



HAL
open science

Effets bénéfiques de la finerénone, antagoniste du récepteur minéralocorticoïde, dans les conséquences cardiovasculaires d'un syndrome métabolique, chez des souris en conditions de post-ménopause ou après amaigrissement de souris mâles obèses.

Marie Pieronne Deperrois

► **To cite this version:**

Marie Pieronne Deperrois. Effets bénéfiques de la finerénone, antagoniste du récepteur minéralocorticoïde, dans les conséquences cardiovasculaires d'un syndrome métabolique, chez des souris en conditions de post-ménopause ou après amaigrissement de souris mâles obèses.. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2022. Français. NNT : 2022NORMR099 . tel-04621991

HAL Id: tel-04621991

<https://theses.hal.science/tel-04621991>

Submitted on 24 Jun 2024

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 SANTE

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

Effets bénéfiques de la finerénone, antagoniste du récepteur minéralocorticoïde, dans les conséquences cardiovasculaires d'un syndrome métabolique, chez des souris en conditions de post-ménopause ou après amaigrissement de souris mâles obèses.

Présentée et soutenue par
MARIE PIERONNE DEPERROIS

**Thèse soutenue le 05/05/2022
devant le jury composé de**

M. JEAN-PIERRE BENITAH	DIRECTEUR DE RECHERCHE, Université Paris-Saclay	Rapporteur du jury
M. BENJAMIN LAUZIER	MAITRE DE CONFERENCES HDR, UNIVERSITE NANTES	Rapporteur du jury
MME ESTELLE LOUISET	CHARGE DE RECHERCHE, Université de Rouen Normandie	Membre du jury
M. LAURENT SALLE	PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université de Caen Normandie	Membre du jury
MME JANE LISE SAMUEL	DIRECTEUR DE RECHERCHE, UNIVERSITE PARIS 6 PIERRE ET MARIE CURIE	Président du jury
M. ANTOINE OUVRARD-PASCAUD	MAITRE DE CONFERENCES, Université de Rouen Normandie	Directeur de thèse

**Thèse dirigée par ANTOINE OUVRARD-PASCAUD (ENDOTHELIUM,
VALVULOPATHIES ET INSUFFISANCE CARDIAQUE)**



Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat
Spécialité SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE
Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

Effets bénéfiques de la finerénone, antagoniste du récepteur minéralocorticoïde, dans les conséquences cardiovasculaires d'un syndrome métabolique, chez des souris en conditions de post-ménopause ou après amaigrissement de souris mâles obèses.

Présentée et soutenue par
MARIE PIERONNE DEPERROIS

Thèse soutenue le 05/05/2022
devant le jury composé de

M. JEAN-PIERRE BENITAH	DIRECTEUR DE RECHERCHE, Université Paris-Saclay	Rapporteur du jury
M. BENJAMIN LAUZIER	MAITRE DE CONFERENCES HDR, UNIVERSITE NANTES	Rapporteur du jury
MME ESTELLE LOUISET	CHARGE DE RECHERCHE, Université de Rouen Normandie	Membre du jury
M. LAURENT SALLE	PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université de Caen Normandie	Membre du jury
MME JANE LISE SAMUEL	DIRECTEUR DE RECHERCHE, UNIVERSITE PARIS 6 PIERRE ET MARIE CURIE	Membre du jury
M. ANTOINE OUVRARD-PASCAUD	MAITRE DE CONFERENCES, Université de Rouen Normandie	Directeur de thèse

**Thèse dirigée par ANTOINE OUVRARD-PASCAUD (ENDOTHELIUM,
VALVULOPATHIES ET INSUFFISANCE CARDIAQUE),**

« C'est une grande folie que de vouloir être sage tout seul. »

Baruch Spinoza

« People should pursue what they're passionate about. That will make them happier than pretty much anything else. »

Elon Musk

« Si tu veux construire un bateau, ne rassemble pas tes hommes et femmes pour leur donner des ordres, pour expliquer chaque détail, pour leur dire où trouver chaque chose... Si tu veux construire un bateau, fais naître dans le cœur de tes hommes et femmes le désir de la mer »

Antoine de Saint-Exupéry

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble de mon jury de thèse, Monsieur le Docteur Jean-Pierre Bénitah, Monsieur le Docteur Benjamin Lauzier, Monsieur le Professeur Laurent Sallé, Madame le Docteur Jane-Lise Samuel et Madame le Docteur Estelle Louiset, qui ont accepté de lire cette thèse, de la critiquer et de la discuter. J'ai bien conscience de la chance d'avoir un tel jury, couvrant tous les domaines ou presque abordés dans cette thèse.

Ce travail n'aurait pas été possible sans le soutien de l'Université de Rouen Normandie et de Bayer Pharma, qui m'ont permis, grâce à une allocation de recherche et diverses aides financières, de me consacrer à l'élaboration de ma thèse.

Je remercie chaleureusement toutes les personnes qui m'ont aidée pendant l'élaboration de ma thèse et spécialement mon directeur de thèse Monsieur le Docteur Antoine Ouvrard-Pascaud, pour son travail de supervision.

Je tiens à remercier particulièrement Monsieur le Professeur Vincent Richard de m'avoir accueillie dans son laboratoire et de m'avoir fait confiance dans l'élaboration de ma thèse. Je vous remercie sincèrement pour votre disponibilité, votre écoute et vos conseils qui m'ont grandement aidée au cours de ces dernières années.

Je tiens particulièrement à Monsieur le Professeur Paul Mulder. Merci de m'avoir tant appris, avec tant de bienveillance et tant de disponibilité. Merci de m'avoir guidée et conseillée, pour la technique comme pour la réflexion et l'écriture. Un grand merci pour ta bonne humeur invