization of NO, resulting in increased NO bio-availability, as suggested by the increase of plasma nitrites. This increase in NO bio-availability probably contributes to the immediate improvement in LV diastolic dysfunction via direct and indirect mechanisms. Indeed, reduced myocardial NO bioavailability increases myocyte resting tension and impairs LV dysfunction,^{37,39–41} while an increase in NO bio-availability/production induced via administration of its co-factor tetrahydrobiopterin,⁴² NO donors⁴³ or endothelial NO synthase enhancers⁴⁴ improves LV diastolic dysfunction. Furthermore, improved NO bio-availability in the coronary vasculature may contribute, via improved coronary endothelial function, to the improvement of LV diastolic dysfunction. Indeed, the increase in myocardial tissue perfusion observed after finerenone treatment reported in the present study suggests improved coronary endothelial function, and the association between increased coronary endothelial NO bio-availability and improved myocardial perfusion has been reported in this model with other drugs such as β -blockers and *If* current inhibitors.^{20,32} The normalization of myocardial perfusion by finerenone probably prevents the LV tissue hypoxia observed in Zucker *fa/fa* rats and subsequent activation of mechanisms inducing LV dysfunction. For example, hypoxia induces ROS production via enhanced enzyme activity of multiple pro-oxidant systems, such as NADPH oxidase^{45–47} and imbalanced eNOS to iNOS ratio.³⁴ The reduction in LV tissue hypoxia will result in an improved LV tissue "redox" status, as a result of reduced ROS production, as observed after both long- and short-term finerenone. Moreover, hypoxia-induced production of local cytokines, such as interleukin (IL)-1, IL-6, TNF α ,⁴⁸ or vasoconstrictors, such as endothelin,⁴⁹ which are all factors implicated in the deterioration of LV function and/or remodelling as well as modifications in intrinsic LV tissue structure, are probably reduced. Finally, enhanced ROS production induces modifications of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase protein structure, and this results in abnormal Ca²⁺ handling and impaired excitation–contraction coupling.^{50,51} Thus, inversely, the improvement of LV oxidative status, as observed with finerenone and

illustrated by the reductions in LV ROS production, is probably associated with a preservation of this Ca²⁺-ATPase activity, as already described in rats with chronic heart failure,⁵² which together with a reduced oxidation of contractile proteins, might explain the reduction in LV systolic diameter observed after short- but also long-term finerenone treatment.

It should also be stressed that the early reduction of myocardial ROS production by finerenone probably also exerts indirect long-term effects improving LV diastolic function because oxidative stress per se induces accumulation of interstitial collagen.^{53,54} Thus, the immediate reduction of ROS production induced by finerenone could explain the reduction in LV interstitial collagen density after long-term treatment, contributing to the improvement of LV diastolic function, because LV interstitial collagen accumulation per se provokes LV diastolic dysfunction. The long-term beneficial effects initiated early after starting finerenone are probably involved in the more marked improvement of diastolic function after long-term MR receptor blockade, as illustrated by the more marked reduction in LVEDP and LVEDPVR in the long-term study.

It must be stressed that both finerenone (the present study) and spironolactone,³⁸ administered at doses that do not reduce systemic blood pressure or total peripheral resistance, exert cardiac protection in this model of metabolic syndrome, but only finerenone affords renal protection in the Zucker *fa/fa* rat model. Indeed, in our long-term study, finerenone significantly reduced proteinuria and renal nGAL expression, while spironolactone did not modify this variable³⁸. Moreover, the reduction of proteinuria and renal nGAL expression, illustrating reduced renal end-organ damage after finerenone, is independent of renal haemodynamics, as this occurs without modification in renal blood flow or renal vascular resistance; however, it should be noted that, in patients with chronic kidney disease, spironolactone improves proteinuria and kidney function after 1 year.⁵⁵

The present data suggest that the beneficial effects on LV diastolic function are independent of any metabolic effect. Indeed, metabolic abnormalities in the diabetic myocardium are associated with the impairment of LV function,^{56,57} but finerenone does not modify plasma glucose, total cholesterol and triglycerides plasma levels in this model. However, spironolactone but not eplerenone improves the metabolic profile (reduced glycated haemoglobin) in humans with metabolic syndrome.^{58,59} It should therefore be noted that although the non-steroidal MR antagonist finerenone clearly exerted beneficial effects in our experimental conditions in the absence of modifications of the metabolic profile, it remains to be determined in human patients with metabolic syndrome whether finerenone's efficacy on clinical endpoints will be more marked than those induced by the steroidal MR antagonists spironolactone/eplerenone, as well as the exact mechanism(s) involved, for example, tissue selectivity and/or differential gene expression mediated by differential nuclear MR co-factor modulation, as well as whether a further improvement in LV function can be obtained when MR blockade is combined with anti-hyperglycaemic medication, such as metformin or sodium-glucose co-transporter-2 inhibitors.

Finally, it should be noted that, although not studied, gender/sex hormones might influence finerenone's cardiac and vascular responses to NO and other endothelial autocooids in Zucker *fa/fa* rats, as observed with other drugs used to reduce cardiovascular risk.⁶⁰

Indeed, with pre-existing metabolic syndrome, female lean Zucker rats are partially protected from the vasculopathy observed in male and ovariectomized female rats,⁶¹ while pre-existing metabolic syndrome per se provokes impairment of the vasodilator responses to NO and/or prostacyclin;⁶² however, whether this will impact finerenone's cardiovascular effects remains to be determined.

In conclusion, in a rat model of metabolic syndrome, administration of the non-steroidal MR antagonist finerenone was associated with an improvement in LV tissue perfusion and LV diastolic function as well as in proteinuria. These results provide a rationale for the concept of MR blockade as a treatment option for prevention of the cardiorenal dysfunction associated with the metabolic syndrome. The efficacy and safety of finerenone in patients with T2DM and the clinical diagnosis of diabetic kidney disease is currently being investigated in two large phase III outcome trials in patients with diabetic kidney disease (FIGARO-DKD, NCT02545049 and FIDELIO-DKD, NCT02540993).

ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by a research grant from Bayer AG Germany and co-supported by the European Union and the Région Normandie (European Regional Development Fund), the European Fibro-Targets Project (grant agreement No. FP7#602904), and the FP7-funded COST ADMIRE network (BM1301). J.B.-C. was a recipient of the FRM grant.

Parts of the results were presented as an oral presentation at the annual scientific meeting of the European Society of Cardiology 2016, Rome, Italy.

Conflict of interest

PK is an employee of Bayer AG.

Author contributions

Conception of the study and manuscript writing: ML, IRJ, VR, PK, FJ, AOP and PM.

Collection and analysis of data: ML, JBC, LN, IRJ, SR, AD, DW, PM.

ORCID

Paul Mulder  <http://orcid.org/0000-0002-5936-5704>

REFERENCES

- Ford ES. The metabolic syndrome and mortality from cardiovascular disease and all-causes: findings from the national health and nutrition examination survey ii mortality study. *Atherosclerosis*. 2004;173:309-314.
- Ford ES, Giles WH, Mokdad AH. Increasing prevalence of the metabolic syndrome among U.S. adults. *Diabetes Care*. 2004;27:2444-2449.
- Isomaa B, Almgren P, Tuomi T, et al. Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care*. 2001;24:683-689.
- Celentano A, Palmieri V, Panico S, et al. Individuals' cardiovascular risk profile projected by family doctors and individuals' knowledge of cardiovascular risk factors: a challenge for primary prevention. The cardiovascular risk prevention project "help your heart stay young". *Ital Heart J*. 2005;6:557-564.
- Knudson JD, Dincer UD, Bratz IN, Sturek M, Dick GM, Tune JD. Mechanisms of coronary dysfunction in obesity and insulin resistance. *Microcirculation*. 2007;14:317-338.
- Kim JA, Montagnani M, Koh KK, Quon MJ. Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: molecular and pathophysiological mechanisms. *Circulation*. 2006;113:1888-1904.
- Sola S, Mir MQ, Cheema FA, et al. Irbesartan and lipoic acid improve endothelial function and reduce markers of inflammation in the metabolic syndrome: results of the irbesartan and lipoic acid in endothelial dysfunction (island) study. *Circulation*. 2005;111:343-348.
- Messaoudi S, Azibani F, Delcayre C, Jaisser F. Aldosterone, mineralocorticoid receptor, and heart failure. *Mol Cell Endocrinol*. 2012;350:266-272.
- Vienchareun S, Le Menuet D, Martinier L, Munier M, Pascual-Le Tallec L, Lombes M. The mineralocorticoid receptor: insights into its molecular and (patho)physiological biology. *Nucl Recept Signal*. 2007;5:e012.
- Bauersachs J, Jaisser F, Toto R. Mineralocorticoid receptor activation and mineralocorticoid receptor antagonist treatment in cardiac and renal diseases. *Hypertension*. 2015;65:257-263.
- Brilla CG. Renin-angiotensin-aldosterone system and myocardial fibrosis. *Cardiovasc Res*. 2000;47:1-3.
- Pitt B, Zannad F, Remme WJ, et al. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized aldactone evaluation study investigators. *N Engl J Med*. 1999;341:709-717.
- Pitt B, Williams G, Remme W, et al. The EPHEsus trial: eplerenone in patients with heart failure due to systolic dysfunction complicating acute myocardial infarction. Eplerenone post-AMI heart failure efficacy and survival study. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2001;15:79-87.
- Pitt B, Remme W, Zannad F, et al. Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2003;348:1309-1321.
- Zannad F, McMurray JJ, Krum H, et al. Eplerenone in patients with systolic heart failure and mild symptoms. *N Engl J Med*. 2011;364(1):11-21.
- Barfacker L, Kuhl A, Hillisch A, et al. Discovery of BAY 94-8862: a nonsteroidal antagonist of the mineralocorticoid receptor for the treatment of cardiorenal diseases. *ChemMedChem*. 2012;7:1385-1403.
- Amazit L, Le Billan F, Kolkhof P, et al. Finerenone Impedes Aldosterone-dependent nuclear import of the mineralocorticoid receptor and prevents genomic recruitment of steroid receptor coactivator-1. *J Biol Chem*. 2015;290:21876-21889.
- Kolkhof P, Delbeck M, Kretschmer A, et al. Finerenone, a novel selective nonsteroidal mineralocorticoid receptor antagonist protects from rat cardiorenal injury. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2014;64:69-78.
- Grune J, Beyhoff N, Smeir E, et al. Selective mineralocorticoid receptor cofactor modulation as molecular basis for finerenone's antifibrotic activity. *Hypertension*. 2018;71:599-608.
- Fang Y, Nicol L, Harouki N, et al. Improvement of left ventricular diastolic function induced by beta-blockade. *J Mol Cell Cardiol*. 2011;51:168-176.
- Turkstra E, Braam B, Koomans HA. Impaired renal blood flow autoregulation in two-kidney, one-clip hypertensive rats is caused by enhanced activity of nitric oxide. *J Am Soc Nephrol*. 2000;11:847-855.
- Litwin SE, Katz SE, Morgan JP, Douglas PS. Serial echocardiographic assessment of left ventricular geometry and function after large myocardial infarction in the rat. *Circulation*. 1994;89:345-354.
- Mulder P, Richard V, Derumeaux G, et al. Role of endogenous endothelin in chronic heart failure: effect of long-term treatment with an endothelin antagonist on survival, hemodynamics, and cardiac remodeling. *Circulation*. 1997;96:1976-1982.
- Sahn DJ, DeMaria A, Kisslo J, Weyman A. Recommendations regarding quantitation in m-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. *Circulation*. 1978;58:1072-1083.
- Waller C, Hiller KH, Voll S, Haase A, Ertl G, Bauer WR. Myocardial perfusion imaging using a non-contrast agent MR imaging technique. *Int J Cardiovasc Imaging*. 2001;17:123-132.
- Kober F, Iltis I, Cozzone PJ, Bernard M. Myocardial blood flow mapping in mice using high-resolution spin labeling magnetic resonance

- imaging: influence of ketamine/xylazine and isoflurane anesthesia. *Magn Reson Med*. 2005;53:601-606.
27. Mulder P, Mellin V, Favre J, et al. Aldosterone synthase inhibition improves cardiovascular function and structure in rats with heart failure: a comparison with spironolactone. *Eur Heart J*. 2008;29:2171-2179.
 28. Mellin V, Isabelle M, Oudot A, et al. Transient reduction in myocardial free oxygen radical levels is involved in the improved cardiac function and structure after long-term allopurinol treatment initiated in established chronic heart failure. *Eur Heart J*. 2005;26:1544-1550.
 29. MacArthur PH, Shiva S, Gladwin MT. Measurement of circulating nitrite and S-nitrosothiols by reductive chemiluminescence. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2007;851:93-105.
 30. Henry RJ, Segalove M, Sobel C. Turbidimetric determination of proteins with sulfosalicylic and trichloroacetic acids. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1956;92:748-751.
 31. Gueret A, Harouki N, Favre J, et al. Vascular smooth muscle mineralocorticoid receptor contributes to coronary and left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *Hypertension*. 2016;67:717-723.
 32. Merabet N, Fang Y, Nicol L, et al. Selective heart rate reduction improves metabolic syndrome-related left ventricular diastolic dysfunction. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2015;66:399-408.
 33. Lauer T, Preik M, Rassaf T, et al. Plasma nitrite rather than nitrate reflects regional endothelial nitric oxide synthase activity but lacks intrinsic vasodilator action. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:12814-12819.
 34. Toblli JE, Cao G, Giani JF, Angerosa M, Dominici FP, Gonzalez-Cadavid NF. Antifibrotic effects of pioglitazone at low doses on the diabetic rat kidney are associated with the improvement of markers of cell turnover, tubular and endothelial integrity, and angiogenesis. *Kidney Blood Press Res*. 2012;34:20-33.
 35. Palomo I, Contreras A, Alarcon LM, et al. Elevated concentration of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in individuals with metabolic syndrome. *Nitric Oxide*. 2011;24:224-228.
 36. Paulus WJ, Shah AM. No and cardiac diastolic function. *Cardiovasc Res*. 1999;43:595-606.
 37. van Heerebeek L, Hamdani N, Handoko ML, et al. Diastolic stiffness of the failing diabetic heart: importance of fibrosis, advanced glycation end products, and myocyte resting tension. *Circulation*. 2008;117:43-51.
 38. Bender SB, DeMarco VG, Padilla J, et al. Mineralocorticoid receptor antagonism treats obesity-associated cardiac diastolic dysfunction. *Hypertension*. 2015;65:1082-1088.
 39. Gillebert TC, De Hert SG, Andries LJ, Jageneau AH, Brutsaert DL. Intracavitary ultrasound impairs left ventricular performance: presumed role of endocardial endothelium. *Am J Physiol*. 1992;263:H857-H865.
 40. van Heerebeek L, Somsen A, Paulus WJ. The failing diabetic heart: focus on diastolic left ventricular dysfunction. *Curr Diab Rep*. 2009;9:79-86.
 41. El-Omar MM, Lord R, Draper NJ, Shah AM. Role of nitric oxide in posthypoxic contractile dysfunction of diabetic cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail*. 2003;5:229-239.
 42. Silberman GA, Fan TH, Liu H, et al. Uncoupled cardiac nitric oxide synthase mediates diastolic dysfunction. *Circulation*. 2010;121:519-528.
 43. Matter CM, Mandinov L, Kaufmann PA, Vassalli G, Jiang Z, Hess OM. Effect of NO donors on LV diastolic function in patients with severe pressure-overload hypertrophy. *Circulation*. 1999;99:2396-2401.
 44. Fraccarollo D, Widder JD, Galuppo P, et al. Improvement in left ventricular remodeling by the endothelial nitric oxide synthase enhancer AVE9488 after experimental myocardial infarction. *Circulation*. 2008;118:818-827.
 45. Serpillon S, Floyd BC, Gupta RS, et al. Superoxide production by NAD(P)H oxidase and mitochondria is increased in genetically obese and hyperglycemic rat heart and aorta before the development of cardiac dysfunction. The role of glucose-6-phosphate dehydrogenase-derived NADPH. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009;297:H153-H162.
 46. Rosen P, Osmer A. Oxidative stress in young Zucker rats with impaired glucose tolerance is diminished by acarbose. *Horm Metab Res*. 2006;38:575-586.
 47. Zhou X, Ma L, Habibi J, et al. Nebivolol improves diastolic dysfunction and myocardial remodeling through reductions in oxidative stress in the Zucker obese rat. *Hypertension*. 2010;55:880-888.
 48. Kapadia SR. Cytokines and heart failure. *Cardiol Rev*. 1999;7:196-206.
 49. Luyt CE, Lepailleur-Enouf D, Gaultier CJ, Valdenaire O, Steg G, Michel JB. Involvement of the endothelin system in experimental critical hind limb ischemia. *Mol Med*. 2000;6:947-956.
 50. Jain M, Brenner DA, Cui L, et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase modulates cytosolic redox status and contractile phenotype in adult cardiomyocytes. *Circ Res*. 2003;93:e9-e16.
 51. Kuster GM, Lancel S, Zhang J, et al. Redox-mediated reciprocal regulation of SERCA and Na⁺-Ca²⁺ exchanger contributes to sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ depletion in cardiac myocytes. *Free Radic Biol Med*. 2010;48:1182-1187.
 52. Maczewski M, Mackiewicz U. Effect of metoprolol and ivabradine on left ventricular remodelling and Ca²⁺ handling in the post-infarction rat heart. *Cardiovasc Res*. 2008;79:42-51.
 53. Siwik DA, Pagano PJ, Colucci WS. Oxidative stress regulates collagen synthesis and matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001;280:C53-C60.
 54. Zhao W, Zhao T, Chen Y, Ahokas RA, Sun Y. Oxidative stress mediates cardiac fibrosis by enhancing transforming growth factor-beta1 in hypertensive rats. *Mol Cell Biochem*. 2008;317:43-50.
 55. Bianchi S, Bigazzi R, Campese VM. Long-term effects of spironolactone on proteinuria and kidney function in patients with chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2006;70:2116-2123.
 56. Lopaschuk GD, Folmes CD, Stanley WC. Cardiac energy metabolism in obesity. *Circ Res*. 2007;101:335-347.
 57. Chess DJ, Lei B, Hoit BD, Azimzadeh AM, Stanley WC. Deleterious effects of sugar and protective effects of starch on cardiac remodeling, contractile dysfunction, and mortality in response to pressure overload. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;293:H1853-H1860.
 58. Yamaji M, Tsutamoto T, Kawahara C, et al. Effect of eplerenone versus spironolactone on cortisol and hemoglobin A(1c) levels in patients with chronic heart failure. *Am Heart J*. 2010;160:915-921.
 59. Zannad F, Gattis Stough W, Rossignol P, et al. Mineralocorticoid receptor antagonists for heart failure with reduced ejection fraction: integrating evidence into clinical practice. *Eur Heart J*. 2012;33:2782-2795.
 60. Frisbee SJ, Singh SS, Jackson DN, et al. Beneficial pleiotropic antidepressive effects of cardiovascular disease risk factor interventions in the metabolic syndrome. *J Am Heart Assoc*. 2018;7(7):e008185.
 61. Brooks SD, Hileman SM, Chantler PD, et al. Protection from vascular dysfunction in female rats with chronic stress and depressive symptoms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2018;314:H1070-H1084.
 62. Brooks SD, Hileman SM, Chantler PD, et al. Protection from chronic stress- and depressive symptom-induced vascular endothelial dysfunction in female rats is abolished by preexisting metabolic disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2018;314:H1085-H1097.

How to cite this article: Lachaux M, Barrera-Chimal J, Nicol L, et al. Short- and long-term administration of the non-steroidal mineralocorticoid receptor antagonist finerenone opposes metabolic syndrome-related cardio-renal dysfunction. *Diabetes Obes Metab*. 2018;20:2399-2407. <https://doi.org/10.1111/dom.13393>

Etude 2

L'administration d'iméglimine à court et à long-terme s'oppose aux dysfonctions cardio-rénales associées au syndrome métabolique

Résumé

La dysfonction mitochondriale est associée à une augmentation du stress oxydant et participe à l'insulinorésistance ainsi qu'à la dysfonction diastolique qui sont retrouvées dans le syndrome métabolique. L'iméglimine, un nouvel agent antidiabétique, cible la bioénergétique mitochondriale permettant une diminution du stress oxydant en conditions d'hyperglycémie.

Nous avons voulu évaluer si l'iméglimine pouvait exercer un effet bénéfique sur les dysfonctions cardiovasculaires et rénales dans un contexte de syndrome métabolique en utilisant le rat Zucker *fa/fa*.

Nos résultats montrent, comme dans l'article précédent, une dysfonction diastolique prédominante chez le rat Zucker *fa/fa* âgé de 12 et de 24 semaines. Nous avons aussi retrouvé, comme cela a déjà été mis en évidence, une dysfonction endothéliale périphérique (artère mésentérique) et centrale (artère coronaire) ainsi qu'une augmentation de production ventriculaire d'EROs et une diminution de la concentration plasmatique en nitrite. La structure rénale évaluée à l'âge de 24 semaines sur coupe histologique est altérée et on retrouve à cet âge une albuminurie.

L'administration d'iméglimine à court-terme (9 jours) améliore la compliance cardiaque et restaure la fonction endothéliale coronarienne et mésentérique ainsi que la perfusion myocardique.

En parallèle de ces améliorations fonctionnelles on retrouve une diminution de la production ventriculaire d'EROs et une augmentation de la concentration plasmatique en nitrite.

Nous obtenons le même profil de résultats après l'étude à long-terme sur les dysfonctions diastolique et endothéliale ainsi que sur le statut oxydatif. L'administration à long-terme de l'iméglimine a permis de prévenir l'augmentation de la fibrose interstitielle cardiaque mais aussi rénale observée chez les animaux non traités. Une diminution de l'albuminurie a été retrouvée chez les animaux traités.

Afin de s'affranchir d'éventuels effets d'une diminution chronique de l'hyperglycémie sur les améliorations cardio-vasculaires nous avons évalués la fonction diastolique et endothéliale ainsi que la perfusion myocardique une heure après administration unique d'iméglimine chez des animaux âgés de 12 semaines.

Cette administration unique d'iméglimine a été associée à une amélioration de la dysfonction diastolique et endothéliale ainsi qu'à une augmentation de la perfusion coronaire. La production totale d'EROs au niveau du ventricule gauche tendait à diminuer et celle des mitochondries subsarcolemmales était significativement diminuée. En parallèle la concentration plasmatique en nitrite était augmentée.

Ces résultats étaient indépendants d'une modification de la glycémie ainsi que de la pression artérielle.

En conclusion dans un modèle de dysfonctions cardiovasculaires et rénales associées au SM, l'iméglimine, un antidiabétique ciblant la bioénergétique mitochondriale, permet de limiter ces dysfonctions probablement en partie via une diminution du stress oxydant.

Short- and long-term administration of imeglimin opposes metabolic syndrome-related cardio-renal dysfunction.

**Marianne Lachaux¹ BS, Mouad Hamzaoui¹ Matthieu Soulié¹ BS, BS, Anaëlle Bailly¹,
Lionel Nicol¹ PhD, Isabelle Rémy-Jouet¹ PhD, Sylvanie Renet¹, Cathy Vendeville², Annie
Lejeune¹, Pascale Gluais-Dagorn³ PhD, Sophie Bozec³ PhD, Christelle Monteil² PhD,
Vincent Richard¹ PhD, Paul Mulder¹ PhD.**

¹Normandie Univ, UNIROUEN, Inserm U1096, FHU- REMOD-VHF, 76000 Rouen,
France

²Normandie Univ, UNIROUEN, UNICAEN, ABTE, 14000 Caen et 76000 Rouen, France

³Poxel, Lyon France

Short title: Imeglimin opposes metabolic syndrome-related cardio-renal dysfunction.

Address for correspondence:

Professor Paul Mulder
INSERM U1096, UFR de Santé,
22 Bd Gambetta, Rouen 76000, France
Telephone: +33 (0)2 35 14 83 59
Fax : +33 (0)2 35 14 83 65
e-mail: paul.mulder@univ-rouen.fr

Abstract.

Introduction. Ipeglimin, a glucose lowering agent targeting mitochondrial bio-energetics, decreases reactive oxygen species (ROS) overproduction and improves glucose homeostasis. We investigated whether this is associated with protective effects on metabolic syndrome-related left ventricular (LV) and vascular dysfunctions.

Methods. We assessed, using Zucker fa/fa rats, the effects on LV function, LV tissue perfusion and LV oxidative stress as well as on vascular function induced by imeglimin administered for 9 (short-term) or 90 days (long-term) at a dose of 150 mg/kg BID PO restoring OGTT and reducing glucose plasma levels.

Results. Compared to untreated animals, short- and long-term imeglimin decreased LV end-diastolic pressure and LV end-diastolic pressure volume-relation, increased LV tissue perfusion, decreased LV tissue ROS production, associated with restored acetylcholine-mediated coronary relaxation and mesenteric flow-mediated dilation. Moreover, 1 hour after a single imeglimin administration, a time-point when glucose plasma levels were not yet modified, imeglimin reduced LV mitochondrial ROS production and improved LV function. Only long-term imeglimin reduced metabolic-syndrome related LV collagen accumulation.

Conclusion. In a rat model mimicking human metabolic syndrome, imeglimin opposes metabolic syndrome-related cardiac diastolic and vascular dysfunctions. This involves acute effects, i.e. improved myocardial perfusion, reduced oxidative stress/increased NO-bioavailability, but also long-term effects, i.e. myocardial structural modifications.

Introduction

Metabolic syndrome refers to metabolic impairments such as insulin resistance, hyperglycemia and dyslipidemia associated with obesity and hypertension and increases cardiovascular morbidity and mortality.¹ The augmentation of cardiovascular risk observed in metabolic syndrome is related to development of a progressive deterioration of left ventricular (LV) diastolic function and vascular endothelial function.²⁻⁴ Interestingly, several studies demonstrated the implication of mitochondrial dysfunction in metabolic syndrome-related cardiac diastolic⁵ as well as vascular endothelial dysfunctions.^{6, 7}

Ipeglimin, a novel glucose lowering agent targeting mitochondrial bio-energetics, improves hyperinsulinemia, glucose tolerance and insulin sensitivity in experimental models of diabetes as well as in diabetic patients.⁸⁻¹² It has also been demonstrated that imeglimin decreases reactive oxygen species overproduction and delays mitochondrial permeability transition pore opening in endothelial cells, preventing cell death during oxidative stress due to hyperglycemia.¹³ However whether these beneficial effects are associated with a prevention of metabolic syndrome-related cardiovascular dysfunction is unknown.

Thus, the goal of the present study was to assess, using a rat model mimicking Human metabolic syndrome-related cardiovascular dysfunctions¹⁴⁻¹⁶, the immediate, i.e. 1 hour after imeglimin administration, as well as the effects of a short-term (9 days) and long-term (90 days) treatment with imeglimin on systemic and cardiac hemodynamics, cardiovascular function and morphological alterations.

Methods and materials.

The investigation conforms to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996) and was approved by the local ethical comity (CENOMEXA n°54; case number 05 231.01)

Animals and Treatment.

This study was performed in 12-week-old male Zucker fa/+ (lean) and Zucker fatty fa/fa rats (Charles River Laboratory, France), the latter having developed at this age only moderate cardiovascular and renal dysfunctions. Animals were kept 2 per cage in standard laboratory conditions. Metabolic-related cardiovascular dysfunctions and cardiac structure were assessed

after a 90-day treatment period (study 1). However, ‘long-term’ structural effects might mask ‘short-term’ effects, and in order to avoid this experimental bias, effects of imeglimin on metabolic-related cardiovascular dysfunctions and cardiac structure were also assessed after a 9-day treatment period, i.e. before any significant difference in cardiac remodeling/structure (study 2).

Study 1: Zucker fa/fa rats were randomized at the age of 12 weeks in two groups, either untreated (n=15) or treated with imeglimin (n=15) at the dose of $150 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{day}^{-1}$ BID (by gavage at 09:00 and 18:00) for a 90-day period. Twelve untreated Zucker fa/+ animals were used as healthy controls. Study 2: Zucker fa/fa rats were randomized at the age of 12 weeks in two groups, either untreated (n=15) or treated with imeglimin (n=15) at same dose for a 9-day period. Nine untreated Zucker fa/+ animals were used as healthy control.

Since glycemic control is involved in effects induced by short- and long-term imeglimin treatment, a third study evaluated the cardiovascular effects of imeglimin as soon as 1 hour after a single imeglimin administration at the dose of 150 mg.kg^{-1} in 13-week old Zucker fa/fa rats, allowing evaluation of imeglimin effects independently of glycemic control.

Investigated parameters

All parameters investigated after single or multiple imeglimin dose(s) were measured 1h after the last (or single) morning dose.

LV function

Echocardiography. Studies were performed in rats before and after 9, 30 and 90 days of treatment. For this purpose, rats were anesthetized with methohexital, the chest shaved and echocardiograms were performed with a Vivid 7 ultrasound echograph equipped with a M12L linear probe operating at 14 MHz and fitted out with Echopac PC software (GE medical) as described previously.^{17, 18} In brief, a two-dimensional short axis view of the LV was obtained at the level of the papillary muscle in order to record M-mode tracings. Left ventricular diameters were measured by the American Society of Echocardiology leading-edge method from at least 3 consecutive cardiac cycles.¹⁹ Measurements were performed by one observer blinded to prior results and treatment groups. Moreover, LV outflow velocity was measured by pulsed-wave Doppler, and cardiac output was calculated as $\text{CO} = \text{aortic VTI} \times [\pi \times (\text{LV outflow diameter}/2)^2] \times \text{heart rate}$, where VTI is velocity-time integral.

LV hemodynamics.

LV hemodynamics were assessed 1 hour after a single imeglimin administration as well as after a 9- and a 90-day imeglimin treatment using left pressure volume curves, as previously described.^{17, 20} In brief, in methohexital-anesthetized animals, a 2F miniaturized combined conductance catheter-micromanometer (model SPR-819, Millar Instruments) connected to a pressure-conductance unit (MPCU-200, Millar) was advanced retrograde via the carotid artery into the LV. This catheter has a micro-manometer surrounded by 4 platinum electrodes; the two outermost electrodes generate a current of 0.1 mA at a frequency of 20 kHz, which is sensed by the two innermost electrodes. PV loops were recorded at baseline and during loading by gently occluding the abdominal aorta with a cotton swab. Data were stored and analyzed by using Millar conductance data acquisition/analysis software and the following parameters were measured/calculated from the pressure-volume curves: LV end-systolic and end-diastolic pressures, LV end-systolic pressure-volume and end-diastolic pressure-volume relations, and LV relaxation constant Tau.

Myocardial perfusion.

One hour after a single imeglimin administration as well as after a 9- and a 90-day imeglimin treatment, basal myocardial perfusion was assessed in methohexital -anesthetized animals using a Bruker Biospec 4.7 Tesla MRI, and an acquisition T1 sequence that does not need contrast agent application, as previously described.^{21, 22}

Exercise tolerance test. Exercise capacity was determined in randomly selected animals of each group after the last imeglimin administration in the 90-day protocol (study 1). In brief, the animals were accustomed with the motorized treadmill (Bioseb, Paris France) at a speed of $2.4 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$ at a 5° incline. The speed was increased by $2.4 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$ every 1 min to a maximum speed of $14.4 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$. A mild electrical shock (frequency current at 3.0 Hz at 1.6 mA with a voltage of a 115 mV) was provided when the animals could not maintain the set pace. Fatigue was considered to occur when a rat started to lower its hindquarters and raise its snout, resulting in a significantly altered gait, to the point of not being able to remain on the treadmill. When this degree of fatigue was noted, and the animal had difficulty remaining on the treadmill belt (regardless of the delivery of the electrical shock), the animal was taken off the treadmill, and the run time was recorded to the nearest second.

Glucose and insulin tolerance test. At the end of the 9- and 90-days treatment period, rats were fasted 16h before testing. A blood sample was collected from the tail vein and blood glucose was measured with a glucometer (StatStrip Xpress, Nova Biomedical UK, Hercules, Calif) before glucose tolerance test. Glucose tolerance test was performed by oral gavage of 2 g D-glucose/kg body weight and blood samples were collected from the tail vein and glucose levels were measured for 2 h. Insulin tolerance was assessed by blood glucose measurements before and after IP injection of human insulin Actrapid (1 U/kg)

Vascular endothelial function. Coronary endothelial function was assessed as described previously.¹⁶ In brief, at the end of the left ventricular function assessment; the heart was removed and immediately placed in cold oxygenated Krebs buffer. A 1.5- to 2-mm-long segment of arteries was carefully dissected and mounted in a small vessel myograph. Normalization procedure was performed after an equilibration period. Segments with an internal diameter $<170 \text{ }\mu\text{m}$ were excluded to avoid mechanical endothelial injury and unspecific dysfunction. Concentration-response curves to acetylcholine (10^{-8} to $3 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$) were performed in serotonin-precontracted segments (10^{-5} mol/L). Endothelium-independent relaxation to increasing concentrations of sodium nitroprusside (10^{-9} to $3 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$) was also obtained in serotonin-pre-contracted arteries. Peripheral endothelial function. At the end of the 9 and 90 days of treatment, mesenteric artery dilatation, index of peripheral artery endothelial function, was assessed as previously described.²³ In brief, after assessment of the hemodynamic parameters, a third order mesenteric artery was carefully isolated under a dissection microscope and transferred to an arteriograph. Arteries were pre-constricted by the phenylephrine, and flow-mediated dilatation was assessed by increasing stepwise intra-luminal perfusate flow rate.

Urinary and plasma biochemical assessment. After 90 days of treatment, randomly selected animals of each group were placed in metabolic cages for a 24-hours urine collection. Twenty-four hours urinary creatinine-excretion and proteinuria were determined as indicators of renal dysfunction.

Kidney histology. Kidneys were harvested at the end of the study 1. Masson trichrome staining of paraffin-embedded kidney sections were used for semi-quantitative scoring of glomerulosclerosis, tubular injury (necrosis and atrophy), interstitial inflammation and interstitial fibrosis, as previously described.²⁴ In brief, a minimum of 20 glomeruli (range: 20 to 30) in each specimen was examined and the severity of the lesion was graded from 0 to 4 and expressed as a percentage of number glomerular examined.

Cardiac histology. After hemodynamic assessment, the heart was harvested and LV weight was measured. After fixation, the LV was cut in 3 sections of identical thickness. The sections were dehydrated and embedded in paraffin. Three μm thick slices were then cut from each block and mounted on glass slides. Sections were then stained with Sirius red for the determination of collagen. Slides were enlarged 500 times using a microscope connected to an image analysis system. Collagen density was calculated in the left ventricle as the surface

occupied by collagen divided by the surface of the image. Perivascular collagen was excluded from this measurement.²⁵

LV reactive oxygen species levels were evaluated after 1h, 9 and 90 days of treatment in LV homogenates by electron paramagnetic resonance spectroscopy (EPR) using the spin probe 1-hydroxy-3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine (CMH, Noxygen, Germany), as previously described.¹⁸ Besides 'overall' LV ROS production, LV interfibrillar and LV subsarcolemmal mitochondria ROS production was determined at 1 hour after a single imeglimin administration, as previously described.²⁶

Plasma nitrite concentrations, a marker of NO production, were determined in plasma samples obtained after 1h, 9 and 90 days of treatment, using tri-iodide based chemiluminescence, as previously described.¹⁸ The NO signal was quantified using a nitric oxide analyser (NOA™ 280, Sievers Instruments Inc., Boulder, CO, USA).

Plasma biochemical. Plasma creatinine, glucose, insulin, total cholesterol and triglycerides levels were measured after 1h (glucose), 9 and 90 days of treatment.

Statistical analysis.

All results are given as mean $\pm$ SEM.

LV diastolic/systolic diameters and hemodynamic parameters were assessed as a primary endpoint, whereas all other parameters, i.e. the molecular mechanisms, were assessed as exploratory endpoints. Based upon historical data obtained with other drugs in Zucker fa/fa rats,^{16, 23} we made a simulation for each parameter obtained in untreated animals to demonstrate a statistical significant ($p < 0.05$) with a minimal power of 80 %. The minimal expected effect size or difference between untreated and treated was fixed to 10 % and 30 %, with the coefficient of variation to 25 % and 15 % for echocardiographic and hemodynamic studies, respectively. For all significant differences concerning primary endpoints, a posteriori powers higher than 80 % were also checked.

In order to evaluate the effect of metabolic syndrome, all parameters obtained in untreated Zucker fa/fa and lean rats were compared by Student's unpaired two-tailed t-test. In order to evaluate the effects of long- or short-term imeglimin, all parameters obtained 1 hour, or 9- and 90-day treated Zucker fa/fa rats were compared with time-matched untreated Zucker fa/fa using Student's unpaired two-tailed t-test

Before applying parametric tests as Student's unpaired two-tailed t-test, the Gaussian distribution of data was assessed by Shapiro-Wilk normality test and Kolmogorov-Smirnov test and graphically by QQplot and normal probability plot.

Results

Biological parameters. Body weight was increased in 13 and 24-week-old untreated Zucker fa/fa rats when compared to age-matched lean rats. While plasma glucose concentration was increased in 13 week-old Zucker fa/fa, plasma insulin, cholesterol and triglycerides concentrations were increased in 24-week-old untreated Zucker fa/fa rats. (Table 1) Imeglmin did not modify body weight, plasma cholesterol, triglycerides or insulin concentrations at any time, but reduced plasma fasting glucose after both 9 and 90 days of administration, when compared to untreated Zucker fa/fa rats.

Systemic hemodynamics. In 13 and 24-week-old untreated Zucker fa/fa rats, systolic blood pressure was increased, reaching statistical significance after 90 days, while diastolic blood pressure and heart rate were not different when compared with age-matched lean rats. Neither 9- nor 90-day imeglimin modified systolic and diastolic blood pressure, or heart rate (Table1).

LV remodeling. LV diastolic and systolic diameters as well as LV fractional shortening were similar in 13-week-old untreated Zucker fa/fa rats compared to age-matched lean rats. (Figure 1) LV diastolic and systolic diameters increased during aging, resulting in a significant decrease in LV fractional shortening compared to age-matched lean rats after 90 days (Figure 1). Imeglimin slightly reduced LV diastolic and systolic diameters after 9, 30 and 90 days of treatment, reaching statistical significance after 30 days for LV diastolic diameter and after 90 days for systolic diameter. Imeglimin also increased LV fractional shortening, reaching statistical significance after 90 days.

LV hemodynamics. LV end-systolic pressure was slightly increased in 13- and 24-week old Zucker fa/fa rats when compared to age-matched lean rats, and this increase was statistically significant in 24-week old rats. LV end-systolic pressure volume relationship was significantly increased in 13-week-old Zucker fa/fa (Figure 2), while LV end-diastolic pressure, relaxation constant Tau, and LV end-diastolic pressure volume relationship were all significantly increased in both 13- and 24-week old Zucker fa/fa rats compared to age-matched lean animals.

Nine and ninety-day imeglimin administration modified neither LV end systolic pressure nor LV end systolic pressure–volume relation. The 9-day imeglimin administration decreased LV end-diastolic pressure and LV end-diastolic pressure volume relationship, reaching statistical significance for the latter, without modifying LV Tau. The 90-day imeglimin treatment markedly reduced LV end-diastolic pressure, LV end-diastolic pressure-volume relationship and Tau, reaching statistical significance for LV end-diastolic pressure volume relationship and Tau

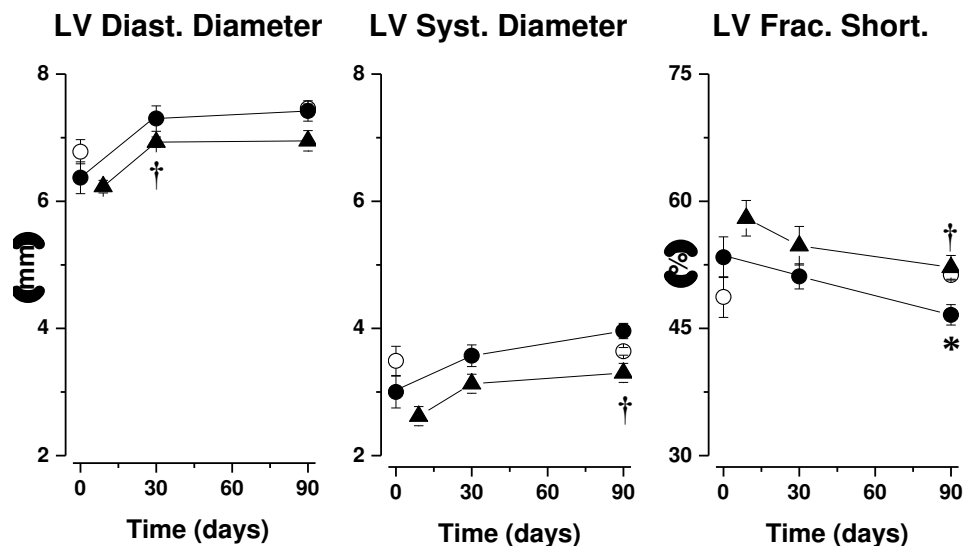


Figure 1. Left ventricular (LV) diastolic diameter and systolic diameter as well as LV fractional shortening determined before and after 30 and 90 days in untreated Zucker fa/+ (open circles) and Zucker fa/fa/ rats (filled circles) and after 9, 30 and 90 days in imeglimin-treated Zucker fa/fa (filled triangles).

*: p<.05 vs. untreated Zucker fa/fa; †: p<.05 vs. untreated Zucker fa/+.

Table 1. Biology and systemic hemodynamics and after 9 and 90 days of imeglimin

Group	Time	Lean	Zucker fa/fa	
			Untreated	Imeglimin
Body Weight (g)	D ₉	361±12	426±7*	421±16
	D ₉₀	415±25	568±11*	545±13
Plasma glucose (mMol/L)	D ₉	4.98±0.17	8.06±0.77*	6.64±0.39†
	D ₉₀	7.17±0.61	6.73±0.25	5.50±0.31†
Plasma Insulin (Unit/ml)	D ₉	-	14.1±3.5	13.3±2.4
	D ₉₀	1.27±0.53	4.88±0.59*	4.76±0.57
Plasma cholesterol (mMol/L)	D ₉	-	4.11±0.24	4.19±0.40
	D ₉₀	2.85±0.12	5.66±0.23*	5.51±0.33
Plasma triglycerides (mMol/L)	D ₉	-	2.62±0.22	1.66±0.41
	D ₉₀	0.96±0.12	5.02±0.31*	6.94±1.30
Syst. Blood Pressure (mm Hg)	D ₉	130±6	143±5	146±4
	D ₉₀	108±6	131±6*	125±5
Diast. Blood Pressure (mm Hg)	D ₉	102±4	101±5	106±2
	D ₉₀	82±7	96±6	90±4
Heart rate (beats/min)	D ₉	354±12	370±18	381±17
	D ₉₀	343±9	345±13	340±14

Table 1. Biology and systemic hemodynamics and after 9 and 90 days of imeglimin
 *: p<0.05 treatment. vs. Lean Zucker fa/+ ; †: p<0.05 vs. untreated Zucker fa/fa

LV remodeling. While LV weight was similar between Zucker fa/fa and lean rats at the age of 13 and 24 weeks, LV interstitial collagen was significantly increased in 24-week old Zucker fa/fa. Imeglimin did not modify LV weight at any time, but significantly reduced LV collagen density after 90 days (Table 2). Furthermore, myocardial perfusion was decreased in both 13 and 24 weeks-old untreated Zucker fa/fa rats. Both 9- and 90-day imeglimin significantly increased myocardial tissue perfusion (Table 2).

Left ventricular oxidative stress. LV ROS production was increased, while plasma nitrite levels were decreased in 13- and 24-week-old untreated Zucker fa/fa rats when compared to age-matched lean rats. Both 9- and 90-day imeglimin treatment decreased ROS production levels and increased plasma nitrite levels (Table 2).

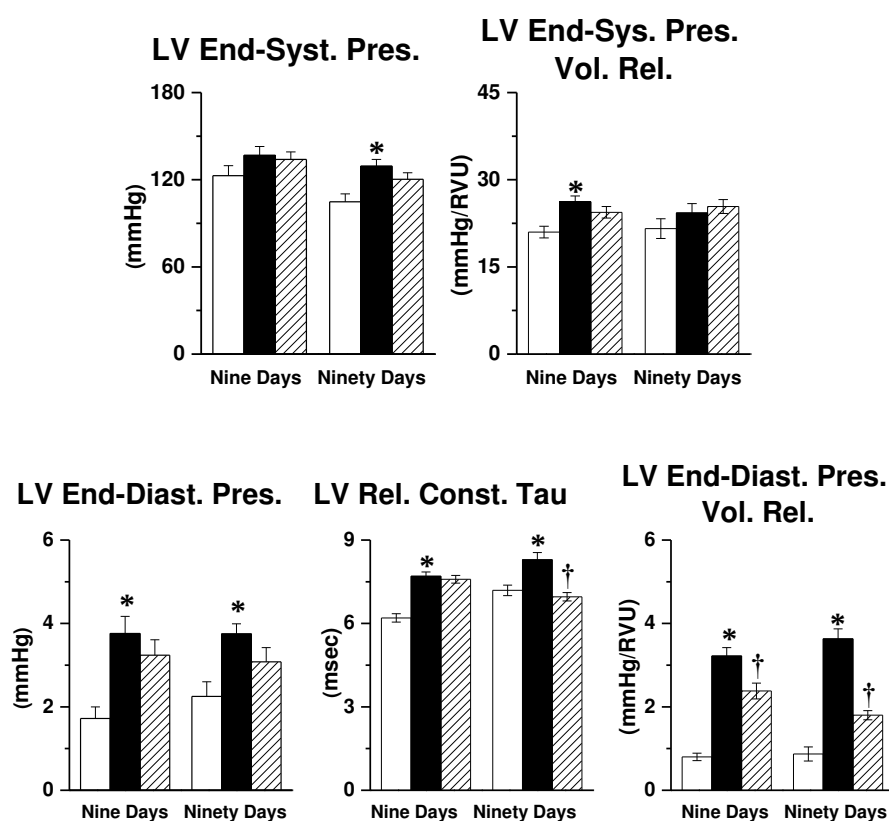


Figure 2. Left ventricular (LV) end-systolic pressure, LV end-systolic pressure-volume relation, LV end-diastolic pressure, LV relaxation constant Tau and LV end-diastolic pressure-volume relation determined after 9 or 90 days in Zucker fa/+ rats (white bars), untreated (black bars) and imeglimin-treated Zucker fa/fa (hatched bars).*: p<.05 vs untreated Zucker fa/+; †: p<.05 vs untreated Zucker fa/fa

Group	Time	Lean	Zucker fa/fa	
			Untreated	Imeglimin
LV weight (g)	D ₉	0.832±0.030	0.813±0.013	0.813±0.03
	D ₉₀	1.017±0.048	1.048±0.034	1.126±0.042
LV collagen density (%)	D ₉	2.26±0.21	3.48±0.48	3.33±0.22
	D ₉₀	2.06±0.11	3.07±0.08*	2.52±0.20†
LV myocardial perfusion (ml/min/g)	D ₉	6.31±0.31	4.88±0.26*	5.71±0.26†
	D ₉₀	6.16±0.26	4.28±0.35*	5.68±0.12†
LV ROS production (AU.μg ⁻¹ .h ⁻¹)	D ₉	32.25±0.90	39.51±1.77*	27.61±1.29†
	D ₉₀	26.69±3.06	40.96±3.29*	34.02±1.49†
Plasma nitrite (nM)	D ₉	407±20	270±27*	438±51†
	D ₉₀	450±43	292±26*	424±15†

Table 2. LV remodeling, perfusion and ROS after 9 and 90 days of imeglimin treatment
*: p<0.05 vs. Lean Zucker fa/+; †: p<0.05 vs. untreated Zucker fa/fa

Coronary artery endothelium-dependent relaxation. Imeglimin administration for 9 and 90 days prevented the impairment in acetylcholine-induced relaxation of septal coronary artery observed in 24 weeks-old untreated Zucker fa/fa rats (Figure 3, middle and right panel). Moreover, one hour after a single imeglimin administration endothelium-dependent relaxation was slightly improved compared to age-matched untreated Zucker rat (Figure 3, left panel), reaching statistical significance at the concentrations of 10^{-8} - 3×10^{-7} M.

Coronary relaxation induced by sodium nitroprusside was identical in all groups (data not shown).

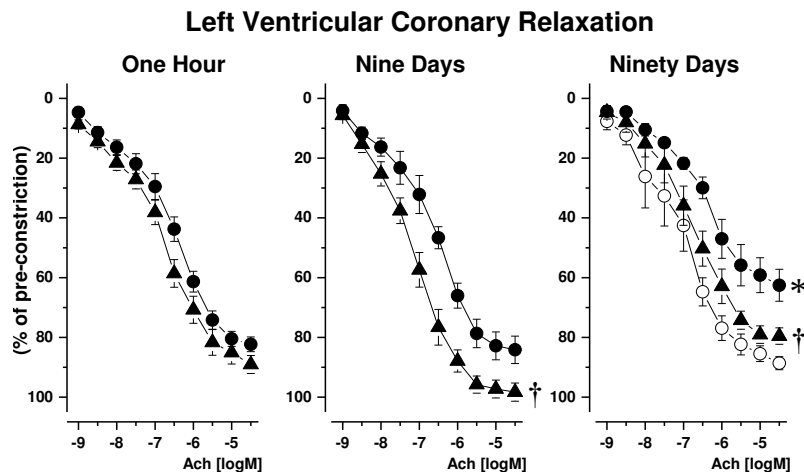


Figure 3. Septal coronary relaxation induced by acetylcholine in imeglimin-treated Zucker fa/fa rats (black triangle) either 1 hour after the first administration (left), and after 9 (center) as well as 90-day treatment (right), and in age-matched untreated Zucker fa/fa rats (black circle). Twenty-four weeks-old untreated Zucker fa/+ (white circle) were used as healthy control *: $p < .05$ vs. lean rats; †: $p < .05$ vs. untreated Zucker fa/fa.

Mesenteric endothelium-dependent dilatation. Imeglimin administered for 9 or 90 days prevented the impairment of flow-mediated dilation of mesenteric arteries when compared to time-matched untreated Zucker fa/fa. (Figure 4).

Oral glucose tolerance test. Oral glucose tolerance was impaired in 13- and 24-week old untreated Zucker fa/fa rats when compared to age-matched lean rats. (Figure 5; left and right upper panel, respectively). Imeglimin normalized oral glucose tolerance test after 9 and 90 days treatment (Figure 5 upper panel).

Intraperitoneal insulin tolerance test. Insulin tolerance was impaired in 13- and 24-week old untreated Zucker fa/fa rats when compared to age-matched lean rats. (Figure 5; left and right down panel, respectively). Imeglimin did not significantly modify insulin tolerance after 9 or 90 days treatments (Figure 5 down panel).

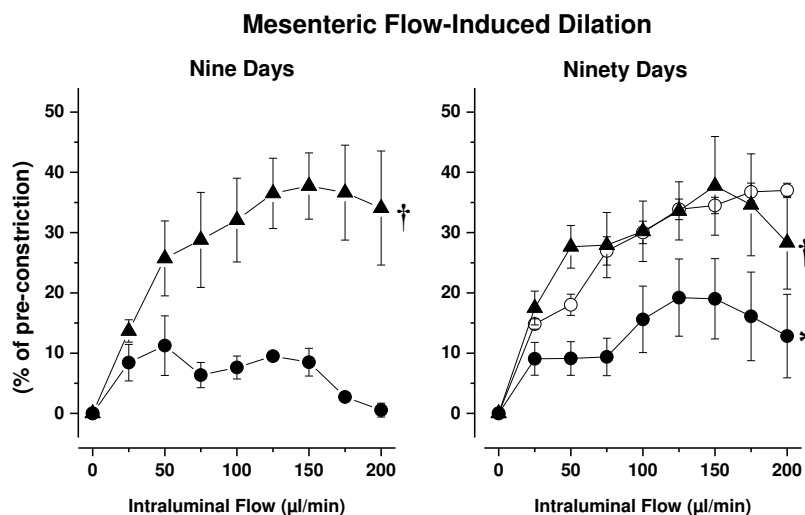


Figure 4. Mesenteric artery flow-induced dilation in untreated (black circle) and imeglimin-treated Zucker fa/fa (black triangle), after 9 (left panel) and 90 days (right panel). Twenty-four weeks-old untreated Zucker fa/+ (white circle) were used as healthy control.
*: $p < .05$ vs. Zucker fa/+ rats; †: $p < .05$ vs. untreated Zucker fa/fa

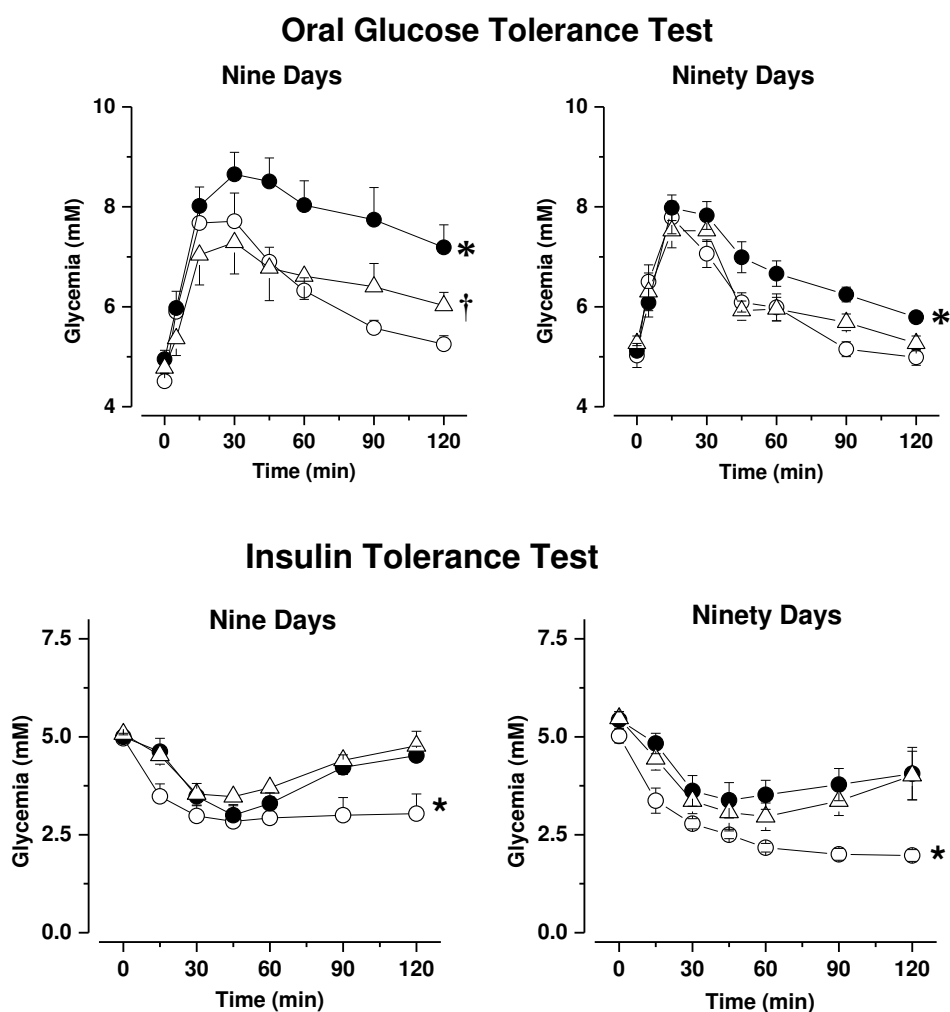


Figure 5. Oral glucose tolerance test (upper panel) and Insulin tolerance test (down panel) in untreated Zucker fa/+ (white circle) and Zucker fa/fa (black circle) as well as in imeglimin-treated Zucker fa/fa (white triangle) 1 hour after the last imeglimin administration of the 9-day (left panel) and 90-day (right panel) treatment period.
*: $p < .05$ vs. Zucker fa/+ rats; †: $p < .05$ vs. untreated Zucker fa/fa

Kidney function. Albuminuria was significantly increased in 24-week old untreated Zucker fa/fa rats compared to age-matched lean rats, while urinary volume and creatinuria were not modified. Imeglimin treatment for 90 days reduced albuminuria while neither creatininuria nor urinary volume were modified. (Table 3)

Kidney histology. Glomeruli and tubular injury scores, interstitial fibrosis and interstitial inflammation were increased in 24-week old untreated Zucker fa/fa rats compared to age-matched lean rats. (Table 3) Imeglimin treatment for 90 days significantly reduced interstitial fibrosis but only tended to decrease glomeruli injury score and interstitial inflammation

Exercise tolerance. Maximal running distance was 438±2 meters in 24-week old lean animals (n=4), and was reduced to 123±13 meters in 24-week old untreated Zucker fa/fa animals (n=7). 90 days Imeglimin tended to increase maximal running distance to 161±19 meters (n=5) without reaching statistical significance (data not shown).

Acute effects of imeglimin (Table 4). As soon as 1 hour after imeglimin administration, plasma fasting glucose was not modified, but myocardial tissue perfusion, as well as LV diastolic function was improved (as illustrated by the decreases in LV end-diastolic pressure, Tau and LV end-diastolic pressure volume relation) while systolic cardiac parameters were not changed. Moreover, this acute administration slightly improved coronary endothelium-dependent relaxation, compared to age-matched untreated Zucker fa/fa rat (Figure 3, left panel), reaching statistical significance at the concentrations of 10^{-7} - 3×10^{-7} -M acetylcholine. Furthermore after one hour of imeglimin administration LV reactive oxygen species ROS production tended to be decreased, but reactive oxygen species production was significantly decreased in isolated sub-sarcolemma mitochondria population (Table 4). Finally, the acute treatment increased plasma nitrites.

Group	Lean	Zucker fa/fa	
		Untreated	Imeglimin
Urinary volume (ml/12 h)	7.60±0.61	8.93±0.64	9.37±0.60
Creatinuria (mg/24 h)	834±71	692±77	659±78
Albuminuria (mg/24 h)	108±8	385±58*	251±27†
Glomerular injury (AU)	0.19±0.09	2.10±0.56*	1.43±0.30
Tubular injury (AU)	0.19±0.09	2.30±0.30*	2.43±0.23
Interstitial fibrosis (AU)	0.38±0.13	2.00±0.22*	1.50±0.11†
Interstitial inflammation (AU)	0.06±0.06	1.60±0.29*	1.14±0.18

Table 3. Kidney structure and function after 90 days of imeglimin treatment.

*: p<0.05 vs. Lean Zucker fa/+; †: p<0.05 vs. untreated Zucker fa/fa

Table 4. Acute effects of imeglimin 1 hour after administration

Group	Zucker fa/fa	
	Untreated	Imeglimin
Plasma fasting glucose (mMol/L)	5.98±0.46	5.15±0.62
Systolic blood pressure (mm Hg)	145±4	133±4†
Diastolic blood pressure (mm Hg)	105±3	97±3
Heart rate (beats/min)	371±11	374±9
LV end-systolic pressure (mm Hg)	140±4	123±6†
LV end-systolic pressure-volume relation (mm Hg/RVU)	25.2±1.1	27.7±1.9
LV end-diastolic pressure (mm Hg)	3.57±0.35	2.80±0.43
LV relaxation constant Tau (msec)	7.89±0.18	7.03±0.24†
LV end-diastolic pressure-volume relation (mmHg/RVU)	3.38±0.18	1.90±0.07†
LV myocardial tissue perfusion (ml/min/g)	4.51±0.26	6.24±0.52†
LV ROS production (AU.μg ⁻¹ .h ⁻¹)	20.64±0.77	18.21±0.83 (p=0.06)
Plasma Nitrite levels (nM)	297±26	648±92†
LV mitochondrial ROS (AU.μg ⁻¹ .h ⁻¹)		
Sub-sarcolemmal	6407±779	4319±485†
Inter-fibrillar	2953±413	2116±532

Table 4. Acute effects of imeglimin 1 hour after administration

*: p<0.05 vs. Lean Zucker fa/+ ; †: p<0.05 vs. untreated Zucker fa/fa

Discussion

This study highlights that imeglimin, a new glucose-lowering agent targeting mitochondrial bioenergetics, improves metabolic syndrome-related cardiac and vascular dysfunctions. Interestingly, these improvements of both cardiac and vascular functions are not only observed after short- and long-term treatment but also already observed 1 hour after imeglimin administration, and involve a decrease in ROS production.

We choose the Zucker fa/fa rats since this rat model of metabolic syndrome-related cardiovascular dysfunctions presents classical characteristics observed in Human metabolic syndrome.^{2, 27} Indeed, obesity²⁸, hypertension²⁹, hyperlipidemia²⁸, hypercholesterolemia²⁸ and impaired tolerance to glucose were observed in 12 and 24 week-old Zucker fa/fa rats. Moreover, this was associated, as already reported by us and others, with LV diastolic^{16, 30, 31} as well as vascular dysfunctions, i.e. impairments of both coronary endothelium dependent vasorelaxation¹⁴ and mesenteric endothelium dependent vasodilatation.²³

Our first major result is that imeglimin improves both LV diastolic and vascular dysfunctions. The improvement of diastolic dysfunction was independent of modifications in systemic hemodynamics since no major modification of blood pressure was observed, but clearly involved a decrease in oxidative stress. Indeed, in 13 weeks-old Zucker fa/fa rats 1 hour after imeglimin administration glucose plasma level was not changed, but LV ROS production was already decreased. Interestingly the decrease of LV oxidative stress probably results from a decrease in mitochondrial ROS production, as already shown in the liver mitochondria following imeglimin treatment¹¹, since the decrease in mitochondrial ROS production was more marked than in 'whole' LV tissue. Moreover, we cannot exclude contribution of others ROS sources, such as NADPH oxidase, to reduce ROS production as observed in our study after 9 or 90 days of imeglimin treatment, since reduction in ROS will reduce ROS-induced ROS production.³²

This reduction in oxidative stress is also probably involved in the improvement of vascular function by imeglimin. Indeed, limiting NO neutralization by reducing endothelial ROS over-production, increases NO bio-availability, as illustrated in our study by the improvement in NO-mediated acetylcholine-induced coronary relaxation and flow-mediated mesenteric dilatation, as well as the increase in nitrite plasma level altogether demonstrating a restored NO bio-availability.³³

Moreover, the reduction of ROS/increase in NO bio-availability and the resulting improved coronary function probably participates to the increase in myocardial perfusion. This will limit the metabolic-syndrome induced hypo-perfusion observed in this study and thus re-establish LV tissue O₂ supply. Such effect is beneficial since it reduces hypoxia-induced ROS production/inflammation^{30, 34, 35} and as a consequence breaks the vicious circle of ROS/inflammation/ROS production.

Simultaneously with the improvement of coronary function, imeglimin also improves LV diastolic function. This likely results, at least in part, from the reduction of ROS and increase in NO bio-availability, since NO directly improves LV diastolic dysfunction by promoting Ca²⁺ handling through protein kinase GMPc dependent (PKG) activation³⁶.

The results obtained after acute (1h) imeglimin treatment demonstrate beneficial effects of imeglimin on both LV diastolic and coronary dysfunctions that are similar to those of chronic treatment. Whereas the acute and chronic effects share several mechanisms, e.g. the reduction of ROS/increase in NO bio-availability, other mechanisms are only involved in either the short- or the long-term effects of imeglimin. Indeed, in addition to direct beneficial effects of the reduction in oxidative stress on LV diastolic function, indirect effects due to chronic decreases in LV ROS production contribute to imeglimin's cardiovascular protective effect. For example, reduced oxidative stress will on the long-term limit LV collagen accumulation by reducing myocardial ROS-induced collagen synthesis³⁷.

In addition to direct limitation of inflammation/oxidative stress, imeglimin might also prevent the hyperglycemia related toxicity/ROS production³⁸ through a restoration in glucose tolerance and a reduction in plasma fasting glucose, thus participating to the sustained decrease in oxidative stress and increase in NO bio-availability.

Interestingly, at the vascular level the imeglimin-related increased in NO bio-availability not only improved coronary function but also restored mesenteric artery flow-mediated dilation. Thus imeglimin opposes the aggravation of vascular endothelium-dependent dysfunction observed during aging in untreated Zucker rats³⁹ as well as in humans with metabolic syndrome⁴⁰.

In parallel to the improvement in peripheral artery endothelial function, we observed a decrease in albuminuria after long term treatment, suggesting that imeglimin also prevented metabolic-syndrome-related glomerular endothelium injury.⁴¹ Moreover, interstitial fibrosis was decreased in kidney tubules, probably also resulting from a (long-term) reduction in

oxidative/inflammatory status³⁷. Taken together these results demonstrate that long-term imeglimin treatment, when initiated “early”, in addition to the cardiac and vascular effects, also reduced end-stage kidney damage.

Intolerance to physical exercise is a frequent phenomenon observed in patients with diastolic dysfunction and metabolic-syndrome and this was also found in 24-week old untreated Zucker fa/fa rats. Long-term imeglimin treatment increases running distance by 20% in obese Zucker fa/fa rats but without reaching statistical significance. Despite the effect of imeglimin on cardiac function as well as on peripheral artery dilatation and thus the possible improvement of the metabolic syndrome-related impairment of skeletal muscle perfusion^{42, 43}, imeglimin did not clearly improve exercise tolerance. This may be related to the fact that imeglimin did not modify body weight and that obesity per se, probably remains the most important factor in effort intolerance in such a model.

Study limitations: In the present study imeglimin was administrated as single medication at the dose of 150 mg/kg bid as previously done in others rodents models of diabetes^{10, 11} to control glycemia. However, it cannot be excluded that another dosing regimen, e.g. higher dosing or continuous administration, will be more effective, especially since the observed beneficial effects were independent of glycemic control. Furthermore, metabolic syndrome patients often receive several medications each targeting a specific component of metabolic syndrome, such as anti-hypertensive drugs, lipid- and glucose-lowering agents. Further investigation of imeglimin effects on cardiovascular function when associate with another treatment standard of management of metabolic syndrome needs to address these questions.

In conclusion, in a model of metabolic-syndrome related cardiomyopathy imeglimin, a novel glucose-lowering agent targeting mitochondrial bioenergetics prevents various clinically relevant parameters of end-organ damage also observed in patients with metabolic syndrome, i.e. LV diastolic, vascular endothelial and renal dysfunctions, at least in part through a reduction in oxidative stress. Clinical studies are now needed to test the possible beneficial effects of this compound on metabolic syndrome and Heart Failure with Preserved Ejection Fraction.

Acknowledgments

This work was funded by a research grant from Poxel SA, Lyon, France, and co-supported by the European Union and the Région Normandie.(Europe gets involved in Normandy with European Regional Development Fund; ERDF), the European Fibro-Targets Project (grant agreement No. FP7#602904), the FP7-funded COST ADMIRE network (BM1301) and the Fédération Française de Cardiology. ML was the recipient of a “PhD grant from Rouen Normandy University and also funded by FU REMOD-VHF.

References.

1. Lakka HM, Laaksonen DE, Lakka TA, Niskanen LK, Kumpusalo E, Tuomilehto J, Salonen JT. The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. *JAMA*. 2002;288:2709-2716
2. Wilson PW, D'Agostino RB, Parise H, Sullivan L, Meigs JB. Metabolic syndrome as a precursor of cardiovascular disease and type 2 diabetes mellitus. *Circulation*. 2005;112:3066-3072
3. von Bibra H, St John Sutton M. Diastolic dysfunction in diabetes and the metabolic syndrome: Promising potential for diagnosis and prognosis. *Diabetologia*. 2010;53:1033-1045
4. Katakam PV, Tulbert CD, Snipes JA, Erdos B, Miller AW, Busija DW. Impaired insulin-induced vasodilation in small coronary arteries of Zucker obese rats is mediated by reactive oxygen species. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;288:H854-860
5. van Bilsen M, Smeets PJ, Gilde AJ, van der Vusse GJ. Metabolic remodelling of the failing heart: The cardiac burn-out syndrome? *Cardiovasc Res*. 2004;61:218-226

6. Katakam PV, Snipes JA, Tulbert CD, Mayanagi K, Miller AW, Busija DW. Impaired endothelin-induced vasoconstriction in coronary arteries of Zucker obese rats is associated with uncoupling of $[Ca^{2+}]_i$ signaling. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2006;290:R145-153
7. Liu L, Huang X, Gao J, Guo Y, Di Y, Sun S, Deng X, Cao J. Improved endogenous epoxyeicosatrienoic acid production mends heart function via increased PGC-1 α -mitochondrial functions in metabolic syndrome. *J Pharmacol Sci*. 2018;138:138-145
8. Fouqueray P, Pirags V, Diamant M, Scherthaner G, Lebovitz HE, Inzucchi SE, Bailey CJ. The efficacy and safety of imeglimin as add-on therapy in patients with type 2 diabetes inadequately controlled with sitagliptin monotherapy. *Diabetes Care*. 2014;37:1924-1930
9. Fouqueray P, Pirags V, Inzucchi SE, Bailey CJ, Scherthaner G, Diamant M, Lebovitz HE. The efficacy and safety of imeglimin as add-on therapy in patients with type 2 diabetes inadequately controlled with metformin monotherapy. *Diabetes Care*. 2013;36:565-568
10. Fouqueray P, Limal E, Fontaine E, Mathurin Baquié C, Claes Wollheim H, Harold Lebovitz and Sophie Bozec. Imeglimin - a new oral anti-diabetic that targets the three key defects of type 2 diabetes *Journal of Diabetes & Metabolism* 2011
11. Vial G, Chauvin MA, Bendridi N, Durand A, Meugnier E, Madec AM, Bernoud-Hubac N, Pais de Barros JP, Fontaine E, Acquaviva C, Hallakou-Bozec S, Bolze S, Vidal H, Rieusset J. Imeglimin normalizes glucose tolerance and insulin sensitivity and improves mitochondrial function in liver of a high-fat, high-sucrose diet mice model. *Diabetes*. 2015;64:2254-2264
12. Perry RJ, Cardone RL, Petersen MC, Zhang D, Fouqueray P, Hallakou-Bozec S, Bolze S, Shulman GI, Petersen KF, Kibbey RG. Imeglimin lowers glucose primarily by amplifying glucose-stimulated insulin secretion in high-fat-fed rodents. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*. 2016;311:E461-470
13. Daille D, Vial G, Borel AL, Cottet-Rouselle C, Hallakou-Bozec S, Bolze S, Fouqueray P, Fontaine E. Imeglimin prevents human endothelial cell death by inhibiting mitochondrial permeability transition without inhibiting mitochondrial respiration. *Cell death discovery*. 2016;2:15072
14. Bender SB, DeMarco VG, Padilla J, Jenkins NT, Habibi J, Garro M, Pulakat L, Aroor AR, Jaffe IZ, Sowers JR. Mineralocorticoid receptor antagonism treats obesity-associated cardiac diastolic dysfunction. *Hypertension*. 2015;65:1082-1088
15. Agouni A, Lagrue-Lak-Hal AH, Mostefai HA, Tesse A, Mulder P, Rouet P, Desmoulin F, Heymes C, Martinez MC, Andriantsitohaina R. Red wine polyphenols prevent metabolic and cardiovascular alterations associated with obesity in Zucker fatty rats (fa/fa). *PLoS One*. 2009;4:e5557
16. Fang Y, Nicol L, Harouki N, Monteil C, Wecker D, Debunne M, Bauer F, Lallemand F, Richard V, Thuillez C, Mulder P. Improvement of left ventricular diastolic function induced by beta-blockade: a comparison between nebivolol and metoprolol. *J Mol Cell Cardiol*. 2011;51:168-176
17. Gomez E, Vercauteren M, Kurtz B, Ouvrard-Pascaud A, Mulder P, Henry JP, Besnier M, Waget A, Hooft Van Huijsduijnen R, Tremblay ML, Burcelin R, Thuillez C, Richard V. Reduction of heart failure by pharmacological inhibition or gene deletion of protein tyrosine phosphatase 1b. *J Mol Cell Cardiol*. 2012;52:1257-1264
18. Mulder P, Mellin V, Favre J, Vercauteren M, Remy-Jouet I, Monteil C, Richard V, Renet S, Henry JP, Jeng AY, Webb RL, Thuillez C. Aldosterone synthase inhibition improves cardiovascular function and structure in rats with heart failure: A comparison with spironolactone. *Eur Heart J*. 2008;29:2171-2179
19. Sahn DJ, DeMaria A, Kisslo J, Weyman A. Recommendations regarding quantitation in m-mode echocardiography: Results of a survey of echocardiographic measurements. *Circulation*. 1978;58:1072-1083
20. Mulder P, Devaux B, Richard V, Henry JP, Wilmart MC, Thibout E, Mace B, Thuillez C. Early versus delayed angiotensin-converting enzyme inhibition in experimental chronic heart failure. Effects on survival, hemodynamics, and cardiovascular remodeling. *Circulation*. 1997;95:1314-1319
21. Waller C, Hiller KH, Voll S, Haase A, Ertl G, Bauer WR. Myocardial perfusion imaging using a non-contrast agent mr imaging technique. *Int J Cardiovasc Imaging*. 2001;17:123-132
22. Waller C, Kahler E, Hiller KH, Hu K, Nahrendorf M, Voll S, Haase A, Ertl G, Bauer WR. Myocardial perfusion and intracapillary blood volume in rats at rest and with coronary dilatation: Mr imaging in vivo with use of a spin-labeling technique. *Radiology*. 2000;215:189-197
23. Merabet N, Fang Y, Nicol L, Monteil C, Remy-Jouet I, Henry JP, Wecker D, Le Bouter-Banon S, Roussel J, Richard V, Thuillez C, Mulder P. Selective heart rate reduction improves metabolic syndrome-related left ventricular diastolic dysfunction. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2015;66:399-408

24. Jung O, Jansen F, Mieth A, Barbosa-Sicard E, Pliquett RU, Babelova A, Morisseau C, Hwang SH, Tsai C, Hammock BD, Schaefer L, Geisslinger G, Amann K, Brandes RP. Inhibition of the soluble epoxide hydrolase promotes albuminuria in mice with progressive renal disease. *PLoS One*. 2010;5:e11979
25. Mulder P, Barbier S, Chagraoui A, Richard V, Henry JP, Lallemand F, Renet S, Lerebours G, Mahlberg-Gaudin F, Thuillez C. Long-term heart rate reduction induced by the selective i(f) current inhibitor ivabradine improves left ventricular function and intrinsic myocardial structure in congestive heart failure. *Circulation*. 2004;109:1674-1679
26. Crochemore C, Mekki M, Corbiere C, Karoui A, Noel R, Vendeville C, Vaugeois JM, Monteil C. Subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria display distinct superoxide production profiles. *Free radical research*. 2015;49:331-337
27. Ayalon N, Gopal DM, Mooney DM, Simonetti JS, Grossman JR, Dwivedi A, Donohue C, Perez AJ, Downing J, Gokce N, Miller EJ, Liang CS, Apovian CM, Colucci WS, Ho JE. Preclinical left ventricular diastolic dysfunction in metabolic syndrome. *Am J Cardiol*. 2014;114:838-842
28. Debin R, Lauzier B, Sicard P, Delemasure S, Amoureux S, Duvillard L, Vergely C, Cottin Y, Rochette L. Are zucker obese rats a useful model for cardiovascular complications in metabolic syndrome? Physical, biochemical and oxidative stress considerations. *Fundam Clin Pharmacol*. 2009;23:59-67
29. Luo H, Wang X, Chen C, Wang J, Zou X, Li C, Xu Z, Yang X, Shi W, Zeng C. Oxidative stress causes imbalance of renal renin angiotensin system (ras) components and hypertension in obese zucker rats. *Journal of the American Heart Association*. 2015;4
30. Zhou X, Ma L, Habibi J, Whaley-Connell A, Hayden MR, Tilmon RD, Brown AN, Kim JA, Demarco VG, Sowers JR. Nebivolol improves diastolic dysfunction and myocardial remodeling through reductions in oxidative stress in the zucker obese rat. *Hypertension*. 2010;55:880-888
31. Lachaux M, Barrera-Chimal J, Nicol L, Remy-Jouet I, Renet S, Dumesnil A, Wecker D, Richard V, Kolkhof P, Jaisser F, Ouvrard-Pascaud A, Mulder P. Short- and long-term administration of the non-steroidal mineralocorticoid receptor antagonist finerenone opposes metabolic syndrome-related cardio-renal dysfunction. *Diabetes, obesity & metabolism*. 2018;20:2399-2407
32. Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial ros-induced ros release: An update and review. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1757:509-517
33. Lauer T, Preik M, Rassaf T, Strauer BE, Deussen A, Feelisch M, Kelm M. Plasma nitrite rather than nitrate reflects regional endothelial nitric oxide synthase activity but lacks intrinsic vasodilator action. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:12814-12819
34. Serpillon S, Floyd BC, Gupte RS, George S, Kozicky M, Neito V, Recchia F, Stanley W, Wolin MS, Gupte SA. Superoxide production by nad(p)h oxidase and mitochondria is increased in genetically obese and hyperglycemic rat heart and aorta before the development of cardiac dysfunction. The role of glucose-6-phosphate dehydrogenase-derived nadph. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009;297:H153-162
35. Rosen P, Osmers A. Oxidative stress in young zucker rats with impaired glucose tolerance is diminished by acarbose. *Horm Metab Res*. 2006;38:575-586
36. van Heerebeek L, Hamdani N, Falcao-Pires I, Leite-Moreira AF, Begieneman MP, Bronzwaer JG, van der Velden J, Stienen GJ, Laarman GJ, Somsen A, Verheugt FW, Niessen HW, Paulus WJ. Low myocardial protein kinase g activity in heart failure with preserved ejection fraction. *Circulation*. 2012;126:830-839
37. Zhao W, Zhao T, Chen Y, Ahokas RA, Sun Y. Oxidative stress mediates cardiac fibrosis by enhancing transforming growth factor-beta1 in hypertensive rats. *Mol Cell Biochem*. 2008;317:43-50
38. Busik JV, Mohr S, Grant MB. Hyperglycemia-induced reactive oxygen species toxicity to endothelial cells is dependent on paracrine mediators. *Diabetes*. 2008;57:1952-1965
39. Oltman CL, Richou LL, Davidson EP, Coppey LJ, Lund DD, Yorek MA. Progression of coronary and mesenteric vascular dysfunction in zucker obese and zucker diabetic fatty rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;291:H1780-1787
40. Fornoni A, Raij L. Metabolic syndrome and endothelial dysfunction. *Current hypertension reports*. 2005;7:88-95
41. Prasad GV. Metabolic syndrome and chronic kidney disease: Current status and future directions. *World journal of nephrology*. 2014;3:210-219

Etude 3

Amélioration de l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée et de l'hypertension pulmonaire par le macitentan un antagoniste mixte des récepteurs de l'endothéline.

Résumé

L'hypertension pulmonaire consécutive à l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée (ICFEp) aggrave le pronostic de l'ICFEp et n'a, à ce jour, pas de traitement réellement efficace. Le macitentan, permet d'augmenter la survie dans l'hypertension pulmonaire artérielle mais ses effets dans l'HTP post-capillaire associée à l'ICFEp ne sont pas connus.

Nous avons évalué la fonction ventriculaire droite et mesuré sa pression chez des rats Zucker âgés de 24 semaines. En parallèle, nous avons évalué les effets du macitentan (10mg/kg/j) sur les dysfonctions cardiaques gauche et droite ainsi que sur l'HTP.

Nous avons retrouvé dans cette étude au niveau du VG le même profil de dysfonction diastolique, de dysfonction endothéliale coronaire et d'augmentation du stress oxydant que dans les précédentes études du laboratoire sur ce modèle.

Nous avons montré pour la première fois dans ce modèle une HTP (obtenue indirectement par cathétérisme VD), une dysfonction ventriculaire droite systolique et diastolique ainsi qu'une diminution du débit cardiaque VD survenant plus tardivement par rapport à la dysfonction VG.

L'augmentation du taux plasmatique d'endothéline ainsi que l'abrogation des variations de pression suite à l'injection intraveineuse d'endothéline mettent en évidence un blocage efficace des récepteurs chez les animaux traités

Le macitentan améliore à court et à long-terme l'hémodynamique VG ainsi que la dysfonction endothéliale. Chez les animaux traités on retrouve une diminution de la PAS et PAD maintenue durant toute l'étude, pouvant participer à l'amélioration de la dysfonction VG. Le macitentan permet de restaurer la fonction coronaire VG dépendante de l'acétylcholine- et prévient la diminution de la perfusion observée chez les animaux non traités.

Au niveau du VD l'administration à long-terme du macitentan permet de prévenir l'établissement de l'HTP ainsi que de la dysfonction VD systolique et diastolique.

Ainsi dans un modèle d'HTP et de dysfonction VD consécutives à une dysfonction VG l'antagoniste mixte des récepteurs de l'endothéline macitentan, exerce des effets bénéfiques. Ces effets bénéfiques passent non seulement par une prévention de la survenue de l'HTP et des dysfonctions VD mais aussi par une restauration de la fonction VG diastolique ainsi que la fonction endothéliale. Le contrôle de l'HTA par le macitentan participe certainement aux améliorations fonctionnelles et structurelles cardiaques.

**Improvement of Metabolic Syndrome-Related Heart Failure With
Preserved Ejection Fraction by the Dual ET_A-ET_B Receptor Antagonist
Macitentan**

**Marianne Lachaux¹ BS, Najah Harouki¹ PhD, Matthieu Soulié¹BS , Lionel Nicol¹ PhD,
Isabelle Rémy-Jouet¹ PhD, Sylvanie Renet¹, Anais Dumesnil¹, Jean-Paul Henry¹, Annie
Lejeune¹, Magalie Vercauteren² MD, Martine Clozel² MD, Marc Iglarz² PhD, Vincent
Richard¹ PhD, Paul Mulder¹ PhD.**

¹ Normandie Univ, UNIROUEN, Inserm U1096, FHU- REMOD-VHF, 76000 Rouen, France

² Idorsia Pharmaceuticals Ltd., Allschwil, Switzerland

Short title: Endothelin and metabolic syndrome-related ventricular dysfunction.

Address for correspondence:

Professor Paul Mulder
INSERM U1096, UFR Santé,
22 Bd Gambetta, Rouen 76000, France
Telephone: +33 (0)2 35 14 83 59
Fax : +33 (0)2 35 14 83 65
e-mail: paul.mulder@univ-rouen.fr

Abstract.

Background. WHO group II pulmonary hypertension (PH) due to left ventricular (LV) dysfunction represents a major health problem with significant morbidity and poor prognosis. Endothelin (ET) receptor blockade might be a promising therapeutic approach, since ET-1 is a key player in PH as well as in the development of cardiac dysfunction via both ET_A and ET_B receptors. However, whether dual ET receptor antagonism (ERA) exerts protective effects on PH due to cardiac dysfunction is less known. Thus, we sought to evaluate the effects of a dual ERA in a rat model of metabolic syndrome, which combines both right and left ventricular dysfunctions. **Methods.** We assessed in Zucker fa/fa rats the effects of the dual ERA macitentan (10 mg/kg/day as food additive for 7 or 90 days initiated at the age of 12 weeks) on RV and LV function/ remodeling/ (MRI), RV and LV hemodynamics (catheterization) and RV and LV coronary function (myograph). **Results.** After 7 and 90 days, untreated Zucker fa/fa rats presented both LV diastolic dysfunction (elevated LV End-Diastolic Pressure (EDP) and LV End-Diastolic Pressure-Volume Relation (EDPVR) without change in LV End-Systolic Pressure-Volume Relation (EDPVR) associated with increased collagen deposition, while left coronary artery relaxation to acetylcholine was impaired. Simultaneously, Zucker fa/fa rats developed PH and RV dysfunction characterized by increases in RVESP and RVEDP associated with RV coronary dysfunction. Short- and long-term macitentan treatment significantly prevented LV and RV as well as coronary dysfunctions and long-term treatment reduced LV collagen density. Moreover, both short- and long-term macitentan treatment reduced cardiac inflammation and reactive oxygen species production. **Conclusions.** The dual ERA macitentan demonstrates prevention of LV diastolic dysfunction and reduction of RV pressure in a model of PH due to metabolic syndromedysfunction and reduction of RV pressure in a model of PH due to metabolic syndrome.

Introduction

World Health Organization group II pulmonary hypertension (PH due to left ventricular (LV) dysfunction), the most common form of pulmonary hypertension [1], represents a major health problem due to a significant morbi-mortality and a poor prognosis [2, 3]. PH due to LV dysfunction, characterized by an increase in LV end-diastolic pressure [4], leads to post-capillary PH and participates to the development of right ventricular (RV) hypertrophy/dysfunction [5, 6].

Interestingly PH is extremely common in patients with heart failure (HF) with reduced ejection fraction (HFrEF) as well as HF with preserved ejection fraction (HFpEF). However, classical treatments of HFrEF show little of no efficacy in HFpEF patients. This might be related to the fact that HFpEF is a multifactorial clinical syndrome involving several co-morbidities, including besides PH, systemic arterial hypertension[7], LV remodelling/fibrosis[7-9] and diabetes/metabolic syndrome (MS).[10] Besides LV diastolic dysfunction/elevated filling pressure observed in HFpEF, several studies in humans demonstrate also a link between PH/RV dysfunction and HFpEF/MS [11-14]. It is tempting to hypothesize that targeting mechanisms involved in the development of both PH/RV and LV dysfunctions could also be new approach for the treatment of HFpEF and its consequences.

Among several targets involved in PH/HFpEF, the endothelin (ET) system seems particularly interesting since it is a potent vasoconstrictor peptide [15] involved in pre-capillary pulmonary hypertension and activated in HF [16]. Furthermore ET-1 promotes collagen deposition [17], leading to cardiac fibrosis, one major mechanism involved in diastolic dysfunction and HFpEF [18, 19]. Since the ET_A-ET_B receptor antagonists (ERA) bosentan and macitentan improve RV function in experimental models of PH [20-22] as well as patients with PH [23-26], it is reasonable to suggest that a dual ERA might be beneficial on PH and RV dysfunction in a context of HFpEF due to MS.

Thus, the goals of the present project were to assess 1) whether HFpEF observed in Zucker fatty rats is associated with a development of post-capillary pulmonary hypertension and RV hypertrophy/dysfunction, and 2) whether the dual ERA macitentan improves systemic, RV and LV hemodynamics, RV and LV function and morphological alterations

Methods and materials.

Animals and treatment.

This study was performed in 12-week-old male Zucker lean fa/+ and obese Zucker fa/fa rats (Charles River Laboratories, France). Animals were kept 2 per cage in standard laboratory conditions.

Two distinct studies were performed in order to evaluate the effects of long- (Study 1) and short-term (Study 2) macitentan treatment. Study 1: Zucker fa/fa rats were randomized at the age of 12 weeks in two groups either untreated (n=14) or treated for 90 days with macitentan (10 mg.kg⁻¹.day⁻¹; n=14 administered as food additive). Twelve untreated Zucker lean fa/+ animals were used as healthy controls. This experimental design allows the evaluation of the acute effects of macitentan independently of those induced by the improvement of cardiac remodeling observed after chronic treatment. Study 2: Zucker fa/fa rats were randomized at the age of 12 weeks in two groups, either untreated (n=12) or treated for 7 days with macitentan (10 mg.kg⁻¹.day⁻¹; n=12). Twelve untreated Zucker lean fa/+ animals were used as healthy controls.

Blood pressure and heart rate assessment.

Blood pressure and heart rate were measured in conscious rats by telemetry (Dataquest ART system, Data Sciences Inc, St Paul, Minn, USA) as previously described.[\[27\]](#)

ET_A-ET_B receptor blockade.

To verify ET receptor blockade, the blood pressure variation induced by ET-1 (1 nmol.kg⁻¹ i.v. bolus injection) were assessed after 7 and 90 days of macitentan administration in randomly selected animals from each group [\[28\]](#).

RV and LV volumes.

MRI was performed using a 4.7-T BIOSPEC (Bruker, Germany) as previously described [\[29\]](#). In brief, after anesthesia (sodium methohexital, 60 mg/kg IP), using the Intragate sequence (Bruker, France) 12 contiguous ventricular short-axis slices of 1.5 mm thickness with no inter-slice gap were acquired to cover the entire range of both ventricles. Data analysis was performed with an operator-interactive threshold technique by one trained observer using FARM-CAAS 2.0 software (Pie Medical, Netherlands). RV and LV volumes were determined from end-diastolic and end-systolic images by multiplication of RV and LV compartment area and slice thickness (1.5 mm). Total volumes were calculated as the sum of all slice volumes. Ejection fraction (EF) was calculated with the end-diastolic (EDV) and end-systolic (ESV) volumes ($EF = SV/EDV$). Cardiac output was calculated as (EDV-ESV) multiplied by heart rate (HR).

LV tissue perfusion.

At the end of the long- and short-term studies, myocardial tissue perfusion was evaluated using the same MRI equipment by Arterial Spin Labeling (ASL), in which, the blood in the arteries upstream from the imaging volume is magnetically “labeled”. As a consequence, image intensity changes will occur depending on the blood supply to the tissue in the imaged slice. Upon subtraction of an image acquired without spin labeling, the background signal from static spins is removed and the difference image can be used to quantify perfusion. The difference of the inverse of the apparent T1 images then yields a measure of the regional cardiac blood flow (rCBF) according to $rCBF = l (1/T1_{sel} - 1/T1_{nonsel})$, where l is the blood-tissue partition coefficient [\[30, 31\]](#).

RV and LV hemodynamics.

At the end of the long- and short-term study, rats were anesthetized (sodium methohexital, 60 mg/kg, IP). A Millar microtip manometer was introduced either into the RV (via the jugular vein) or the LV (via the carotid artery) for recording of RV and LV systolic (RVSP and LVSP) as well as end-diastolic pressures (RVEDP and LVEDP), the maximum rate of rise of RVSP and LVSP ($LV\ dp/dt_{max}$ and dP/dt_{max}), and RV and LV relaxation constant Tau, as previously described [32]. Moreover, LV pressure-volume loops were obtained at baseline and during loading by gently occluding the abdominal aorta with a cotton swab. Data were stored and analyzed by using Millar conductance data acquisition and analysis software (IOXä, EMKA, France) and LV end-systolic as well as end-diastolic pressure-volume relations were calculated.

LV histomorphology.

After assessment of cardiac hemodynamics, the heart was dissected; the atria as well as the right and left ventricle were weighted separately, and sections of the LV were either immersed in fixative solution or snap frozen in liquid nitrogen for subsequent assessment of LV collagen or LV immunohistochemistry as previously described [33].

LV collagen density was determined on Sirius-red stained slices in the 7- and 90-days protocols. In brief, after fixation, sections were dehydrated, embedded in paraffin, and 5 μ m thick histologic slices were obtained, stained with Sirius Red for collagen determination by image analysis. Collagen density was expressed as the surface occupied by collagen divided by the surface of the image.

LV capillary density and LV macrophage M1/2-populations were obtained by immunohistology from frozen slides, as previously described [34]. In brief, cryosections were stained using biotinylated mouse anti-rat CD31 (BD Biosciences, 555026, 1/100) and mouse anti-human smooth muscle α actin (Sigma, F3777, 1/200), for the detection of blood vessels. Macrophages were visualized using biotinylated rat anti-mouse F4/80 (Abcam, 192834, 1/75) together with rabbit anti-mouse CD206/MRC-1 (as above), followed by Cy3-conjugated donkey anti-rabbit IgG (as above). Biotinylated primary antibodies were revealed using SA-Alexa 488 (FluoProbes, 1/400).

RV and LV oxidative stress.

RV and LV reactive oxygen species (ROS) production were determined after the short- and long-term study by electron paramagnetic resonance spectroscopy, as previously described [35]. Snap frozen biopsies of LV tissues collected in the ventricle were homogenized and incubated at 37°C for 60 min in 50 mmol/L phosphate buffer containing 25 μ mol/L deferoxamine, 5 μ mol/L diethyldithiocarbamate, and 500 μ mol/L 1-hydroxy-3-methocarbonyl-2,2,5,5-tetramethyl pyrrolidine hydrochloride (CMH, Noxygen, Hamburg, Germany). The oxidation of CMH into the paramagnetic nitroxide $CM^{\bullet}$, driven mainly by superoxide and peroxynitrite reactions, was measured by electron paramagnetic resonance exactly 60 min after the beginning of incubation. Tissues were introduced into an insulin syringe and frozen in liquid nitrogen. Spectra were recorded at 77 K in a liquid nitrogen cooled dewar using an MS200 spectrometer (Magnettech, Berlin, Germany) with the following acquisition parameters: microwave power: 20 mW; microwave frequency: 9.54 GHz; modulation amplitude: 5 G; modulation frequency: 100 kHz; gain: 2×10^2 ; sweep time 120 s and number of scan 2. Intensity of the spectra was measured from the height of the central line and expressed in arbitrary units (AU) per mg of protein.

Right and septal coronary vascular function.

Coronary endothelium-dependent relaxation was assessed ex vivo by obtaining concentration-relaxing response curves to acetylcholine as described previously [36]. Briefly, the heart was removed and placed in cold, oxygenated Krebs buffer. Segments of septal coronary artery (1.5 mm long and ~180 to 250 μ m in diameter), or of right coronary artery (1.5 mm long and ~120 to 175 μ m in diameter) were carefully dissected and mounted in a small vessel

myograph for isometric tension recording (Dual Wire Myograph System; Danish Myo Technology). Endothelium-dependent relaxations to acetylcholine (10^{-9} to $10^{-4.5}$ M) were assessed after vessel contraction with 10^{-5} M serotonin.

Cardiac mRNA quantification.

Total RNA was extracted from LV with the TriZol reagent (Gibco life science) according to the manufacturer's instructions. RNA quantity and purity were assessed with a ND 1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies). Quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed with a light-cycler (Roche, Basel, Switzerland) using SYBR green I. The primers were obtained from Sigma-Aldrich and the sequences are sum up in the present table:

Gene	Forward	Reverse
GAPDH	GGCTGCCTTCTCTTGTGACA	ACCAGCTTCCATTCTAGC
Tubuline	GTGTCCACCATCATGTCAGC	GAGGAAGTGTAGTCGAGGGG
EEF2	AATCTGACCCTGTCGTGTCC	GTTGTGCTTGTGTTGGGACT
ANP	AGCCGAGACAGCAAACATCA	TGGACACCGCACTGTATACG
BNP	AGCTCTCAAAGGACCAAGGC	TCCGGTCTATCTTCTGCCCA
SOD2	GACATTGTGCCTCTGGGTTT	GCCCTGCATACTTTGTCCAT
SOD1	GCTTCTGTCGTCTCCTTGCT	CTCGAAGTGAATGACGCCCT
NOX 4	TTGGTGAACGCCCTGAACTT	TACCACCACCATGCAGACAC
Xantine Oxidase	TGCCAGACCATACTGAAAAGG	AAGCCACCCCATAACTGAAAT

Results are expressed relative to the average expression of 3 housekeeping genes: GAPDH, tubulin and EEF2.

Plasma biology.

At the end of the long- and short-term study, plasma samples were obtained for subsequent determination of triglycerides, HDL-C/LDL-C, nGal-3, NT-ProBNP, albumin, ET-1 and creatinine using ELISA kits, according to manufactures instruction.

Statistical Analysis

All results are given as mean $\pm$ SEM.

RV and LV diastolic/systolic diameters and hemodynamic parameters were assessed as a primary endpoint, whereas all other parameters, i.e. the molecular mechanisms, were assessed as secondary endpoints. Based upon historical data obtained with the dual endothelin receptor antagonist bosentan on remodeling and hemodynamics in rats with chronic heart failure [37], as well as using our previous data with other drugs in Zucker fa/fa rats [32, 38] we made a simulation for each parameter obtained in untreated animals to demonstrate a statistical significance ($p < 0.05$) with a minimal power of 80 %. The minimal expected difference between untreated and treated was fixed to 10%, with the coefficient of variation to 15 % for echocardiographic and hemodynamic studies. For all significant differences concerning primary endpoints, a posteriori power higher than 80 % were also checked.

In order to evaluate the effect of metabolic syndrome, all measurements obtained in untreated Zucker fa/fa and lean rats were compared by Student's unpaired two-tailed t-test. In order to evaluate the effects of long- or short-term macitentan treatment, all measurements obtained in short- and long-term macitentan-treated Zucker fa/fa rats were compared with time-matched untreated Zucker fa/fa using Student's unpaired two-tailed t-test.

For vascular studies, differences between groups were analyzed by 2-factor repeated measures ANOVA.

Before applying parametric tests as Student's unpaired two-tailed t-test, the Gaussian distribution of data was assessed by Shapiro-Wilk normality test and Kolmogorov-Smirnov test and graphically by QQplot and normal probability plot.

Results

Systemic blood pressure.

Systolic and diastolic pressures and heart rate were recorded by telemetry in untreated or macitentan-treated Zucker rats. Untreated rats developed hypertension as their pressure was higher than 130/80 mmHg. Both short- and long-term macitentan significantly decreased systolic and diastolic blood pressures without modification of heart rate (Figure 1).

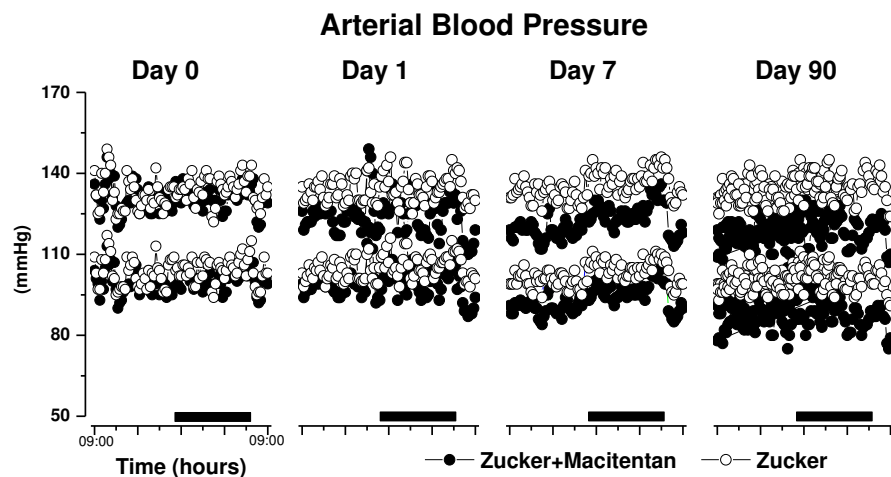
Right ventricular function and hemodynamics.

In 13-week-old untreated Zucker fa/fa rats RV function was preserved as seen by the similar values of cardiac output when compare to lean. However, despite both RV end-diastolic volume (RV ED volume) and RV end-systolic volume (RV ES volume) being decreased, RV ejection fraction was increased compared to lean rats. Animals treated for 7 days with macitentan presented the same profile as untreated Zucker fa/fa rats (Figure 2, upper panels).

RV function was impaired in 24-week-old untreated Zucker fa/fa rats as seen by the decrease in both RV ejection fraction and cardiac output. The decrease in RV ejection fraction was the consequence of a decrease in RV ED volume without modification in RV ES volume. Long-term macitentan treatment prevented the impairment of RV ejection fraction by increasing RV ED volume and reducing RV ES volume, consequently increasing cardiac output when compared to untreated Zucker fa/fa rats. (Figure 2, bottom panels)

Twenty-four-week-old Zucker fa/fa rats displayed pulmonary hypertension as estimated by the increase in RV end-systolic pressure and by the increase in RV end-diastolic pressure but without reaching statistical significant for the latter (Figure 3). This was associated with an increase in relaxation constant Tau, and RV dP/dt_{max} and RV dP/dt_{min} .

Long-term macitentan treatment decreased RV end-systolic pressure as well as RV end-diastolic pressure, reaching statistical significance for RV end-systolic pressure. Moreover, mcitentan reduced RV dP/dt_{max} as well as RV dP/dt_{min} and RV Tau, reaching statistical significance for RV dP/dt_{min} and Tau (Figure 3).



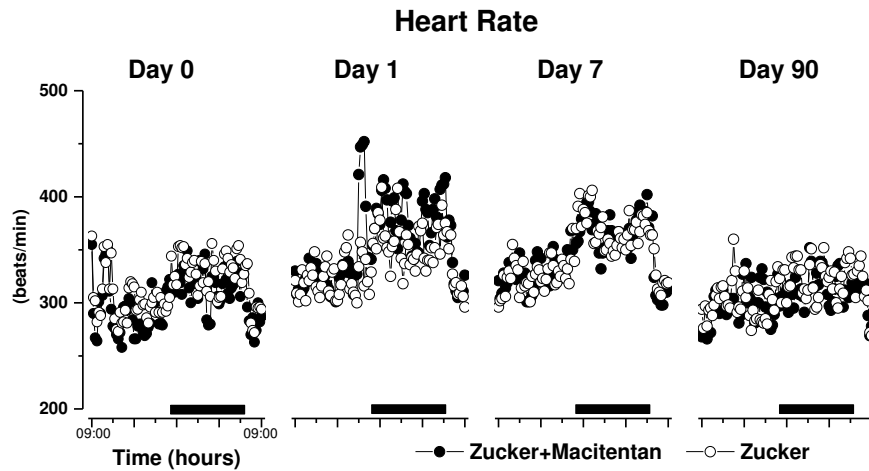


Figure 1. Blood pressure and heart rate obtained through telemetry

Diastolic and systolic blood pressure (upper panel) as well as heart rate (lower panel) in untreated Zucker fa/fa rats, and in Zucker fa/fa rats before (day 0) and after 1, 7 and 90 days macitentan administration. (Black bar indicates light off)

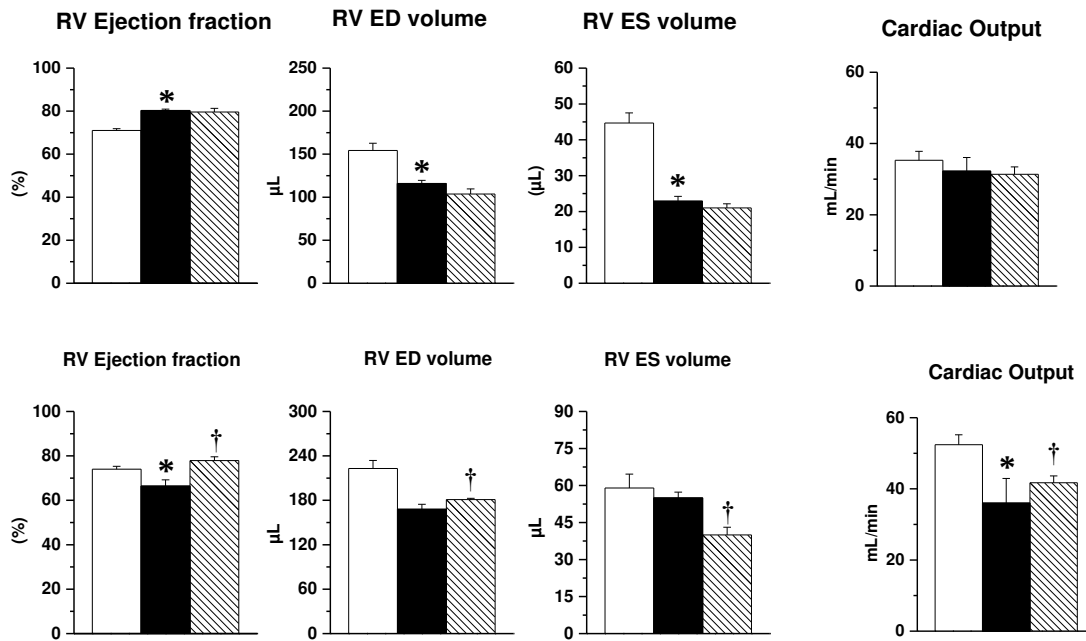


Figure 2. Right ventricular function

Upper panel. Right ventricular (RV) ejection fraction, RV end-diastolic volume (RV ED volume), RV end-systolic volume (RV ES volume) and RV cardiac output obtained by MRI in 13 weeks-old lean (white bars) and Zucker fa/fa rats either untreated (black bars) or treated for 7 days with macitentan (down-hatched bars).

Lower panel. Right ventricular (RV) ejection fraction, RV end-diastolic volume (RV ED volume), RV end-systolic volume (RV ES volume) and RV cardiac output obtained by MRI in 24 weeks-old lean (white bars), and Zucker fa/fa rats either untreated (black bars) or treated for 90 days with macitentan (down-hatched bars). *: $p < .05$ vs lean; †: $p < .05$ vs untreated Zucker fa/fa.

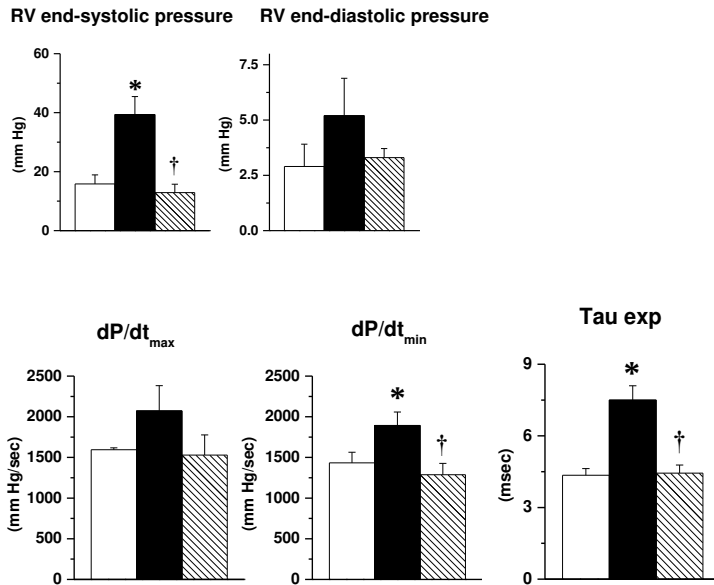


Figure 3. Right ventricular hemodynamics

Right ventricular (RV) end-systolic pressure (RVESP), RV end-diastolic pressure (RVEDP), as well as RV dP/dt_{max} and dP/dt_{min} and RV relaxation constant Tau determined in 24 weeks-old lean rats (white bars), and Zucker fa/fa rats either untreated (black bars) or treated for 90 days with macitentan (down-hatched bars) *: $p < .05$ vs lean; †: $p < .05$ vs untreated Zucker fa/fa.

Left ventricular function hemodynamics.

Compared to lean, thirteen week-old untreated Zucker fa/fa rats showed no major differences in terms of left ventricular (LV) ejection fraction and cardiac output, LV end-diastolic volume (LV ED volume) or LV end-systolic volume (LV ES volume; Figure 4, upper panels). A 7-day treatment with macitentan increased LV ejection fraction, resulting from a decrease in LV end-systolic volume without significantly modifying LV end-diastolic volume or cardiac output. (Figure 4, upper panels)

Twenty four week-old untreated Zucker rats displayed a decrease in both LV ED volume and LV ES volume without modification on LV ejection fraction (Figure 4, lower panels), but this was associated with a modest but statistical significant decrease in cardiac output. Long-term macitentan treatment did not influence LV ejection fraction, slightly increased LV end-diastolic volume without modifying LV ES volume and increased cardiac output (Figure 4, lower panels)

Concerning LV hemodynamics, in 13-week old Zucker fa/fa rats, LV ESP, LV ESPVR, LV EDP, LV EDPVR and Tau were increased. A 7-day treatment with macitentan reduced LV ESP, LV EDP, LV EDPVR and Tau, but did not modified LV ESPVR (Figure 5; upper panels). In 24-week old Zucker fa/fa rats, LV ESP, LV ESPVR, LV EDP, LV EDPVR and Tau were increased and the 90-day macitentan treatment also significantly decreased LV ESP, LV EDP, and LV EDPVR but did not modify LVESPVR or Tau (Figure 5; lower panels)

RV and LV morphology.

Compared to age-matched lean rats, RV weight, LV weight, collagen density, and myocardial perfusion were not different in 13 week-old untreated Zucker rats, but cardiomyocyte size was already increased. Moreover, at this age, neither LV perfusion, LV macrophage type-1 nor type-2 were modified, but LV ROS and, to a lesser extent, RV ROS,

were increased. Short-term macitentan decreased RV ROS, and LV ROS and increased myocardial perfusion, without modifying others parameters (Table 1).

In 24-week-old Zucker rats, RV weight and RV ROS were not modified, but LV weight, LV collagen density, LV cardiomyocyte size and LV collagen were increased, while myocardial perfusion was decreased compared to lean rats. Long-term macitentan significantly decreased LV collagen density without changing LV weight and cardiomyocyte size, and restored myocardial perfusion (Table 1).

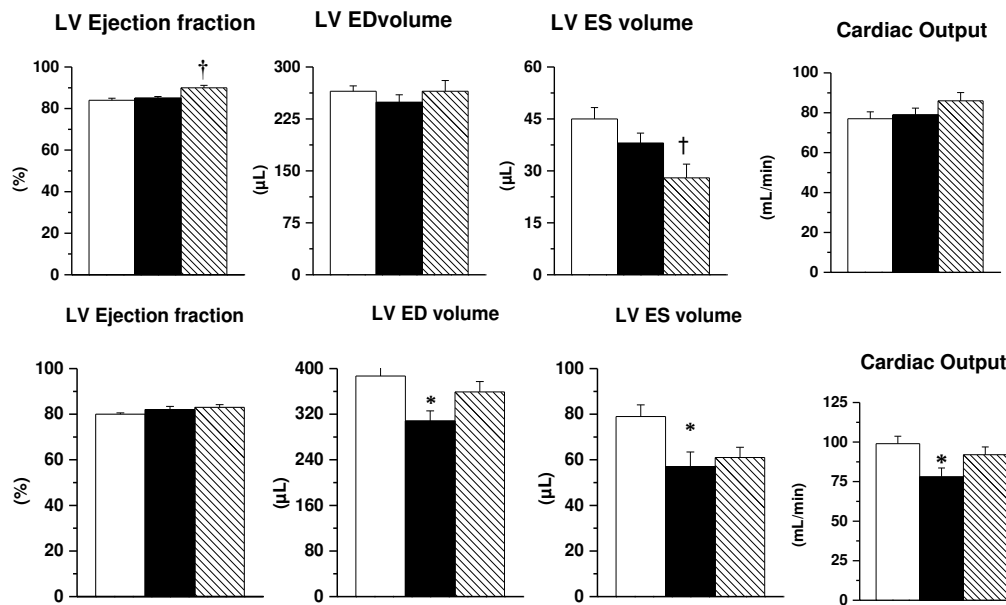


Fig 4. Left ventricular function analysis by MRI

Upper panel. Left ventricular (LV) ejection fraction, LV end-diastolic volume (LVED volume), LV end-systolic volume (LVES volume) and LV cardiac output obtained by MRI in 13 weeks-old lean (white bars) and Zucker fa/fa rats either untreated (black bars) or treated for 7 days with macitentan (down-hatched bars).

Lower panel. Left ventricular (LV) ejection fraction, LV end-diastolic volume (LVED volume), LV end-systolic volume (LVES volume) and LV cardiac output obtained by MRI in 24 weeks-old lean (white bars) and Zucker fa/fa rats either untreated (black bars) or treated for 90 days with macitentan (down-hatched bars).

Right and septal coronary vascular function.

RV coronary endothelium-dependent relaxation to acetylcholine was slightly impaired in 13 week-old untreated Zucker fa/fa rats when compared to lean. In 24 week-old untreated Zucker rats the curve was shifted to the right compared to lean rats. Macitentan treatment for 90 days significantly improved this relaxation compared to untreated Zucker rats (Figure 6).

Untreated Zucker fa/fa rats demonstrated an impairment of acetylcholine-induced relaxation of LV coronary artery when compared to age-matched lean rats at the ages of both 13 and 24 weeks. Short and long-term macitentan treatment prevented this impairment in LV coronary relaxation (Figure 6).

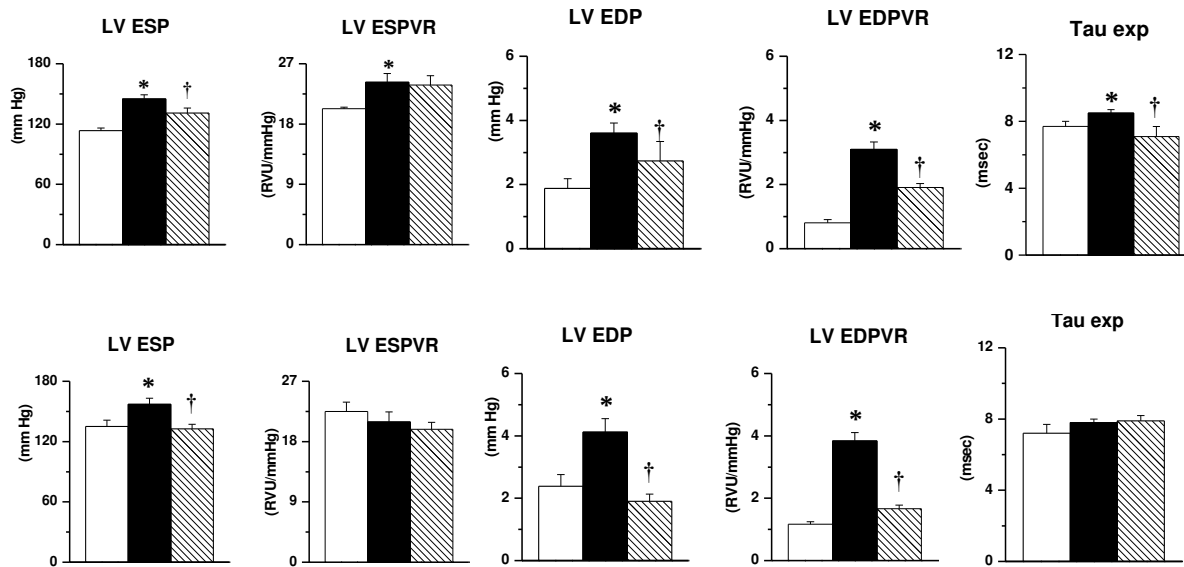


Figure 5. Left ventricular hemodynamics

Upper panel. Left ventricular (LV) end-systolic pressure (LV ESP), left ventricular end-systolic pressure-volume relation (LV ESPVR), left ventricular end-diastolic pressure (LV EDP), and left ventricular end-diastolic pressure-volume relation (LV EDPVR) determined in 13 weeks old lean rats (white bars) and Zucker fa/fa rats either untreated (black bars) or treated for 7 days with macitentan (down-hatched bars).

Lower panel : Left ventricular (LV) end-systolic pressure (LV ESP), left ventricular end-systolic pressure-volume relation (LV ESPVR), left ventricular end-diastolic pressure (LV EDP), and left ventricular end-diastolic pressure-volume relation (LV EDPVR) determined in 24 weeks old lean rats (white bars), and Zucker fa/fa rats either untreated (black bars) or treated for 90 days with macitentan (down-hatched bars).

*: $p < .05$ vs lean; †: $p < .05$ vs untreated Zucker fa/fa.

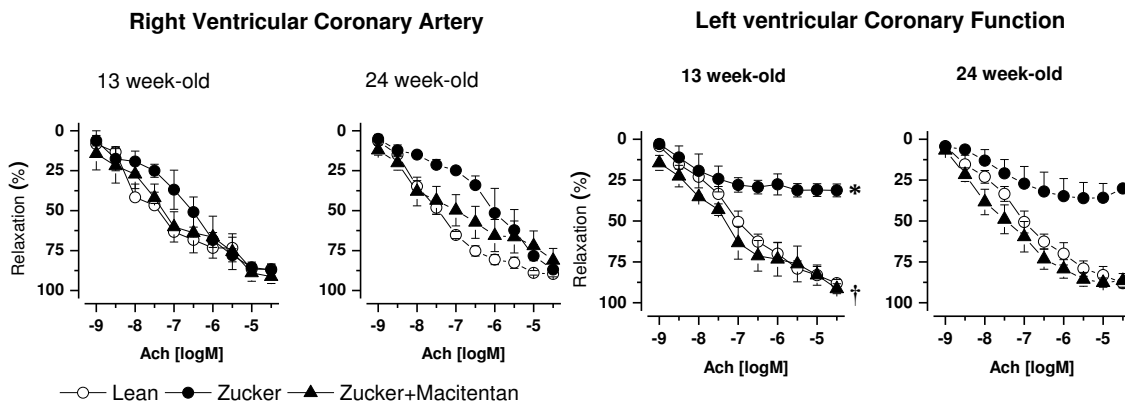


Figure 6. Right and Septal Coronary Endothelium dependent Relaxation.

Right ventricular (right panel) and left ventricular (left panel) coronary relaxation induced by acetylcholine in 13 and 24 weeks-old lean rats (white circles) and and Zucker fa/fa rats either untreated (black circles) or treated for 7 or 90 days respectively with macitentan (black triangles). *: $p < .05$ vs lean; †: $p < .05$ vs untreated Zucker fa/fa

Table 1. Body weight, Right and Left ventricular characteristics

	Time	Lean	Zucker fa/fa	
			Untreated	Macitentan
Body weight (g)	D ₇	383±18	474±11*	451±11
	D ₉₀	437±13	519±16*	496±16
Right Ventricular Weight (mg)	D ₇	190±15	214±10	201±15
	D ₉₀	242±12	261±22	274±11
Right Ventricular ROS (AU)	D ₇	68±6	83±8	63±5†
	D ₉₀	112±9	120±11	114±11
LV weight (mg)	D ₇	759±36	831±36	792±26
	D ₉₀	790±017	881±22*	879±18
LV myocyte size (µm²)	D ₇	453±17	507±30*	485±52
	D ₉₀	477±20	561±43*	556±31
LV collagen (%)	D ₇	0.87±0.10	1.05±0.05	1.01±0.04
	D ₉₀	0.93±0.10	1.32±0.13*	0.76±0.06†
LV perfusion (ml/min/g)	D ₇	11.0±0.6	10.2±0.3	11.1±0.3†
	D ₉₀	9.5±0.2	7.9±0.4*	8.8±0.2†
Left Ventricular ROS (AU)	D ₇	129±6	154±9*	125±3†
	D ₉₀	370±55	620±66*	479±58†
LV macrophage Type-1	D ₇	0.83±0.57	0.96±0.20	0.80±0.21
	D ₉₀	1.47±0.58	1.42±0.40	0.17±0.11†
LV macrophage Type-2	D ₇	1.63±0.83	1.23±0.18	1.28±0.17
	D ₉₀	2.24±0.37	1.48±0.69	1.08±0.60
Ratio M1 to M2	D ₇	0.53±0.65	1.06±0.34	0.72±0.26
	D ₉₀	0.75±0.28	1.24±0.77	0.07±0.04†

Table 1. Body weight, Right and Left ventricular characteristics

*: p<.05 vs lean; †: p<.05 vs untreated Zucker fa/fa

ET_A-ET_B receptor blockade.

In order to evaluate ET-1 receptor blockade with macitentan treatment we recorded blood pressure variation after ET-1 injection (1 ng/Kg, IV) in Zucker fa/fa rats either untreated or treated with macitentan for 7 or 90 days. As expected ET-1 injection led to a transient blood pressure reduction followed by a sustained blood pressure increase (-39 mmHg and +18 mmHg compared to baseline) in 13 week-old rats. Macitentan administration (10 mg/kg/day, p.o.) for 7 days abolished ET-1-related blood pressure variations. Same results

were obtained in 24 week-old rats (Table 2). In addition, both short-and long-term macitentan treatment increased plasma ET-1 concentrations (Table 3).

Table 2. ET_A-ET_B Receptor Blockade Assessment.

	Time	Zucker fa/fa	
		Untreated	Macitentan
Transient Systolic Blood Pressure Decrease (mm Hg)	D ₇	-39.3±0.2	-4.4±0.7†
	D ₉₀	-41.9±4.9	-1.7±1.1†
Sustained Systolic Blood Pressure Increase (mm Hg)	D ₇	18.0±1.2	4.8±1.4†
	D ₉₀	16.5±2.8	2.0±1.0†

Table 2: Blood pressure assessment after IV endothelin bolus administration (1 nmol.kg⁻¹) †: p<.05 vs untreated Zucker fa/fa.

Biological parameters of metabolic syndrome

Plasma triglycerides, HDL-C and nGal-3 were increased in 13 and 24 week-old untreated Zucker fa/fa rats when compared to age-matched lean rats, while NT-ProBNP was reduced and neither albumin, ET-1, creatinine nor LDL-C were modified (Table 3). Moreover, albuminuria was increased in 24-week old untreated Zucker fa/fa rats, while creatininuria was decreased. Short-term macitentan reduced plasma NT-ProBNP without modifying other biological parameters, while long-term macitentan increased LDL-C, but reduced triglycerides and albuminuria.

Cardiac genes expression.

LV tissue BNP gene expression was increased in 24 weeks old Zucker fa/fa rats, ANP and NOX 4 expressions were reduced, while SOD2, SOD1 or xanthine oxidase expressions were never modified. Only long-term macitentan modified gene expression, i.e. reduction in BNP and NOX4

gene	Time	Lean	Zucker fa/fa	
			Untreated	Macitentan
ANP	D ₇	1.26±0.12	1.09±0.16	1.03±0.18
	D ₉₀	0.46± 0.08	0.25±0.04*	0.32±0.04
BNP	D ₇	1.33±0.15	1.35±0.14	1.09±0.07
	D ₉₀	1.05±0.13	1.84±0.23*	1.03±0.13†
SOD 2	D ₇	1.38±0.10	1.58±0.17	1.55±0.14
	D ₉₀	0.30±0.06	0.19±0.06	0.32±0.01†
SOD 1	D ₇	1.08±0.07	1.26±0.14	1.17±0.04
	D ₉₀	0.78±0.09	0.78±0.13	0.79±0.06
NOX 4	D ₇	0.89±0.08	1.14±0.08	1.03±0.10
	D ₉₀	1.27±0.14	0.70±0.05*	0.56±0.04†
Xanthine Oxidase	D ₇	0.88±0.12	1.04±0.11	1.06±0.14
	D ₉₀	0.82±0.04	1.07±0.16	0.95±0.07

Table 4: LV Genic Expression

Cardiac relative expression of various mRNA in lean and Zucker fa/fa rats either untreated or treated with macitentan (D₇: n= 5 to 8 per group; D₉₀: n=4 to 6 per group) assessed by real-time quantitative PCR and normalized to 3 housekeeping genes (GAPDH, tubuline, EEF2).

*: p<.05 vs lean; †: p<.05 vs untreated Zucker fa/fa..

Table 3. Plasma and urinary biology

	Time	Lean	Zucker fa/fa	
			Untreated	Macitentan
Plasma Triglycerides (mg/dL)	D ₇	103±16	256±49*	312±18
	D ₉₀	119±13	406±40*	264±25†
Plasma HDL-C (mg/dL)	D ₇	56±2.9	91.3±5.7*	102.8±7.9
	D ₉₀	62±3.3	109.0±5.0*	117.3±3.4
Plasma LDL-C (mg/dL)	D ₇	23.2±1.5	21.9±4.4	23.4±1.7
	D ₉₀	32.7±4.1	43.4±4.3	56.2±4.4†
Plasma Albumin (g/dL)	D ₇	2.97±0.06	3.16±0.12	3.32±0.09
	D ₉₀	3.00±0.10	2.80±0.14	2.74±0.11
Plasma ET-1 (pg/mL)	D ₇	0.9±0.2	1.3±0.2	4.5±0.3 †
	D ₉₀	0.7±0.1	0.8±0.1	3.3±0.2 †
Plasma NT-proBNP (pg/mL)	D ₇	70.1±12	167±44*	55±20†
	D ₉₀	61±11	25.7±5*	26 ±4
Plasma nGal-3 (ng/mL)	D ₇	3.5±0.7	6.4±1.2*	7.5±1.3
	D ₉₀	2.9± 0.2	14.3±1.7*	14.7±1.9
Plasma Creatinine (mg/dL)	D ₇	0.43±0.02	0.47±0.04	0.41±0.03
	D ₉₀	0.46±0.02	0.47±0.02	0.49±0.01
Urinary Creatinine (µM/24h)	D ₇	-	-	-
	D ₉₀	1.23±0.05	1.08±0.05*	0.95±0.12
Urinary Albumin (mg/24h)	D ₇	-	-	-
	D ₉₀	169±40	633±119*	387±85

Table 3. Plasma and urinary biology.

Plasmatic level of several molecules in lean and Zucker fa/fa rats either untreated or treated with macitentan (D₇: n=3 to 7 per group; D₉₀: n=7 to 13 per group)

*: p<.05 vs lean; †: p<.05 vs untreated Zucker fa/fa.

Discussion

This study highlights for the first time that obese Zucker rats gradually develop not only LV diastolic dysfunction but also RV dysfunction and PH. This finding is of first importance as PH and RV failure are often due to LV failure in humans [12, 39] and particularly in patients with LV diastolic dysfunction [39-41]. Furthermore there is an association between HFpEF, metabolic syndrome and RV dysfunction [42].

Thus, obese Zucker rats are not only a very useful model to study HFpEF but also to study PH and RV dysfunction and to test pharmacological components. Beyond cardiac dysfunction, we also found, consistent with other publications [43, 44], an endothelial dysfunction in coronary arteries from obese Zucker rats.

Our results clearly demonstrate that ET-1 is involved in the development of RV, LV and vascular dysfunctions observed in obese Zucker rat as both short-term and chronic neutralization of ET-1 by the dual ERA macitentan improved cardiac and vascular functions. The ability of the macitentan 10mg/kg/day dose to block ETA and ETB receptors was demonstrated in our study since this dose 1) prevented ET-1-induced biphasic response: ETB-mediated blood pressure decrease, and ETA-mediated blood pressure increase changes and 2) increased ET-1 plasma concentrations which confirms functional blockade of ETB receptors, in agreement with other studies [45, 46].

Although it is clear that ERAs exert beneficial effects on PH [47] and RV remodeling [48], clinical trials on LV failure with ERAs have been disappointing [49]. However in the ENABLE study, death was non-significantly lower in the bosentan-treated group than in the placebo-treated group at the end of the study (160 vs 173 deaths) despite early fluid retention, while in experimental heart failure bosentan significantly improves long-term survival[37].

Thus, our experimental data, obtained in a rat model of HFpEF associated with RV dysfunction and PH, clearly suggest that dual ETAs probably exert beneficial effects on LV function and structure in Humans with HFpEF. Furthermore, it must be stressed that macitentan prevents the progression of HFpEF since at the moment of initiating treatment, the Zucker rat model exhibits only an early LV diastolic dysfunction with preserved systolic function and a more delayed RV systolic and diastolic dysfunction,

Our results clearly show that at least three different mechanisms may be involved in the beneficial effects of ET receptors blockade. First, reduction of ET-1-mediated vasoconstriction [15] induces both an immediate and a sustained reduction of systolic and diastolic BP and of LV EDPVR, participating to the improvement of LV diastolic function. This mechanism could also explain the decrease in RV ESP. Second, obesity but also ET-1 are known to induce ROS production [50, 51]; and ET-1 blockade resulted in a reduced LV oxidative stress as observed by the reduction of ROS levels after both short- and long-term treatment. Furthermore, reducing ROS production and consequently oxidative stress could participate to the improvement of LV diastolic function by enhancing LV relaxation. Indeed oxidative stress has been involved in abnormal Ca²⁺ handling thus impairing myocytes relaxation [52]. ROS overproduction has also been associated to exaggerate collagen deposition [53, 54] which is known to decrease compliance. Hence, reduction of ROS levels by ET receptors blockade could partially explain the reduction of LV collagen deposition observed after long-term macitentan treatment. Overall, prevention of cardiac fibrosis development strongly contributed to the improvement of LV function observed after long-term macitentan treatment, as observed with other drugs[33, 55, 56]. The third mechanism involved in the improvement of LV diastolic dysfunction could be an increase in nitric oxide (NO) bioavailability, as suggested by our results on improved coronary relaxation. Both experimental and clinical data demonstrate that NO donors or eNOS enhancers reduced LV

diastolic dysfunction or LV remodeling [57, 58]. In addition, the decrease in ROS levels could also participate to the increase in NO bioavailability.

Beyond the beneficial effects on cardiac dysfunction, our results show that macitentan prevents coronary dysfunction, illustrated by the restoration of endothelium-dependent relaxation. This may partly be the consequence of the reduction of vascular ROS production and the subsequent increase in vascular NO bioavailability. Furthermore restoration of endothelium-dependent relaxation occurs with both short- and long-term macitentan treatments, suggesting that it may be at least partly a direct effect, independent of the improved cardiac function. Interestingly, even if right coronary function was less impaired than left function, macitentan also improved right coronary endothelium-dependent relaxation.

The restoration of coronary relaxation could indirectly contribute to the improvement of both right and left ventricular functions, and to the reduced PH. Indeed, both short- and long-term macitentan increased LV perfusion, probably leading to reduced tissue hypoxia. It has been shown that hypoxia induces ROS production through several mechanisms such as activation of NADPH oxidase, decrease in eNOS-to-iNOS ratio or production of local pro-inflammatory cytokines [59, 60]. Furthermore ET-1 itself exerts pro-inflammatory actions [61]. We did not measure inflammatory cytokines but we observed a reduction in the number of cardiac pro-inflammatory M1 macrophages after long-term treatment suggesting a decrease in inflammatory signals. Thus, the increase in myocardial perfusion could contribute to the decrease in ROS production and its consequences.

In conclusion, in a rat model of HFpEF associated with PH, dual ET receptor blockade with macitentan was associated with reduced PH, and improvement of both cardiac and coronary function. This suggests that macitentan, already used to treat isolated PH in humans [47, 62], might also exert beneficial cardiac and vascular effects in HFpEF associated with PH and thus seems to be a promising approach for HFpEF.

Acknowledgments

The authors thank Daniel Strasse and Herve Farine for their excellent technical assistance. This work was funded by a research grant from Actelion Pharmaceuticals Ltd., Allschwil, Switzerland, and co-supported by the European Union and the Région Normandie. (Europe gets involved in Normandy with European Regional Development Fund; ERDF), the European Fibro-Targets Project (grant agreement No. FP7#602904), the FP7-funded COST ADMIRE network (BM1301) and the Fédération Française de Cardiologie

References

1. Fang, J.C., et al., **World Health Organization Pulmonary Hypertension group 2: pulmonary hypertension due to left heart disease in the adult--a summary statement from the Pulmonary Hypertension Council of the International Society for Heart and Lung Transplantation.** *J Heart Lung Transplant.* 31(9): p. 913-33.
2. Kjaergaard, J., et al., Prognostic importance of pulmonary hypertension in patients with heart failure. *Am J Cardiol.* 2007. 99(8): p. 1146-50.
3. Lam, C.S., et al., Pulmonary hypertension in heart failure with preserved ejection fraction: a community-based study. *J Am Coll Cardiol.* 2009. 53(13): p. 1119-26.
4. Flores, E.D., R.A. Lange, and L.D. Hillis, Relation of mean pulmonary arterial wedge pressure and left ventricular end-diastolic pressure. *Am J Cardiol.* 1990. 66(20): p. 1532-3.
5. Hemnes, A.R. and H.C. Champion, Right heart function and haemodynamics in pulmonary hypertension. *Int J Clin Pract Suppl.* 2008(160): p. 11-9.

6. Saggarr, R., et al., Changes in right heart haemodynamics and echocardiographic function in an advanced phenotype of pulmonary hypertension and right heart dysfunction associated with pulmonary fibrosis. *Thorax*. 69(2): p. 123-9.
7. Tsioufis, C., et al., Hypertension and Heart Failure with Preserved Ejection Fraction: Connecting the Dots. *Curr Vasc Pharmacol*, 2017. 16(1): p. 15-22.
8. Warbrick, I. and S.W. Rabkin, Hypoxia-inducible factor 1-alpha (HIF-1alpha) as a factor mediating the relationship between obesity and heart failure with preserved ejection fraction. *Obes Rev*, 2019. 20(5): p. 701-712.
9. Borlaug, B.A. and W.J. Paulus, Heart failure with preserved ejection fraction: pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Eur Heart J*, 2011. 32(6): p. 670-9.
10. Figtree, G.A., et al., Effects of Canagliflozin on Heart Failure Outcomes Associated with Preserved and Reduced Ejection Fraction in Type 2 Diabetes: Results from the CANVAS Program. *Circulation*, 2019.
11. von Bibra, H. and M. St John Sutton, Diastolic dysfunction in diabetes and the metabolic syndrome: promising potential for diagnosis and prognosis. *Diabetologia*, 2010. 53(6): p. 1033-45.
12. Rosenkranz, S., et al., Left ventricular heart failure and pulmonary hypertension. *Eur Heart J*. 37(12): p. 942-54.
13. Kogan, J., et al., [Etiology of severe pulmonary hypertension--possible role of metabolic syndrome]. *Harefuah*. 151(7): p. 405-8, 436.
14. Ussavarungsi, K., C.S. Thomas, and C.D. Burger, Prevalence of metabolic syndrome in patients with pulmonary hypertension. *Clin Respir J*. 11(6): p. 721-726.
15. Yanagisawa, M., et al., A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, 1988. 332(6163): p. 411-415.
16. Zolk, O., et al., Expression of endothelin-1, endothelin-converting enzyme, and endothelin receptors in chronic heart failure. *Circulation*, 1999. 99(16): p. 2118-23.
17. Guarda, E., et al., Effects of endothelins on collagen turnover in cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res*, 1993. 27(12): p. 2130-4.
18. Martos, R., et al., Diastolic heart failure: evidence of increased myocardial collagen turnover linked to diastolic dysfunction. *Circulation*, 2007. 115(7): p. 888-95.
19. Moreo, A., et al., Influence of myocardial fibrosis on left ventricular diastolic function: noninvasive assessment by cardiac magnetic resonance and echo. *Circ Cardiovasc Imaging*, 2009. 2(6): p. 437-43.
20. Choudhary, G., et al., Bosentan attenuates right ventricular hypertrophy and fibrosis in normobaric hypoxia model of pulmonary hypertension. *J Heart Lung Transplant*. 30(7): p. 827-33.
21. Iglarz, M., et al., Comparison of Macitentan and Bosentan on Right Ventricular Remodeling in a Rat Model of Non-vasoreactive Pulmonary Hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol*. 66(5): p. 457-67.
22. Mouchaers, K.T., et al., Fasudil reduces monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension: comparison with bosentan and sildenafil. *Eur Respir J*. 36(4): p. 800-7.
23. Chin, K.M., et al., Changes in right ventricular structure and function assessed using cardiac magnetic resonance imaging in bosentan-treated patients with pulmonary arterial hypertension. *Am J Cardiol*, 2008. 101(11): p. 1669-72.
24. Kim, H., et al., A comparison of echocardiographic variables of right ventricular function with exercise capacity after bosentan treatment in patients with pulmonary arterial hypertension: Results from a multicenter, prospective, cohort study. *J Clin Ultrasound*. 45(1): p. 28-34.
25. Surie, S., et al., Bosentan treatment is associated with improvement of right ventricular function and remodeling in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Clin Cardiol*. 36(11): p. 698-703.
26. Pulido, T., L.J. Rubin, and G. Simonneau, Macitentan and pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med*, 2014. 370(1): p. 82-3.
27. Braga, V.A. and N.R. Prabhakar, Refinement of telemetry for measuring blood pressure in conscious rats. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 2009. 48(3): p. 268-71.
28. Mulder, P., et al., Selective endothelin-A versus combined endothelin-A/endothelin-B receptor blockade in rat chronic heart failure. *Circulation*, 2000. 102(5): p. 491-493.
29. Nahrendorf, M., et al., Time course of right ventricular remodeling in rats with experimental myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003. 284(1): p. H241-8.
30. Waller, C., et al., Myocardial perfusion imaging using a non-contrast agent MR imaging technique. *Int J Cardiovasc Imaging*, 2001. 17(2): p. 123-32.
31. Kober, F., et al., Myocardial blood flow mapping in mice using high-resolution spin labeling magnetic resonance imaging: influence of ketamine/xylazine and isoflurane anesthesia. *Magn Reson Med*, 2005. 53(3): p. 601-6.
32. Fang, Y., et al., Improvement of left ventricular diastolic function induced by beta-blockade A comparison between nebivolol and metoprolol. *J Mol Cell Cardiol*, 2011. 51(2): p. 168-76.

33. Mulder, P., et al., Aldosterone synthase inhibition improves cardiovascular function and structure in rats with heart failure: a comparison with spironolactone. *Eur Heart J*, 2008. 29: p. 2171-2179.
34. Barbay, V., et al., Role of M2-like macrophage recruitment during angiogenic growth factor therapy. *Angiogenesis*, 2015. 18(2): p. 191-200.
35. Mellin, V., et al., Transient reduction in myocardial free oxygen radical levels is involved in the improved cardiac function and structure after long-term allopurinol treatment initiated in established chronic heart failure. *Eur.Heart J.*, 2005. 26(15): p. 1544-1550.
36. Richard, V., et al., Ischemic preconditioning protects against coronary endothelial dysfunction induced by ischemia and reperfusion. *Circulation*, 1994. 89(3): p. 1254-61.
37. Mulder, P., et al., Role of endogenous endothelin in chronic heart failure: effect of long- term treatment with an endothelin antagonist on survival, hemodynamics, and cardiac remodeling. *Circulation*, 1997. 96(6): p. 1976-1982.
38. Merabet, N., et al., Selective Heart Rate Reduction Improves Metabolic Syndrome-related Left Ventricular Diastolic Dysfunction. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2015. 66(4): p. 399-408.
39. Thenappan, T., et al., Pulmonary hypertension secondary to heart failure with preserved ejection fraction. *Can J Cardiol*. 31(4): p. 430-9.
40. Raina, A., et al., Pulmonary hypertension is a manifestation of congestive heart failure and left ventricular diastolic dysfunction in octogenarians with severe aortic stenosis. *Pulm Circ*. 5(3): p. 521-6.
41. Rawat, D.K., et al., Increased reactive oxygen species, metabolic maladaptation, and autophagy contribute to pulmonary arterial hypertension-induced ventricular hypertrophy and diastolic heart failure. *Hypertension*. 64(6): p. 1266-74.
42. Karakurt, O., et al., Impaired right ventricular functions in metabolic syndrome patients with preserved left ventricular ejection fraction. *Turk Kardiyol Dern Ars*. 39(7): p. 549-56.
43. Nishimatsu, H., et al., Endothelial dysfunction and hypercontractility of vascular myocytes are ameliorated by fluvastatin in obese Zucker rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005. 288(4): p. H1770-6.
44. Oltman, C.L., et al., Progression of coronary and mesenteric vascular dysfunction in Zucker obese and Zucker diabetic fatty rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006. 291(4): p. H1780-7.
45. Loffler, B.M., V. Breu, and M. Clozel, Effect of different endothelin receptor antagonists and of the novel non-peptide antagonist Ro 46-2005 on endothelin levels in rat plasma. *FEBS Lett*, 1993. 333(1-2): p. 108-10.
46. Iglarz, M., et al., Pharmacology of macitentan, an orally active tissue-targeting dual endothelin receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther*, 2008. 327(3): p. 736-45.
47. Pulido, T., et al., Macitentan and morbidity and mortality in pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med*, 2013. 369(9): p. 809-18.
48. Nielsen, E.A., et al., Dual Endothelin Receptor Blockade Abrogates Right Ventricular Remodeling and Biventricular Fibrosis in Isolated Elevated Right Ventricular Afterload. *PLoS One*. 11(1): p. e0146767.
49. Packer, M., et al., Long-Term Effect of Endothelin Receptor Antagonism With Bosentan on the Morbidity and Mortality of Patients With Severe Chronic Heart Failure: Primary Results of the ENABLE Trials. *JACC Heart Fail*. 5(5): p. 317-326.
50. Wedgwood, S., R.W. Dettman, and S.M. Black, ET-1 stimulates pulmonary arterial smooth muscle cell proliferation via induction of reactive oxygen species. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2001. 281(5): p. L1058-67.
51. Furukawa, S., et al., Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest*, 2004. 114(12): p. 1752-61.
52. Kuster, G.M., et al., Redox-mediated reciprocal regulation of SERCA and Na⁺-Ca²⁺ exchanger contributes to sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ depletion in cardiac myocytes. *Free Radic Biol Med*. 48(9): p. 1182-7.
53. Zhao, W., et al., Oxidative stress mediates cardiac fibrosis by enhancing transforming growth factor-beta1 in hypertensive rats. *Mol Cell Biochem*, 2008. 317(1-2): p. 43-50.
54. Siwik, D.A., P.J. Pagano, and W.S. Colucci, Oxidative stress regulates collagen synthesis and matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2001. 280(1): p. C53-60.
55. Mulder, P., et al., Long-term heart rate reduction induced by the selective I(f) current inhibitor ivabradine improves left ventricular function and intrinsic myocardial structure in congestive heart failure. *Circulation*, 2004. 109(13): p. 1674-1679.
56. Harouki, N., et al., The IL-1beta Antibody Gevokizumab Limits Cardiac Remodeling and Coronary Dysfunction in Rats With Heart Failure. *JACC Basic Transl Sci*, 2017. 2(4): p. 418-430.
57. Fraccarollo, D., et al., Improvement in left ventricular remodeling by the endothelial nitric oxide synthase enhancer AVE9488 after experimental myocardial infarction. *Circulation*, 2008. 118(8): p. 818-27.
58. Matter, C.M., et al., Effect of NO donors on LV diastolic function in patients with severe pressure-overload hypertrophy. *Circulation*, 1999. 99(18): p. 2396-2401.

59. Serpillon, S., et al., Superoxide production by NAD(P)H oxidase and mitochondria is increased in genetically obese and hyperglycemic rat heart and aorta before the development of cardiac dysfunction. The role of glucose-6-phosphate dehydrogenase-derived NADPH. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009. 297(1): p. H153-62.
60. Rosen, P. and A. Osmers, Oxidative stress in young Zucker rats with impaired glucose tolerance is diminished by acarbose. *Horm Metab Res*, 2006. 38(9): p. 575-86.
61. Browatzki, M., et al., Endothelin-1 induces interleukin-6 release via activation of the transcription factor NF-kappaB in human vascular smooth muscle cells. *Basic Res Cardiol*, 2000. 95(2): p. 98-105.
62. Monaco, T.J. and C.D. Davila, Safety, efficacy, and clinical utility of macitentan in the treatment of pulmonary arterial hypertension. *Drug Des Devel Ther.* 10: p. 1675-82.

Discussion générale

Les objectifs de ce travail de thèse étaient d'étudier les effets de trois composés pharmacologiques dans la dysfonction cardiovasculaire associée au SM et plus particulièrement sur la dysfonction VG diastolique et la dysfonction endothéliale centrale et périphérique. Chacun de ces trois composés pharmacologiques ciblait un système biologique activé de manière pathologique ou dysfonctionnant dans les complications cardiovasculaires associées au SM à savoir le récepteur minéralocorticoïde, le système endothélinergique et la dysfonction mitochondriale.

Ce travail a permis de mettre en évidence que les dysfonctions diastolique et endothéliale associées au SM sont d'origine multifactorielle puisqu'elles ont été améliorées par l'utilisation de trois molécules ciblant chacune un système biologique dans notre modèle de SM.

Ainsi dans les études à court terme (7 jours) et chroniques (3 mois) l'inhibition du système endothélinergique par le macitentan, du récepteur minéralocorticoïde par la finérénone et la diminution de la dysfonction mitochondriale par l'iméglimine ont permis une amélioration des dysfonctions cardiovasculaires observées chez les rats Zucker *fa/fa*.

Il est important de noter que l'amélioration de la dysfonction VG diastolique et de la fonction endothéliale a été observée dans nos études malgré la persistance de l'hypertension artérielle. En effet seul le traitement avec le macitentan a entraîné une diminution de la PA alors que les améliorations cardiovasculaires ont été retrouvées dans les trois études. Ainsi des mécanismes indépendants de la pression artérielle sont certainement impliqués dans l'amélioration de la fonction VG diastolique et endothéliale. Parmi les mécanismes impliqués, la diminution de production d'EROs nous semble tout particulièrement intéressante puisqu'elle a été retrouvée dans les trois études et peut expliquer l'amélioration de la fonction diastolique et de la fonction endothéliale.

Rôle du stress oxydant dans la dysfonction cardiovasculaire associée au syndrome métabolique :

Le SM et l'IC sont deux pathologies pour lesquelles on retrouve une augmentation de la production d'EROs. Le stress oxydant est de plus associé non seulement à chaque critère

individuel du SM mais aussi avec la survenue de complications cardiovasculaires associées à ce syndrome²⁴⁸.

Dans nos études nous avons trouvés une augmentation de la production d'EROs au niveau cardiaque chez le rat Zucker *fa/fa* ainsi qu'une diminution des nitrites plasmatiques suggérant une diminution globale de la biodisponibilité en NO²⁴⁹. Nos résultats sont confortés par d'autres équipes qui montrent une augmentation des EROs dans le cœur²⁵⁰, le rein²⁵¹ et les vaisseaux^{225,252} dans ce modèle. Il existe plusieurs sources de production d'EROs et d'ERNs dans les cellules, telles que la NADPH oxydase, la NOSe découplée et la mitochondrie qui peuvent provoquer un stress oxydant. Dans ce modèle il a également été montré que l'activation du RM²⁵³ et l'endothéline²⁵⁴ entraîne une production d'EROs par les NADPH oxydases participant à la dysfonction cardiaque et vasculaire. Ainsi nous pouvons suggérer que dans nos études avec les antagonistes du RM et des récepteurs ET_A-ET_B la diminution de production d'EROs est imputable à une diminution de l'activité de la NADPH oxydase bien que nous ne l'ayons pas démontré.

Notre étude avec l'iméglimine a en outre permis de mettre en évidence une implication des EROs mitochondriaux dans l'établissement des dysfonctions cardiovasculaires dans notre modèle de SM. En effet après 1h de traitement, l'iméglimine a permis de diminuer la production mitochondriale d'EROs et cela était associé à une amélioration non seulement de la fonction diastolique et de la fonction endothéliale mais aussi de la perfusion coronaire. Ainsi les EROs provenant des NADPH oxydases mais aussi des mitochondries seraient impliqués dans la dysfonction endothéliale et cardiaque observée chez le Zucker *fa/fa*. Cependant nous n'avons pas déterminé dans cette étude si la production d'EROs par d'autres enzymes (NADPH oxydase, XO, NOSe découplée) était également diminuée et participait aux améliorations fonctionnelles. Nous pouvons néanmoins suggérer qu'une diminution de la production d'EROs au niveau mitochondrial peut limiter le « ROS induced ROS release » et limiter la production d'EROs par d'autres systèmes.

Ainsi dans nos trois études les traitements, en diminuant la production d'EROs, ont certainement permis de briser le cercle vicieux d'une part en restaurant la biodisponibilité en NO et d'autre part en évitant une sur-activation des systèmes neurohormonaux pro-vasoconstricteurs et oxydants (SRAA, ET-1). La préservation de la fonction endothéliale coronaire mais aussi périphérique *via* la réduction du stress oxydant participerait à la

diminution des dysfonctions VG comme cela a été montré dans différents modèles animaux^{107,255}.

Il faut souligner que nos traitements ne permettent pas de restaurer un niveau d'EROs observé chez les animaux *lean* suggérant que le stress oxydant, bien que limité, perdure.

Nous pouvons suggérer qu'une combinaison entre deux traitements ciblant chacun la production d'EROs soit par la mitochondrie soit par la NADPH oxydase pourrait avoir un effet synergique sur la diminution du stress oxydant. Nous pouvons supposer qu'une telle association puisse exercer un effet bénéfique plus marqué sur la dysfonction cardiaque.

Rôle des comorbidités dans la dysfonction cardiovasculaire associée au syndrome métabolique :

Les comorbidités retrouvées dans l'ICFEp exacerbent la survenue de complications cardiovasculaires et peuvent influencer le pronostic. Il nous a semblé intéressant d'évaluer si nos molécules, de par leurs actions respectives sur des cibles biologiques, permettaient au-delà des améliorations cardiovasculaires de limiter certaines de ces comorbidités. Nous nous sommes particulièrement intéressés à la dysfonction rénale avec la finérénone, aux perturbations du métabolisme glucidique avec l'iméglimine et à l'hypertension artérielle pulmonaire avec le macitentan.

La dysfonction rénale

Chez l'homme la dysfonction rénale est retrouvée chez plus de 30% des patients IC et jusqu'à 60% des patients ICFEp²⁵⁶ et est associée à un mauvais pronostic²⁵⁷. La progression de la dysfonction rénale est déterminée par le taux de filtration glomérulaire ainsi que par la protéinurie dont l'augmentation est associée à un mauvais pronostic²⁵⁸. De plus chaque composant du SM étant associé à l'insuffisance rénale chronique²⁵⁹ la prévalence de cette dernière est probablement sous-estimée chez les personnes associant ICFEp et SM.

En ce qui concerne les mécanismes impliqués dans l'établissement de la dysfonction rénale on retrouve ceux déjà exacerbés dans l'ICFEp associée au syndrome métabolique tel que le stress oxydant, l'inflammation et l'accumulation de collagène.

Une dysfonction rénale s'aggravant avec l'âge a été rapportée chez le rat Zucker *fa/fa* par plusieurs équipes^{242,260-262} et a été objectivée dans notre étude par une protéinurie

présente dès l'âge de 13 semaines et aggravée à l'âge de 24 semaines. Nous avons également retrouvé une augmentation de l'expression du gène codant pour la protéine nGAL (Neutrophil gelatinase-associated lipocalin), un marqueur de lésion rénale aigue²⁶³ et plus particulièrement d'origine ischémique ou inflammatoire²⁶⁴ chez les animaux âgés de 24 semaines. Ainsi chez le rat Zucker la dysfonction rénale serait la conséquence d'une combinaison entre une atteinte glomérulaire et une inflammation ou ischémie rénale.

La finérénone a déjà montré, contrairement aux autres ARMs, des effets bénéfiques sur la fonction rénale aussi bien chez l'homme présentant une dysfonction rénale modérée associée à l'IC¹⁸³ ou une néphropathie diabétique²⁶⁵ que dans deux modèles de rat¹⁸². Ainsi nous pouvons émettre l'hypothèse que la finérénone puisse être bénéfique sur la dysfonction rénale observée dans notre modèle. Le traitement à long-terme par la finérénone a permis de diminuer la protéinurie et l'expression génique de *NGAL* suggérant une moindre atteinte glomérulaire ainsi qu'une réduction de l'inflammation/ischémie rénale. De manière intéressante ni la perfusion ni la résistance vasculaire rénale ne sont modifiées par la finérénone utilisée à une dose de baissant pas la pression artérielle suggérant l'implication d'un autre mécanisme dans ces améliorations. Une étude montre une implication des EROs dans l'établissement de la sclérose glomérulaire et la protéinurie chez le rat Zucker *fa/fa*²⁶⁶. Etant donné que la distribution tissulaire de la finérénone est semblable dans le cœur et le rein¹⁸² il est possible que la finérénone exerce dans le rein des effets similaires à ceux observés dans le cœur. Ainsi on peut suggérer que cet ARM diminue le stress oxydant au niveau rénal et l'accumulation de collagène (comme dans le cœur) limitant ainsi la glomérulosclérose et par conséquence la protéinurie²⁶⁷. Une diminution du stress oxydant rénal pourrait également expliquer la diminution d'expression de *NGAL*²⁶⁸ chez les rats traités avec la finérénone.

Notre étude montre qu'au-delà de ses effets bénéfiques sur la dysfonction cardiovasculaire la finérénone semble offrir une protection rénale, ce qui pourrait participer à l'amélioration fonctionnelle cardiaque et ainsi former un cercle vertueux.

Concernant l'étude avec l'iméglimine nous avons émis l'hypothèse que la molécule pouvait améliorer la dysfonction rénale chez le rat Zucker *fa/fa* via une modulation de l'insulinorésistance et de l'hyperglycémie. Dans cette étude une augmentation de l'albuminurie a été observée chez les animaux non traités ainsi qu'une altération structurelle rénale tubulaire et glomérulaire avec, au niveau interstitiel, une accumulation de collagène

et une inflammation. Le traitement par l'iméglimine a entraîné une diminution mais pas une normalisation de l'albuminurie ainsi que de la fibrose sans d'effets significatifs sur les altérations structurelles et l'inflammation. Cette amélioration partielle de la structure/fonction rénale peut-être expliquée par différentes manières. Premièrement l'hypertension artérielle retrouvée chez le rat Zucker n'est pas diminuée par l'iméglimine et contribue certainement à la néphropathie. Deuxièmement malgré une augmentation plasmatique des nitrites, suggérant une augmentation systémique de la biodisponibilité en NO et donc une réduction du stress oxydant, on ne connaît pas le statut oxydatif du rein. En effet, contrairement à l'étude avec la finérénone, on ne connaît pas la distribution tissulaire de l'iméglimine et par conséquent son action au niveau rénal qui de plus n'est pas un organe insulinosensible. Enfin, le rat Zucker est résistant à la leptine qui est impliquée dans la prolifération de cellules endothéliales glomérulaires et dans la protéinurie²⁶⁹. On peut supposer que l'iméglimine ne modifie pas la résistance à la leptine qui continuerait alors à participer à la dysfonction rénale.

Pour conclure sur le rôle de l'iméglimine dans la dysfonction rénale, le rat Zucker du fait de sa résistance à la leptine n'est peut-être pas le meilleur modèle pour évaluer un potentiel effet néproprotecteur de l'iméglimine. Néanmoins l'iméglimine a permis de diminuer l'albuminurie qui reste un marqueur pronostic dans l'insuffisance rénale et l'IC.

Perturbation du métabolisme glucidique

Chez l'homme l'hyperglycémie et l'insulinorésistance participent à l'établissement des dysfonctions cardiaque et endothéliale chez les patients avec une ICfEp associée au SM. L'implication des hyperglycémies post-prandiales prolongées dans l'établissement de ces dysfonctions a été établie même en présence d'une glycémie à jeun normale et notamment via une augmentation du stress oxydant²⁷⁰.

Le modèle de rat Zucker *fa/fa* est connu pour présenter un état pré-diabétique avec une insulinorésistance et une intolérance au glucose sans hyperglycémie à jeun. Nous avons retrouvé dans cette étude cet état pré-diabétique avec une hyperinsulinémie, une glycémie à jeun semblable à celle des rats *lean* et une intolérance au glucose. Nous avons voulu évaluer si la restauration de la sensibilité à l'insuline et au glucose par l'iméglimine pouvait induire des améliorations de la fonction cardio-vasculaire dans ce modèle. Notre étude a révélé que l'iméglimine restaure la fonction endothéliale et diminue la dysfonction

cardiaque mais étonnamment dans notre modèle les perturbations du métabolisme glucidique étaient peu améliorées. En effet malgré une diminution de l'intolérance au glucose la tolérance à l'insuline n'a pas été améliorée par l'iméglimine. Plusieurs facteurs peuvent expliquer ces résultats comme le fait que l'iméglimine ne modifie ni le poids ni la composition corporelle des animaux. D'autre part une étude suggère que la molécule agit uniquement en situation d'hyperglycémie en amplifiant le signal insuline²³⁴ expliquant l'absence d'amélioration chez des animaux avec une glycémie à jeun normale. De plus la résistance à la leptine présente chez ces animaux ainsi que leur hyperinsulinémie limite l'interprétation des résultats des tests de tolérance à l'insuline et au glucose. Ainsi dans cette étude les améliorations cardiovasculaires seraient indépendantes du métabolisme glucidique et proviendraient principalement de la capacité de l'iméglimine à diminuer le stress oxydant mitochondrial. Cependant on peut suggérer qu'une diminution chronique du temps et des amplitudes des hyperglycémies post-prandiales avec l'iméglimine puisse participer sur le long-terme aux effets cardiovasculaires.

L'hypertension pulmonaire et la dysfonction ventriculaire droite

Chez l'homme l'HTP et la dysfonction VD sont très présentes chez les sujets ICfEp et d'autant plus chez ceux présentant un SM et aggravent le pronostic. En 2013 un médicament, le macitentan, a pour la première fois permis de diminuer la mortalité dans l'HTP pré-capillaire mais ses effets sur l'HTP post-capillaire ne pas connus.

Une étude préliminaire dans le laboratoire (non publiée) ayant suggéré la présence d'une HTP chez le rat Zucker *fa/fa* il semblait intéressant d'évaluer les effets du macitentan dans ce modèle non seulement sur les dysfonctions cardiaques gauche mais aussi sur l'HTP et la dysfonction VD.

Notre étude a confirmé la présence d'une HTP chez le rat Zucker *fa/fa* âgé de 24 semaines ainsi qu'une dysfonction VD diastolique et systolique qui a été corrigée par le macitentan. Nous pouvons suggérer que ces améliorations proviennent à la fois des actions directes du macitentan au niveau pulmonaire et VD et de ses actions au niveau VG limitant l'augmentation passive de pression dans les veines pulmonaires et rompant le cercle vicieux.

Ainsi le macitentan dans un contexte d'ICfEp associée au SM permet de prévenir l'HTP post-capillaire et les dysfonctions VD ce qui pourrait être associé à une augmentation de la survie.

Rôle des doses de médicaments sur nos résultats

Concernant les médicaments utilisés dans ces études nous pouvons nous demander si les doses et les moyens d'administration utilisés étaient optimaux pour obtenir des améliorations marquées des dysfonctions cardiovasculaires dans ce contexte de SM. La première question concerne le mélange du traitement avec de la nourriture en poudre chez les animaux pour les études avec la finérénone et le macitentan. Ce mode d'administration étale la prise du médicament sur toute la journée puisque les Zucker *fa/fa* mangent aussi bien le jour que la nuit ce qui peut diminuer la concentration plasmatique du traitement et donc potentiellement ses effets. De plus ce mode d'administration n'est pas compatible avec un traitement chez l'homme et il serait donc intéressant d'évaluer les effets de ces médicaments lors d'une prise unique ou lors de deux prises par jour.

Concernant la finérénone une étude précédente a montré que la dose de 1 mg/kg permettait d'obtenir des effets positifs sur la fibrose, la protéinurie ainsi que les niveaux de TGF- β ¹⁸². A cette dose la finérénone n'exerce pas d'effet antihypertenseur ce qui correspond à la clinique puisque chez l'homme les ARMs ont des effets bénéfiques indépendamment de changements dans la PA¹⁶⁶. Cependant dans ces essais cliniques les ARMs sont utilisés en addition des traitements standards (IEC, bêtabloquants, ARAII etc.) qui eux permettent un contrôle de la PA.

Nous avons utilisés une dose de 2 mg/kg/j qui n'a pas eu d'effet sur la PA, par conséquent même si les animaux jeunes (13 semaines) avaient une PA « physiologique » les animaux âgés de 24 semaines étaient hypertendus. Ainsi on peut suggérer qu'avec une dose de finérénone permettant le contrôle de l'HTA, la dysfonction cardiaque aurait peut-être été plus fortement améliorée voire restaurée. De même une dose différente de finérénone aurait peut-être permis d'empêcher la protéinurie qui a été diminuée mais pas normalisée.

Concernant l'étude avec l'iméglimine, la dose utilisée dans notre étude (150 mg/kg/BID) a été choisie sur la base d'une étude précédente montrant que cette dose permet de normaliser les tests de tolérance au glucose et à l'insuline sur des souris C57BL/6 et des rats Sprague Dawley rendus insulino-résistant par un régime riche en graisse et en fructose²³⁴. Les études pharmacocinétiques ont montrées que la demi-vie de l'iméglimine est comprise entre 12 et 20 heures et que ses effets sont visibles après une heure, l'administration du traitement par gavage matin et soir permettait donc d'avoir une couverture sur l'ensemble de la journée. Avec cette dose les fonctions vasculaires centrales

et périphériques sont restaurées alors que la fonction cardiaque est améliorée mais pas restaurée. On peut alors se demander si la dose et/ou le moyen d'administration sont les plus adaptés pour obtenir des effets cardiaques.

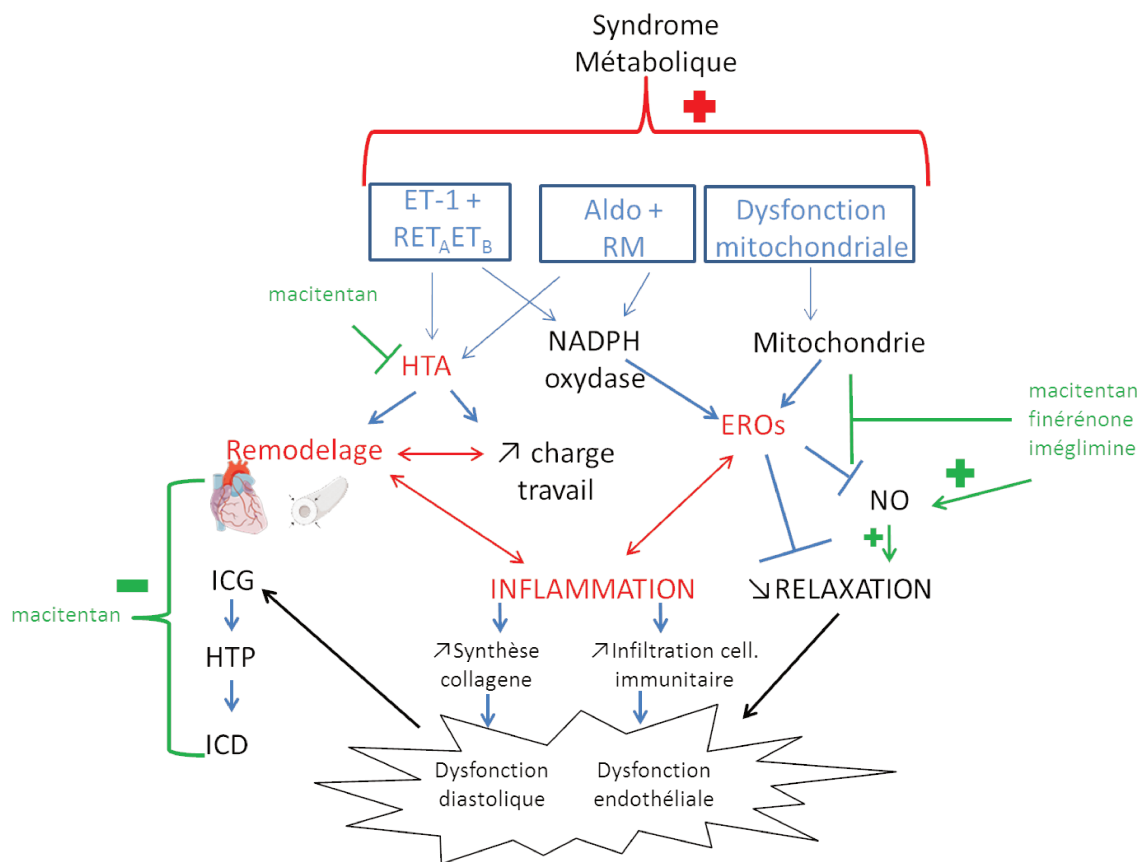


Figure 17 : Vue d'ensemble du rôle de nos traitements dans l'ICFp associée au SM.

Dans l'ICFp une activation du système endothélinergique, du système aldostérone-récepteur minéralocorticoïde ainsi qu'une dysfonction endothéliale entraînent une production excessive d'espèces réactives de l'oxygène (EROs) à l'origine d'une diminution de la relaxation vasculaire et cardiaque ainsi que d'une inflammation entraînant un remodelage participant à ces dysfonctions. L'activation du système endothélinergique et du système aldostérone-récepteur minéralocorticoïde est aussi associé à une hypertension artérielle (HTA) participant au remodelage cardiaque et vasculaire menant à terme à une insuffisance cardiaque. Les 3 traitements utilisés ont permis d'améliorer les dysfonctions cardiaque et vasculaire *via* une diminution de la production d'EROs, le macitentan a permis en outre de s'opposer à l'hypertension pulmonaire (HTP) et à l'insuffisance cardiaque droite (ICD).

Conclusions

Nos travaux ont pu mettre en évidence une augmentation du stress oxydant associé aux dysfonctions cardiaques et vasculaires dans un modèle d'ICFep associé au SM. Néanmoins nous ne savons pas si le stress oxydant participe à l'établissement de ces dysfonctions ou en est la conséquence.

Cependant les thérapeutiques permettant d'empêcher ce stress oxydant semblent prometteuses dans cette pathologie. Le macitentan, la finérénone et l'iméglimine sont des traitements d'autant plus intéressants qu'ils permettent de diminuer le stress oxydant tout en améliorant certaines comorbidités associées à l'ICFep et au SM.

Revue Bibliographique

1. Borlaug, B. A. & Redfield, M. M. Diastolic and systolic heart failure are distinct phenotypes within the heart failure spectrum. *Circulation* **123**, 2006–2013; discussion 2014 (2011).
2. Lewis, E. F. et al. Predictors of late development of heart failure in stable survivors of myocardial infarction: the CARE study. *J. Am. Coll. Cardiol.* **42**, 1446–1453 (2003).
3. Khatibzadeh, S., Farzadfar, F., Oliver, J., Ezzati, M. & Moran, A. Worldwide risk factors for heart failure: A systematic review and pooled analysis. *Int. J. Cardiol.* **168**, 1186–1194 (2013).
4. Levy, D. et al. Long-Term Trends in the Incidence of and Survival with Heart Failure. *N. Engl. J. Med.* **347**, 1397–1402 (2002).
5. Roger, V. L. et al. Trends in heart failure incidence and survival in a community-based population. *JAMA* **292**, 344–350 (2004).
6. Gabet, A., Agathe Lamarche-Vadel & Francis Chin. Mortalité due à l'insuffisance cardiaque en France, évolutions 2000-2010. (2014). Available at: http://invs.santepubliquefrance.fr/beh/2014/21-22/2014_21-22_3.html. (Accessed: 26th September 2018)
7. Delahaye, F., de Gevigney, G., Gaillard, S. & Cheneau, E. [Epidemiology and economic impact of heart failure in France]. *Arch. Mal. Coeur Vaiss.* **91**, 1307–1314 (1998).
8. Ponikowski, P. et al. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failureThe 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 (2016).
9. Doust, J. A., Pietrzak, E., Dobson, A. & Glasziou, P. How well does B-type natriuretic peptide predict death and cardiac events in patients with heart failure: systematic review. *BMJ* **330**, 625 (2005).
10. Cohn, J. N. Plasma norepinephrine and mortality. *Clin. Cardiol.* **18**, I9-12 (1995).
11. Kinugawa, T. et al. Prognostic significance of exercise plasma noradrenaline levels for cardiac death in patients with mild heart failure. *Circ. J. Off. J. Jpn. Circ. Soc.* **66**, 261–266 (2002).
12. Janiak, P. et al. Long-term blockade of angiotensin AT1 receptors increases survival of obese Zucker rats. *Eur. J. Pharmacol.* **534**, 271–279 (2006).
13. Yanagisawa, M. et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* **332**, 411–415 (1988).
14. Fukuta, H. & Little, W. Contribution of Systolic and Diastolic Abnormalities to Heart Failure With a Normal and a Reduced Ejection Fraction. **49**, (2007).
15. van Heerebeek, L. et al. Myocardial structure and function differ in systolic and diastolic heart failure. *Circulation* **113**, 1966–1973 (2006).
16. Weber K T & Brilla C G. Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. *Circulation* **83**, 1849–1865 (1991).

17. Fonseca, C., Abraham, D. & Renzoni, E. A. Endothelin in Pulmonary Fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **44**, 1–10 (2011).
18. Creely, J. J., DiMari, S. J., Howe, A. M. & Haralson, M. A. Effects of transforming growth factor-beta on collagen synthesis by normal rat kidney epithelial cells. *Am. J. Pathol.* **140**, 45–55 (1992).
19. Zhao, W., Zhao, T., Chen, Y., Ahokas, R. A. & Sun, Y. Oxidative stress mediates cardiac fibrosis by enhancing transforming growth factor-beta1 in hypertensive rats. *Mol. Cell. Biochem.* **317**, 43–50 (2008).
20. Pitt et al. Effect of Enalapril on Mortality and the Development of Heart Failure in Asymptomatic Patients with Reduced Left Ventricular Ejection Fractions. *N. Engl. J. Med.* **327**, 685–691 (1992).
21. Swedberg et al. Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure. Results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS). *N. Engl. J. Med.* **316**, 1429–1435 (1987).
22. Granger, C. B. et al. Effects of candesartan in patients with chronic heart failure and reduced left-ventricular systolic function intolerant to angiotensin-converting-enzyme inhibitors: the CHARM-Alternative trial. *The Lancet* **362**, 772–776 (2003).
23. Pfeffer, M. A. et al. Effects of candesartan on mortality and morbidity in patients with chronic heart failure: the CHARM-Overall programme. *The Lancet* **362**, 759–766 (2003).
24. Pitt, B. et al. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N. Engl. J. Med.* **341**, 709–717 (1999).
25. Pitt, B. et al. Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* **348**, 1309–1321 (2003).
26. McMurray, J. J. V. et al. Angiotensin–Neprilysin Inhibition versus Enalapril in Heart Failure. *N. Engl. J. Med.* **371**, 993–1004 (2014).
27. Packer, M. et al. Effect of carvedilol on survival in severe chronic heart failure. *N. Engl. J. Med.* **344**, 1651–1658 (2001).
28. Poole-Wilson, P. A. et al. Comparison of carvedilol and metoprolol on clinical outcomes in patients with chronic heart failure in the Carvedilol Or Metoprolol European Trial (COMET): randomised controlled trial. *The Lancet* **362**, 7–13 (2003).
29. Fox, K. et al. Ivabradine in Stable Coronary Artery Disease without Clinical Heart Failure. *N. Engl. J. Med.* **371**, 1091–1099 (2014).
30. Mulder, P. et al. Long-term heart rate reduction induced by the selective I(f) current inhibitor ivabradine improves left ventricular function and intrinsic myocardial structure in congestive heart failure. *Circulation* **109**, 1674–1679 (2004).
31. Faris, R. F., Flather, M., Purcell, H., Poole-Wilson, P. A. & Coats, A. J. S. Diuretics for heart failure. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD003838 (2012). doi:10.1002/14651858.CD003838.pub3
32. Tsutsui, H., Tsuchihashi-Makaya, M. & Kinugawa, S. Clinical characteristics and outcomes of heart failure with preserved ejection fraction: Lessons from epidemiological studies. *J. Cardiol.* **55**, 13–22 (2010).

33. Wang, J., Khoury, D. S., Yue, Y., Torre-Amione, G. & Nagueh, S. F. Preserved left ventricular twist and circumferential deformation, but depressed longitudinal and radial deformation in patients with diastolic heart failure. *Eur. Heart J.* **29**, 1283–1289 (2008).
34. Tan, Y. T. et al. The Pathophysiology of Heart Failure With Normal Ejection Fraction: Exercise Echocardiography Reveals Complex Abnormalities of Both Systolic and Diastolic Ventricular Function Involving Torsion, Untwist, and Longitudinal Motion. *J. Am. Coll. Cardiol.* **54**, 36–46 (2009).
35. Yip, G. et al. Left ventricular long axis function in diastolic heart failure is reduced in both diastole and systole: time for a redefinition? *Heart* **87**, 121–125 (2002).
36. Phan, T. T. et al. Heart Failure With Preserved Ejection Fraction Is Characterized by Dynamic Impairment of Active Relaxation and Contraction of the Left Ventricle on Exercise and Associated With Myocardial Energy Deficiency. *J. Am. Coll. Cardiol.* **54**, 402–409 (2009).
37. Meijers, W. C., van der Velde, A. R. & de Boer, R. A. Biomarkers in heart failure with preserved ejection fraction. *Neth. Heart J.* **24**, 252–258 (2016).
38. Madamanchi, C., Alhosaini, H., Sumida, A. & Runge, M. S. Obesity and Natriuretic Peptides, BNP and NT-proBNP: Mechanisms and Diagnostic Implications for Heart Failure. *Int. J. Cardiol.* **176**, 611–617 (2014).
39. von Bibra, H. & St John Sutton, M. Diastolic dysfunction in diabetes and the metabolic syndrome: promising potential for diagnosis and prognosis. *Diabetologia* **53**, 1033–1045 (2010).
40. Ather, S. et al. Impact of noncardiac comorbidities on morbidity and mortality in a predominantly male population with heart failure and preserved versus reduced ejection fraction. *J. Am. Coll. Cardiol.* **59**, 998–1005 (2012).
41. Fonarow, G. C. et al. Characteristics, treatments, and outcomes of patients with preserved systolic function hospitalized for heart failure: a report from the OPTIMIZE-HF Registry. *J. Am. Coll. Cardiol.* **50**, 768–777 (2007).
42. Lam, C. S. P. & Brutsaert, D. L. Endothelial Dysfunction: A Pathophysiologic Factor in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction □ □ Editorials published in the *Journal of the American College of Cardiology* reflect the views of the authors and do not necessarily represent the views of JACC or the American College of Cardiology. *J. Am. Coll. Cardiol.* **60**, 1787–1789 (2012).
43. Zakeri, R. et al. Impact of atrial fibrillation on exercise capacity in heart failure with preserved ejection fraction: a RELAX trial ancillary study. *Circ. Heart Fail.* **7**, 123–130 (2014).
44. Thenappan, T., Prins, K. W., Cogswell, R. & Shah, S. J. Pulmonary Hypertension Secondary to Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *Can. J. Cardiol.* **31**, 430–439 (2015).
45. McMurray, J. J. V. et al. Heart failure with preserved ejection fraction: clinical characteristics of 4133 patients enrolled in the I-PRESERVE trial. *Eur. J. Heart Fail.* **10**, 149–156 (2008).
46. van der Velden, J. Diastolic myofilament dysfunction in the failing human heart. *Pflüg. Arch. - Eur. J. Physiol.* **462**, 155–163 (2011).

47. Borbély, A. et al. Cardiomyocyte stiffness in diastolic heart failure. *Circulation* **111**, 774–781 (2005).
48. Paulus, W. J. & Tschöpe, C. A Novel Paradigm for Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *J. Am. Coll. Cardiol.* **62**, 263–271 (2013).
49. Griendling Kathy K., Sorescu Dan & Ushio-Fukai Masuko. NAD(P)H Oxidase-Role in Cardiovascular Biology and Disease. *Circ. Res.* **86**, 494–501 (2000).
50. van Heerebeek, L. et al. Low myocardial protein kinase G activity in heart failure with preserved ejection fraction. *Circulation* **126**, 830–839 (2012).
51. Bloch, K. D. & Janssens, S. Cardiomyocyte-Specific Overexpression of Nitric Oxide Synthase 3: Impact on Left Ventricular Function and Myocardial Infarction. *Trends Cardiovasc. Med.* **15**, 249–253 (2005).
52. Takimoto, E. et al. Chronic inhibition of cyclic GMP phosphodiesterase 5A prevents and reverses cardiac hypertrophy. *Nat. Med.* **11**, 214–222 (2005).
53. Hamdani, N. et al. Myocardial Titin Hypophosphorylation Importantly Contributes to Heart Failure With Preserved Ejection Fraction in a Rat Metabolic Risk Model. *Circ. Heart Fail.* **6**, 1239–1249 (2013).
54. Borbély Attila et al. Hypophosphorylation of the Stiff N2B Titin Isoform Raises Cardiomyocyte Resting Tension in Failing Human Myocardium. *Circ. Res.* **104**, 780–786 (2009).
55. Yamasaki R. et al. Protein Kinase A Phosphorylates Titin's Cardiac-Specific N2B Domain and Reduces Passive Tension in Rat Cardiac Myocytes. *Circ. Res.* **90**, 1181–1188 (2002).
56. Krüger, M. et al. Protein kinase G modulates human myocardial passive stiffness by phosphorylation of the titin springs. *BMC Pharmacol.* **9**, P37 (2009).
57. Grützner, A. et al. Modulation of Titin-Based Stiffness by Disulfide Bonding in the Cardiac Titin N2-B Unique Sequence. *Biophys. J.* **97**, 825–834 (2009).
58. Kuster, G. M. et al. Redox-mediated reciprocal regulation of SERCA and Na⁺–Ca²⁺ exchanger contributes to sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ depletion in cardiac myocytes. *Free Radic. Biol. Med.* **48**, 1182–1187 (2010).
59. Smith, C. S., Bottomley, P. A., Schulman, S. P., Gerstenblith, G. & Weiss, R. G. Altered Creatine Kinase Adenosine Triphosphate Kinetics in Failing Hypertrophied Human Myocardium. *Circulation* **114**, 1151–1158 (2006).
60. González, A. et al. Filling Pressures and Collagen Metabolism in Hypertensive Patients With Heart Failure and Normal Ejection Fraction. *Hypertension* (2010). doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.149112
61. Ahmed, S. H. et al. Matrix metalloproteinases/tissue inhibitors of metalloproteinases: relationship between changes in proteolytic determinants of matrix composition and structural, functional, and clinical manifestations of hypertensive heart disease. *Circulation* **113**, 2089–2096 (2006).
62. Kasner, M., Westermann, Dirk, begona, L. & Tschöpe, C. Diastolic Tissue Doppler Indexes Correlate With the Degree of Collagen Expression and Cross-Linking in Heart Failure and Normal Ejection Fraction. *science direct* Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0735109710048199>. (Accessed: 24th February 2019)

63. Westermann, D. et al. Cardiac inflammation contributes to changes in the extracellular matrix in patients with heart failure and normal ejection fraction. *Circ. Heart Fail.* **4**, 44–52 (2011).
64. Woodiwiss, A. J. et al. Obesity promotes left ventricular concentric rather than eccentric geometric remodeling and hypertrophy independent of blood pressure. *Am. J. Hypertens.* **21**, 1144–1151 (2008).
65. Lam, C. S. P. et al. Size, shape, and stamina: the impact of left ventricular geometry on exercise capacity. *Hypertens. Dallas Tex* 1979 **55**, 1143–1149 (2010).
66. Borlaug, B. A. & Kass, D. A. Ventricular-Vascular Interaction in Heart Failure. *Heart Fail. Clin.* **4**, 23–36 (2008).
67. Haq, M. A. ul. Therapeutic interventions for heart failure with preserved ejection fraction: A summary of current evidence. *World J Cardiol* **6**, 67 (2014).
68. Solomon, S. D. et al. Effect of angiotensin receptor blockade and antihypertensive drugs on diastolic function in patients with hypertension and diastolic dysfunction: a randomised trial. *The Lancet* **369**, 2079–2087 (2007).
69. Yusuf, S. et al. Effects of candesartan in patients with chronic heart failure and preserved left-ventricular ejection fraction: the CHARM-Preserved Trial. *Lancet Lond. Engl.* **362**, 777–781 (2003).
70. Fang, Y. et al. Improvement of left ventricular diastolic function induced by β -blockade. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **51**, 168–176 (2011).
71. Flather, M. D. et al. Randomized trial to determine the effect of nebivolol on mortality and cardiovascular hospital admission in elderly patients with heart failure (SENIORS). *Eur. Heart J.* **26**, 215–225 (2005).
72. van Veldhuisen, D. J. et al. Beta-blockade with nebivolol in elderly heart failure patients with impaired and preserved left ventricular ejection fraction: Data From SENIORS (Study of Effects of Nebivolol Intervention on Outcomes and Rehospitalization in Seniors With Heart Failure). *J. Am. Coll. Cardiol.* **53**, 2150–2158 (2009).
73. Farasat, S. M. et al. Effect of Beta-blocker therapy on rehospitalization rates in women versus men with heart failure and preserved ejection fraction. *Am. J. Cardiol.* **105**, 229–234 (2010).
74. Kanwar, M., Walter, C., Clarke, M. & Aponte, M. Targeting heart failure with preserved ejection fraction: current status and future prospects. *Vasc. Health Risk Manag.* 129 (2016). doi:10.2147/VHRM.S83662
75. Gevaert, A. B., Lemmens, K., Vrints, C. J. & Van Craenenbroeck, E. M. Targeting Endothelial Function to Treat Heart Failure with Preserved Ejection Fraction: The Promise of Exercise Training. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, 1–17 (2017).
76. Barnett, C. F. & Selby, V. N. Overview of WHO Group 2 Pulmonary Hypertension Due to Left Heart Disease. 9 (2015).
77. Simonneau, G. et al. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* **62**, D34–41 (2013).
78. Thenappan, T. & Gombert-Maitland, M. Epidemiology of Pulmonary Hypertension and Right Ventricular Failure in Left Heart Failure. *Curr. Heart Fail. Rep.* **11**, 428–435 (2014).

79. Leung, C. C., Moondra, V., Catherwood, E. & Andrus, B. W. Prevalence and Risk Factors of Pulmonary Hypertension in Patients With Elevated Pulmonary Venous Pressure and Preserved Ejection Fraction. *Am. J. Cardiol.* **106**, 284–286 (2010).
80. Benson, L. et al. Impact of diabetes on survival and right ventricular compensation in pulmonary arterial hypertension. *Pulm. Circ.* **4**, 311–318 (2014).
81. Azarbar, S. & Dupuis, J. Lung capillary injury and repair in left heart disease: a new target for therapy? *Clin. Sci. Lond. Engl.* 1979 **127**, 65–76 (2014).
82. Moraes Denzil L., Colucci Wilson S. & Givertz Michael M. Secondary Pulmonary Hypertension in Chronic Heart Failure - The Role of the Endothelium in Pathophysiology and Management. *Circulation* **102**, 1718–1723 (2000).
83. Stewart, D. J., Levy, R. D., Cernacek, P. & Langleben, D. Increased plasma endothelin-1 in pulmonary hypertension: marker or mediator of disease? *Ann. Intern. Med.* **114**, 464–469 (1991).
84. Thenappan, T., Shah, S. & Rich, S. Outcomes of Pulmonary Hypertension Associated with Heart Failure with Preserved Ejection Fraction. *J. Am. Coll. Cardiol.* **59**, E1602 (2018).
85. Voelkel Norbert F. et al. Right Ventricular Function and Failure. *Circulation* **114**, 1883–1891 (2006).
86. Lam, C. S. P. et al. Age-Associated Increases in Pulmonary Artery Systolic Pressure in the General Population. *Circulation* **119**, 2663–2670 (2009).
87. Melenovsky, V., Hwang, S.-J., Lin, G., Redfield, M. M. & Borlaug, B. A. Right heart dysfunction in heart failure with preserved ejection fraction. *Eur. Heart J.* **35**, 3452–3462 (2014).
88. McLaughlin, V. V. et al. ACCF/AHA 2009 Expert Consensus Document on Pulmonary Hypertension: A Report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Expert Consensus Documents and the American Heart Association Developed in Collaboration With the American College of Chest Physicians; American Thoracic Society, Inc.; and the Pulmonary Hypertension Association. *J. Am. Coll. Cardiol.* **53**, 1573–1619 (2009).
89. Surie, S. et al. Bosentan Treatment Is Associated With Improvement of Right Ventricular Function and Remodeling in Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension: Bosentan treatment and RV function in CTEPH. *Clin. Cardiol.* **36**, 698–703 (2013).
90. Pulido, T. et al. Macitentan and Morbidity and Mortality in Pulmonary Arterial Hypertension. *N. Engl. J. Med.* **369**, 809–818 (2013).
91. Koller, B. et al. Pilot Study of Endothelin Receptor Blockade in Heart Failure with Diastolic Dysfunction and Pulmonary Hypertension (BADDHY-Trial). *Heart Lung Circ.* **26**, 433–441 (2017).
92. Kazmi, R. S., Boyce, S. & Lwaleed, B. A. Homeostasis of Hemostasis: The Role of Endothelium. *Semin. Thromb. Hemost.* **41**, 549–555 (2015).
93. Cohen, R. A. & Vanhoutte, P. M. Endothelium-dependent hyperpolarization. Beyond nitric oxide and cyclic GMP. *Circulation* **92**, 3337–3349 (1995).

94. Bellien, J. et al. Crucial role of NO and endothelium-derived hyperpolarizing factor in human sustained conduit artery flow-mediated dilatation. *Hypertens. Dallas Tex* 1979 **48**, 1088–1094 (2006).
95. Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Goto, K. & Masaki, T. A novel peptide vasoconstrictor, endothelin, is produced by vascular endothelium and modulates smooth muscle Ca²⁺ channels. *J. Hypertens. Suppl. Off. J. Int. Soc. Hypertens.* **6**, S188-191 (1988).
96. Palmer, R. M. J., Ferrige, A. G. & Moncada, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* **327**, 524–526 (1987).
97. Ullrich, R. et al. Congenital deficiency of nitric oxide synthase 2 protects against endotoxin-induced myocardial dysfunction in mice. *Circulation* **102**, 1440–1446 (2000).
98. Balligand, J. L., Kelly, R. A., Marsden, P. A., Smith, T. W. & Michel, T. Control of cardiac muscle cell function by an endogenous nitric oxide signaling system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 347–351 (1993).
99. Shaul, P. W. et al. Endothelial nitric oxide synthase is expressed in cultured human bronchiolar epithelium. *J. Clin. Invest.* **94**, 2231–2236 (1994).
100. García-Cardena, G., Oh, P., Liu, J., Schnitzer, J. E. & Sessa, W. C. Targeting of nitric oxide synthase to endothelial cell caveolae via palmitoylation: implications for nitric oxide signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 6448–6453 (1996).
101. Velazquez, Wang. *Cells of the Vascular System*. Clinical Gate (2015).
102. Drexler, H. et al. Endothelial function in chronic congestive heart failure. *Am. J. Cardiol.* **69**, 1596–1601 (1992).
103. Agnoletti, L. et al. Serum from patients with severe heart failure downregulates eNOS and is proapoptotic: role of tumor necrosis factor- α . *Circulation* **100**, 1983–1991 (1999).
104. Lai, P. F. H., Mohamed, F., Monge, J.-C. & Stewart, D. J. Downregulation of eNOS mRNA expression by TNF α : identification and functional characterization of RNA–protein interactions in the 3'UTR. *Cardiovasc. Res.* **59**, 160–168 (2003).
105. Picchi, A. et al. Tumor necrosis factor- α induces endothelial dysfunction in the prediabetic metabolic syndrome. *Circ. Res.* **99**, 69–77 (2006).
106. Gomez, E. et al. Reduction of heart failure by pharmacological inhibition or gene deletion of protein tyrosine phosphatase 1B. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **52**, 1257–1264 (2012).
107. Maupoint, J. et al. Selective Vascular Endothelial Protection Reduces Cardiac Dysfunction in Chronic Heart FailureCLINICAL PERSPECTIVE. *Circ. Heart Fail.* **9**, e002895 (2016).
108. Landmesser, U. et al. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J. Clin. Invest.* **111**, 1201–1209 (2003).
109. Chen, W., Bacanamwo, M. & Harrison, D. G. Activation of p300 histone acetyltransferase activity is an early endothelial response to laminar shear stress and is essential for stimulation of endothelial nitric-oxide synthase mRNA transcription. *J. Biol. Chem.* **283**, 16293–16298 (2008).

110. Kong, X. et al. Modulation of low shear stress-induced eNOS multi-site phosphorylation and nitric oxide production via protein kinase and ERK1/2 signaling. *Mol. Med. Rep.* **15**, 908–914 (2017).
111. Kalinowski, L. & Malinski, T. Endothelial NADH/NADPH-dependent enzymatic sources of superoxide production: relationship to endothelial dysfunction. *Acta Biochim. Pol.* **51**, 459–469 (2004).
112. Serpillon, S. et al. Superoxide production by NAD(P)H oxidase and mitochondria is increased in genetically obese and hyperglycemic rat heart and aorta before the development of cardiac dysfunction. The role of glucose-6-phosphate dehydrogenase-derived NADPH. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* **297**, H153–H162 (2009).
113. Mohammed, S. F. et al. Coronary microvascular rarefaction and myocardial fibrosis in heart failure with preserved ejection fraction. *Circulation* **131**, 550–559 (2015).
114. Burke, M. A. et al. Prognostic Importance of Pathophysiologic Markers in Patients With Heart Failure and Preserved Ejection Fraction. *Circ. Heart Fail.* **7**, 288–299 (2014).
115. Tschöpe, C. et al. High prevalence of cardiac parvovirus B19 infection in patients with isolated left ventricular diastolic dysfunction. *Circulation* **111**, 879–886 (2005).
116. Sucato, V. et al. Angiographic Evaluation of Coronary Microvascular Dysfunction in Patients with Heart Failure and Preserved Ejection Fraction. *Microcirc. N. Y. N* **1994** **22**, 528–533 (2015).
117. Kato, S. et al. Impairment of Coronary Flow Reserve Evaluated by Phase Contrast Cine-Magnetic Resonance Imaging in Patients With Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *J. Am. Heart Assoc.* **5**, (2016).
118. Guazzi, M., Bandera, F. & Forfia, P. Sildenafil and exercise capacity in heart failure. *JAMA* **310**, 432 (2013).
119. Grundy, S. M. Diagnosis and Management of the Metabolic Syndrome: An American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation* **112**, 2735–2752 (2005).
120. Wilson, P. W. F. Metabolic Syndrome as a Precursor of Cardiovascular Disease and Type 2 Diabetes Mellitus. *Circulation* **112**, 3066–3072 (2005).
121. Reaven, G. Metabolic syndrome: pathophysiology and implications for management of cardiovascular disease. *Circulation* **106**, 286–288 (2002).
122. Moore, J. X. Metabolic Syndrome Prevalence by Race/Ethnicity and Sex in the United States, National Health and Nutrition Examination Survey, 1988–2012. *Prev. Chronic. Dis.* **14**, (2017).
123. Lameira, D., Lejeune, S. & Mourad, J.-J. Le syndrome métabolique : son épidémiologie et ses risques. *Ann. Dermatol. Vénéréologie* **135**, 249–253 (2008).
124. Kaur, J. A comprehensive review on metabolic syndrome. *Cardiol. Res. Pract.* **2014**, 943162 (2014).
125. Ayalon, N. et al. Preclinical Left Ventricular Diastolic Dysfunction in Metabolic Syndrome. *Am. J. Cardiol.* **114**, 838–842 (2014).
126. Benetos, A. et al. All-cause and cardiovascular mortality using the different definitions of metabolic syndrome. *Am. J. Cardiol.* **102**, 188–191 (2008).

127. Fornoni, A. & Raij, L. Metabolic syndrome and endothelial dysfunction. *Curr. Hypertens. Rep.* **7**, 88–95 (2005).
128. Chuang, S.-Y. et al. Presence and Progression of Abdominal Obesity Are Predictors of Future High Blood Pressure and Hypertension. *Am. J. Hypertens.* **19**, 788–795 (2006).
129. Fève, B., Bastard, J.-P. & Vidal, H. Les relations entre obésité, inflammation et insulino-résistance : acquisitions récentes. *C. R. Biol.* **329**, 587–597 (2006).
130. Sawaki, D. et al. Visceral Adipose Tissue Drives Cardiac Aging Through Modulation of Fibroblast Senescence by Osteopontin Production. *Circulation* **138**, 809–822 (2018).
131. Hotamisligil, G. S., Shargill, N. S. & Spiegelman, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* **259**, 87–91 (1993).
132. Hotamisligil, G. S. et al. IRS-1-Mediated Inhibition of Insulin Receptor Tyrosine Kinase Activity in TNF- α - and Obesity-induced Insulin Resistance. *Science* **271**, 5 (1996).
133. Carlyle, M., Jones, O. B., Kuo, J. J. & Hall, J. E. Chronic Cardiovascular and Renal Actions of Leptin: Role of Adrenergic Activity. *Hypertension* **39**, 496–501 (2002).
134. Gilbert, M., Magnan, C., Turban, S., Andre, J. & Guerre-Millo, M. Leptin Receptor-Deficient Obese Zucker Rats Reduce Their Food Intake in Response to a Systemic Supply of Calories From Glucose. *Diabetes* **52**, 277–282 (2003).
135. Kowalski, T. J., Ster, A. M. & Smith, G. P. Ontogeny of hyperphagia in the Zucker (fa / fa) rat. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* **275**, R1106–R1109 (1998).
136. Bender, S. B. et al. Mineralocorticoid Receptor Antagonism Treats Obesity-Associated Cardiac Diastolic Dysfunction. *Hypertension* **65**, 1082–1088 (2015).
137. Xiang, L., Dearman, J., Abram, S. R., Carter, C. & Hester, R. L. Insulin resistance and impaired functional vasodilation in obese Zucker rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **294**, H1658–1666 (2008).
138. Debin, R. et al. Are Zucker obese rats a useful model for cardiovascular complications in metabolic syndrome? Physical, biochemical and oxidative stress considerations. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **23**, 59–67 (2009).
139. Xydakis, A. M. et al. Adiponectin, Inflammation, and the Expression of the Metabolic Syndrome in Obese Individuals: The Impact of Rapid Weight Loss through Caloric Restriction. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **89**, 2697–2703 (2004).
140. Arita, Y. et al. Paradoxical Decrease of an Adipose-Specific Protein, Adiponectin, in Obesity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **257**, 79–83 (1999).
141. Weyer, C. et al. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **86**, 1930–1935 (2001).
142. Hotta, K. et al. Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **20**, 1595–1599 (2000).
143. Hashimoto, N. et al. Association of hypoadiponectinemia in men with early onset of coronary heart disease and multiple coronary artery stenoses. *Metabolism* **55**, 1653–1657 (2006).
144. Stefan, N. & Stumvoll, M. Adiponectin--its role in metabolism and beyond. *Horm. Metab. Res. Horm. Stoffwechselforschung Horm. Metab.* **34**, 469–474 (2002).

145. Matsuzawa Yuji, Funahashi Tohru, Kihara Shinji & Shimomura Iichiro. Adiponectin and Metabolic Syndrome. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, 29–33 (2004).
146. Ternacle, J. et al. Short-term high-fat diet compromises myocardial function: a radial strain rate imaging study. *Eur. Heart J. Cardiovasc. Imaging* **18**, 1283–1291 (2017).
147. Rask-Madsen, C. & Kahn, C. R. Tissue-specific insulin signaling, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **32**, 2052–2059 (2012).
148. Benn, M. et al. Nonfasting Glucose, Ischemic Heart Disease, and Myocardial Infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* **59**, 2356–2365 (2012).
149. Lara-Guzmán, O. J. et al. Oxidized LDL triggers changes in oxidative stress and inflammatory biomarkers in human macrophages. *Redox Biol.* **15**, 1–11 (2017).
150. Podrez, E. A. Anti-oxidant properties of high-density lipoprotein and atherosclerosis. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **37**, 719–725 (2010).
151. Boucher, J., Kleinridders, A. & Kahn, C. R. Insulin Receptor Signaling in Normal and Insulin-Resistant States. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **6**, a009191–a009191 (2014).
152. Cheatham, B. et al. Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulation of pp70 S6 kinase, DNA synthesis, and glucose transporter translocation. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 4902–4911 (1994).
153. DeFronzo, R. A., Tobin, J. D. & Andres, R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am. J. Physiol.* **237**, E214–E223 (1979).
154. Cardillo, C. et al. Insulin stimulates both endothelin and nitric oxide activity in the human forearm. *Circulation* **100**, 820–825 (1999).
155. Belke, D. D. et al. Insulin signaling coordinately regulates cardiac size, metabolism, and contractile protein isoform expression. *J. Clin. Invest.* **109**, 629–639 (2002).
156. Yao, H., Han, X. & Han, X. The cardioprotection of the insulin-mediated PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *Am. J. Cardiovasc. Drugs Drugs Devices Interv.* **14**, 433–442 (2014).
157. Cusi, K. et al. Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase– and MAP kinase–mediated signaling in human muscle. *J. Clin. Invest.* **105**, 311–320 (2000).
158. Wiviott, S. D. et al. Dapagliflozin and Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes. *N. Engl. J. Med.* **380**, 347–357 (2019).
159. Zinman B, Wanner C & Inzucchi S. Empagliflozin, Cardiovascular Outcomes, and Mortality in Type 2 Diabetes | NEJM. (2015)..
160. Perrine Anne-Laure. L'hypertension artérielle en France : prévalence, traitement et contrôle en 2015 et évolutions depuis 2006. (2018). Available at: http://invs.santepubliquefrance.fr/beh/2018/10/2018_10_1.html.
161. Yanai, H. et al. The underlying mechanisms for development of hypertension in the metabolic syndrome. *Nutr. J.* **7**, 10 (2008).
162. Sarafidis, P. A. & Bakris, G. L. Insulin and Endothelin: An Interplay Contributing to Hypertension Development? *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **92**, 379–385 (2007).
163. Cooper, S. A. et al. Renin-angiotensin-aldosterone system and oxidative stress in cardiovascular insulin resistance. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* **293**, H2009–H2023 (2007).

164. Yoshida, Jun & Tsutomu Tomita. Mineralocorticoid Receptor Is Overexpressed in Cardiomyocytes of Patients With Congestive Heart Failure - Yoshida - 2005 - Congestive Heart Failure - Wiley Online Library. (2005). Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1527-5299.2005.03722.x>.
165. Quinkler Marcus et al. Increased Expression of Mineralocorticoid Effector Mechanisms in Kidney Biopsies of Patients With Heavy Proteinuria. *Circulation* **112**, 1435–1443 (2005).
166. Bauersachs, J., Jaisser, F. & Toto, R. Mineralocorticoid receptor activation and mineralocorticoid receptor antagonist treatment in cardiac and renal diseases. *Hypertens. Dallas Tex* 1979 **65**, 257–263 (2015).
167. McCurley, A., McGraw, A., Pruthi, D. & Jaffe, I. Z. Smooth muscle cell mineralocorticoid receptors: role in vascular function and contribution to cardiovascular disease. *Pflugers Arch.* **465**, (2013).
168. Lombès M et al. Immunohistochemical and biochemical evidence for a cardiovascular mineralocorticoid receptor. *Circ. Res.* **71**, 503–510 (1992).
169. Caprio, M. et al. Pivotal role of the mineralocorticoid receptor in corticosteroid-induced adipogenesis. *FASEB J.* **21**, 2185–2194 (2007).
170. Funder, J. W., Pearce, P. T., Smith, R. & Smith, A. I. Mineralocorticoid action: target tissue specificity is enzyme, not receptor, mediated. *Science* **242**, 583–585 (1988).
171. Favre, J. et al. Coronary endothelial dysfunction after cardiomyocyte-specific mineralocorticoid receptor overexpression. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **300**, H2035-2043 (2011).
172. Gueret, A. et al. Vascular Smooth Muscle Mineralocorticoid Receptor Contributes to Coronary and Left Ventricular Dysfunction After Myocardial Infarction. *Hypertens. Dallas Tex* 1979 **67**, 717–723 (2016).
173. Fraccarollo, D. et al. Deletion of cardiomyocyte mineralocorticoid receptor ameliorates adverse remodeling after myocardial infarction. *Circulation* **123**, 400–408 (2011).
174. Lothar, A. et al. Ablation of mineralocorticoid receptors in myocytes but not in fibroblasts preserves cardiac function. *Hypertens. Dallas Tex* 1979 **57**, 746–754 (2011).
175. Modena, M. G., Aveta, P., Menozzi, A. & Rossi, R. Aldosterone inhibition limits collagen synthesis and progressive left ventricular enlargement after anterior myocardial infarction. *Am. Heart J.* **141**, 41–46 (2001).
176. MacFadyen, R., Lee, A., Morton, J., Pringle, S. & Struthers, A. How often are angiotensin II and aldosterone concentrations raised during chronic ACE inhibitor treatment in cardiac failure? *Heart* **82**, 57–61 (1999).
177. Zannad, F. et al. Eplerenone in Patients with Systolic Heart Failure and Mild Symptoms. *N. Engl. J. Med.* **364**, 11–21 (2011).
178. Pitt, B. et al. Spironolactone for Heart Failure with Preserved Ejection Fraction. *N. Engl. J. Med.* **370**, 1383–1392 (2014).
179. Aronov, W. Lessons Learned from the TOPCAT Trial. *J. Clin. Exp. Cardiol.* **06**, (2014).
180. Sica, D. A. Mineralocorticoid Receptor Antagonists for Treatment of Hypertension and Heart Failure. *Methodist DeBakey Cardiovasc. J.* **11**, 235–239 (2015).

181. Kolkhof, P. & Bäracker, L. 30 Years of the mineralocorticoid receptor: Mineralocorticoid receptor antagonists: 60 years of research and development. *J. Endocrinol.* **234**, T125–T140 (2017).
182. Kolkhof, P. et al. Finerenone, a novel selective nonsteroidal mineralocorticoid receptor antagonist protects from rat cardiorenal injury. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **64**, 69–78 (2014).
183. Pitt, B. et al. Safety and tolerability of the novel non-steroidal mineralocorticoid receptor antagonist BAY 94-8862 in patients with chronic heart failure and mild or moderate chronic kidney disease: a randomized, double-blind trial. *Eur. Heart J.* **34**, 2453–2463 (2013).
184. Inoue, A. et al. The human preproendothelin-1 gene. Complete nucleotide sequence and regulation of expression. *J. Biol. Chem.* **264**, 14954–14959 (1989).
185. Inoue, A. et al. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 2863–2867 (1989).
186. Kawanabe, Y. & Nauli, S. M. Endothelin. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **68**, 195–203 (2011).
187. Brunner, F., Brás-Silva, C., Cerdeira, A. S. & Leite-Moreira, A. F. Cardiovascular endothelins: essential regulators of cardiovascular homeostasis. *Pharmacol. Ther.* **111**, 508–531 (2006).
188. Spokes, R. A., Ghatei, M. A. & Bloom, S. R. Studies with Endothelin-3 and Endothelin-1 on Rat Blood Pressure and Isolated Tissues: Evidence for Multiple Endothelin Receptor Subtypes. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **13**, S191 (1989).
189. Thorin, E. & Clozel, M. The Cardiovascular Physiology and Pharmacology of Endothelin-1. in *Advances in Pharmacology* **60**, 1–26 (Elsevier, 2010).
190. Simonson, M. S. & Dunn, M. J. Cellular signaling by peptides of the endothelin gene family. *FASEB J.* **4**, 2989–3000 (1990).
191. Tsukahara, H., Ende, H., Magazine, H. I., Bahou, W. F. & Goligorsky, M. S. Molecular and functional characterization of the non-isopeptide-selective ETB receptor in endothelial cells. Receptor coupling to nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* **269**, 21778–21785 (1994).
192. Dupuis, J., Stewart, D. J., Cernacek, P. & Gosselin, G. Human pulmonary circulation is an important site for both clearance and production of endothelin-1. *Circulation* **94**, 1578–1584 (1996).
193. Dupuis, J., Goresky, C. A. & Fournier, A. Pulmonary clearance of circulating endothelin-1 in dogs in vivo: exclusive role of ETB receptors. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* **81**, 1510–1515 (1996).
194. Unoki, H., Fan, J. & Watanabe, T. Low-density lipoproteins modulate endothelial cells to secrete endothelin-1 in a polarized pattern: a study using a culture model system simulating arterial intima. *Cell Tissue Res.* **295**, 89–99 (1999).
195. Brunner, F., Stessel, H., Watzinger, N., Löffler, B.-M. & Opie, L. H. Binding of endothelin to plasma proteins and tissue receptors: effects on endothelin determination, vasoactivity, and tissue kinetics. *FEBS Lett.* **373**, 97–101 (1995).

196. Robu, V. G. et al. Localization of functional endothelin receptor signaling complexes in cardiac transverse tubules. *J. Biol. Chem.* **278**, 48154–48161 (2003).
197. Yamashita, K., Discher, D. J., Hu, J., Bishopric, N. H. & Webster, K. A. Molecular regulation of the endothelin-1 gene by hypoxia. Contributions of hypoxia-inducible factor-1, activator protein-1, GATA-2, AND p300/CBP. *J. Biol. Chem.* **276**, 12645–12653 (2001).
198. Belaidi, E. et al. Major role for hypoxia inducible factor-1 and the endothelin system in promoting myocardial infarction and hypertension in an animal model of obstructive sleep apnea. *J. Am. Coll. Cardiol.* **53**, 1309–1317 (2009).
199. Yamazaki, T. et al. Endothelin-1 Is Involved in Mechanical Stress-induced Cardiomyocyte Hypertrophy. *J. Biol. Chem.* **271**, 3221–3228 (1996).
200. Rubin, L. J. et al. Bosentan Therapy for Pulmonary Arterial Hypertension. *N. Engl. J. Med.* **346**, 896–903 (2002).
201. Mulder, P. Selective ETA receptor blockade prevents left ventricular remodeling and deterioration of cardiac function in experimental heart failure. *Cardiovasc. Res.* **39**, 600–608 (1998).
202. Mulder, P. et al. Selective Endothelin-A Versus Combined Endothelin-A/Endothelin-B Receptor Blockade in Rat Chronic Heart Failure. *Circulation* **102**, 491–493 (2000).
203. Sakai, S. et al. Inhibition of myocardial endothelin pathway improves long-term survival in heart failure. *Nature* **384**, 353–355 (1996).
204. Packer, M. et al. Long-Term Effect of Endothelin Receptor Antagonism With Bosentan on the Morbidity and Mortality of Patients With Severe Chronic Heart Failure: Primary Results of the ENABLE Trials. *JACC Heart Fail.* **5**, 317–326 (2017).
205. Packer, M. et al. Clinical effects of endothelin receptor antagonism with bosentan in patients with severe chronic heart failure: results of a pilot study. *J. Card. Fail.* **11**, 12–20 (2005).
206. Dingemans, J., Sidharta, P. N., Maddrey, W. C., Rubin, L. J. & Mickail, H. Efficacy, safety and clinical pharmacology of macitentan in comparison to other endothelin receptor antagonists in the treatment of pulmonary arterial hypertension. *Expert Opin. Drug Saf.* **13**, 391–405 (2014).
207. Iglarz, M. et al. Comparison of Macitentan and Bosentan on Right Ventricular Remodeling in a Rat Model of Non-vasoreactive Pulmonary Hypertension: *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **66**, 457–467 (2015).
208. Gatfield, J., Mueller Grandjean, C., Bur, D., Bolli, M. H. & Nayler, O. Distinct ETA Receptor Binding Mode of Macitentan As Determined by Site Directed Mutagenesis. *PLoS ONE* **9**, e107809 (2014).
209. Iglarz, M. et al. Pharmacology of Macitentan, an Orally Active Tissue-Targeting Dual Endothelin Receptor Antagonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **327**, 736–745 (2008).
210. Tsutsui, H., Ide, T. & Kinugawa, S. Mitochondrial oxidative stress, DNA damage, and heart failure. *Antioxid. Redox Signal.* **8**, 1737–1744 (2006).
211. Knowlton, A. A., Chen, L. & Malik, Z. A. Heart failure and mitochondrial dysfunction: the role of mitochondrial fission/fusion abnormalities and new therapeutic strategies. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **63**, 196–206 (2014).

212. Morino, K. et al. Reduced mitochondrial density and increased IRS-1 serine phosphorylation in muscle of insulin-resistant offspring of type 2 diabetic parents. *J. Clin. Invest.* **115**, 3587–3593 (2005).
213. Kim, J., Wei, Y. & Sowers, J. R. Role of Mitochondrial Dysfunction in Insulin Resistance. *Circ. Res.* **102**, 401–414 (2008).
214. Boudina, S. et al. Reduced mitochondrial oxidative capacity and increased mitochondrial uncoupling impair myocardial energetics in obesity. *Circulation* **112**, 2686–2695 (2005).
215. Jeong, E. et al. Role of Mitochondrial Oxidative Stress in Glucose Tolerance, Insulin Resistance, and Cardiac Diastolic Dysfunction. *J. Am. Heart Assoc.* **5**, e003046 (2016).
216. Rolfe, D. F. & Brown, G. C. Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiol. Rev.* **77**, 731–758 (1997).
217. Murphy, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* **417**, 1–13 (2009).
218. Ren, J., Pulakat, L., Whaley-Connell, A. & Sowers, J. R. Mitochondrial biogenesis in the metabolic syndrome and cardiovascular disease. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* **88**, 993–1001 (2010).
219. Liang, H. & Ward, W. F. PGC-1 α : a key regulator of energy metabolism. *Adv. Physiol. Educ.* **30**, 145–151 (2006).
220. Jäger, S., Handschin, C., St.-Pierre, J. & Spiegelman, B. M. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 α . *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 12017–12022 (2007).
221. Cantó, C. & Auwerx, J. PGC-1 α , SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure. *Curr. Opin. Lipidol.* **20**, 98–105 (2009).
222. Doenst, T., Nguyen, T. D. & Abel, E. D. Cardiac Metabolism in Heart Failure - Implications beyond ATP production. *Circ. Res.* **113**, 709–724 (2013).
223. Kim, J. Y., Hickner, R. C., Cortright, R. L., Dohm, G. L. & Houmard, J. A. Lipid oxidation is reduced in obese human skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **279**, E1039–1044 (2000).
224. Petersen, K. F., Dufour, S., Befroy, D., Garcia, R. & Shulman, G. I. Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med.* **350**, 664–671 (2004).
225. Katakam, P. V. G. et al. Impaired insulin-induced vasodilation in small coronary arteries of Zucker obese rats is mediated by reactive oxygen species. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **288**, H854–860 (2005).
226. Chen, F. et al. Inhibition of histone deacetylase reduces transcription of NADPH oxidases and ROS production and ameliorates pulmonary arterial hypertension. *Free Radic. Biol. Med.* **99**, 167–178 (2016).
227. Shadel, G. S. & Horvath, T. L. Mitochondrial ROS Signaling in Organismal Homeostasis. *Cell* **163**, 560–569 (2015).
228. Martín-Fernández, B. & Gredilla, R. Mitochondria and oxidative stress in heart aging. *Age* **38**, 225–238 (2016).
229. Gouill, E. L. et al. eNOS knock-out mice have defective mitochondrial beta-oxidation. *Diabetes* (2007). doi:10.2337/db06-1228

230. Zou, M.-H. et al. Activation of the AMP-activated Protein Kinase by the Anti-diabetic Drug Metformin in Vivo ROLE OF MITOCHONDRIAL REACTIVE NITROGEN SPECIES. *J. Biol. Chem.* **279**, 43940–43951 (2004).
231. Blendea, M. C. et al. Abrogation of oxidative stress improves insulin sensitivity in the Ren-2 rat model of tissue angiotensin II overexpression. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* **288**, E353–E359 (2005).
232. Fouqueray, P., Leverve, X., Fontaine, E., Baquié, M. & Wollheim, C. Imeglimin - A New Oral Anti-Diabetic that Targets the Three Key Defects of type 2 Diabetes. *J. Diabetes Metab.* **02**, (2011).
233. Mesangeau, D. & Cravo, D. (71) Applicant: Poxel S.A.S., Lyons (FR). 17
234. Perry, R. J. et al. Imeglimin lowers glucose primarily by amplifying glucose-stimulated insulin secretion in high-fat-fed rodents. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* **311**, E461–E470 (2016).
235. Vial, G. et al. Imeglimin Normalizes Glucose Tolerance and Insulin Sensitivity and Improves Mitochondrial Function in Liver of a High-Fat, High-Sucrose Diet Mice Model. *Diabetes* **64**, 2254–2264 (2015).
236. Detaille, D. et al. Imeglimin prevents human endothelial cell death by inhibiting mitochondrial permeability transition without inhibiting mitochondrial respiration. *Cell Death Discov.* **2**, (2016).
237. Pirags, V., Lebovitz, H. & Fouqueray, P. Imeglimin, a novel glimin oral antidiabetic, exhibits a good efficacy and safety profile in type 2 diabetic patients. *Diabetes Obes. Metab.* **14**, 852–858 (2012).
238. Fouqueray, P. et al. The Efficacy and Safety of Imeglimin as Add-on Therapy in Patients With Type 2 Diabetes Inadequately Controlled With Metformin Monotherapy. *Diabetes Care* **36**, 565–568 (2013).
239. Fouqueray, P. et al. The Efficacy and Safety of Imeglimin as Add-on Therapy in Patients With Type 2 Diabetes Inadequately Controlled With Sitagliptin Monotherapy. *Diabetes Care* **37**, 1924–1930 (2014).
240. Pacini, G., Mari, A., Fouqueray, P., Bolze, S. & Roden, M. Imeglimin increases glucose-dependent insulin secretion and improves β -cell function in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Obes. Metab.* **17**, 541–545 (2015).
241. Agouni, A. et al. Red Wine Polyphenols Prevent Metabolic and Cardiovascular Alterations Associated with Obesity in Zucker Fatty Rats (Fa/Fa). *PLoS ONE* **4**, e5557 (2009).
242. Montoro-Molina, S. et al. Klotho and Aminopeptidases as Early Biomarkers of Renal Injury in Zucker Obese Rats. *Front. Physiol.* **9**, (2018).
243. Iliescu, R. & Chade, A. R. Progressive renal vascular proliferation and injury in obese zucker rats. *Microcirc. N. Y. N 1994* **17**, 250–258 (2010).
244. Merdzo, I. et al. The mitochondrial function of the cerebral vasculature in insulin-resistant Zucker obese rats. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* **310**, H830–H838 (2016).
245. Greene, N. P. et al. Impaired exercise-induced mitochondrial biogenesis in the obese Zucker rat, despite PGC-1 α induction, is due to compromised mitochondrial translation elongation. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* **306**, E503–E511 (2014).

246. Fang, Y. et al. Heart rate reduction induced by the if current inhibitor ivabradine improves diastolic function and attenuates cardiac tissue hypoxia. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **59**, 260–267 (2012).
247. Merabet, N. et al. Selective Heart Rate Reduction Improves Metabolic Syndrome-related Left Ventricular Diastolic Dysfunction. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **66**, 399–408 (2015).
248. Grattagliano, I., Palmieri, V. O., Portincasa, P., Moschetta, A. & Palasciano, G. Oxidative stress-induced risk factors associated with the metabolic syndrome: a unifying hypothesis. *J. Nutr. Biochem.* **19**, 491–504 (2008).
249. Lauer, T. et al. Plasma nitrite rather than nitrate reflects regional endothelial nitric oxide synthase activity but lacks intrinsic vasodilator action. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 12814–12819 (2001).
250. Zhou, W., Wang, X.-L., Kaduce, T. L., Spector, A. A. & Lee, H.-C. Impaired arachidonic acid-mediated dilation of small mesenteric arteries in Zucker diabetic fatty rats. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* **288**, H2210–H2218 (2005).
251. Luo, H. et al. Oxidative Stress Causes Imbalance of Renal Renin Angiotensin System (RAS) Components and Hypertension in Obese Zucker Rats. *J. Am. Heart Assoc.* **4**, e001559–e001559 (2015).
252. Frisbee, J. C., Maier, K. G. & Stepp, D. W. Oxidant stress-induced increase in myogenic activation of skeletal muscle resistance arteries in obese Zucker rats. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* **283**, H2160–H2168 (2002).
253. Takahashi, K. et al. Roles of oxidative stress and the mineralocorticoid receptor in cardiac pathology in a rat model of metabolic syndrome. *Nagoya J. Med. Sci.* **77**, 275 ~ 289, 2015.
254. Sánchez, A. et al. Endothelin-1 contributes to endothelial dysfunction and enhanced vasoconstriction through augmented superoxide production in penile arteries from insulin-resistant obese rats: role of ET(A) and ET(B) receptors. *Br. J. Pharmacol.* **171**, 5682–5695 (2014).
255. Fraccarollo, D. et al. Improvement in Left Ventricular Remodeling by the Endothelial Nitric Oxide Synthase Enhancer AVE9488 After Experimental Myocardial Infarction. *Circulation* **118**, 818–827 (2008).
256. Gori, M. et al. Association between renal function and cardiovascular structure and function in heart failure with preserved ejection fraction. *Eur. Heart J.* **35**, 3442–3451 (2014).
257. Damman, K. et al. Renal impairment, worsening renal function, and outcome in patients with heart failure: an updated meta-analysis. *Eur. Heart J.* **35**, 455–469 (2014).
258. Hemmelgarn, B. R. et al. Relation between kidney function, proteinuria, and adverse outcomes. *JAMA* **303**, 423–429 (2010).
259. Prasad, G. V. R. Metabolic syndrome and chronic kidney disease: Current status and future directions. *World J. Nephrol.* **3**, 210–219 (2014).
260. Aprikian, O. et al. Lyophilized apple counteracts the development of hypercholesterolemia, oxidative stress, and renal dysfunction in obese Zucker rats. *J. Nutr.* **132**, 1969–1976 (2002).

261. Patel, S. N., Ali, Q. & Hussain, T. Angiotensin II Type 2–Receptor Agonist C21 Reduces Proteinuria and Oxidative Stress in Kidney of High-Salt–Fed Obese Zucker Rats Novelty and Significance. *Hypertension* **67**, 906–915 (2016).
262. Rodríguez-Iturbe, B., Quiroz, Y., Shahkarami, A., Li, Z. & Vaziri, N. D. Mycophenolate mofetil ameliorates nephropathy in the obese Zucker rat. *Kidney Int.* **68**, 1041–1047 (2005).
263. Devarajan, P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL). *Scand. J. Clin. Lab. Investig. Suppl.* **241**, 89–94 (2008).
264. Mishra, J. et al. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **14**, 2534–2543 (2003).
265. Bakris, G. L. et al. Effect of Finerenone on Albuminuria in Patients With Diabetic Nephropathy: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* **314**, 884–894 (2015).
266. Wang, C. et al. Acetaminophen attenuates glomerulosclerosis in obese Zucker rats via reactive oxygen species/p38MAPK signaling pathways. *Free Radic. Biol. Med.* **81**, 47–57 (2015).
267. Kee, Y. K. et al. Determination of the optimal target level of proteinuria in the management of patients with glomerular diseases by using different definitions of proteinuria. *Medicine (Baltimore)* **96**, e8154 (2017).
268. Roudkenar, M. H. et al. Upregulation of neutrophil gelatinase-associated lipocalin, NGAL/Lcn2, in beta-thalassemia patients. *Arch. Med. Res.* **39**, 402–407 (2008).
269. Wolf, G. et al. Leptin stimulates proliferation and TGF-beta expression in renal glomerular endothelial cells: potential role in glomerulosclerosis [see comments]. *Kidney Int.* **56**, 860–872 (1999).
270. Ceriello, A. Is Oxidative Stress the Pathogenic Mechanism Underlying Insulin Resistance, Diabetes, and Cardiovascular Disease? The Common Soil Hypothesis Revisited. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, 816–823 (2004).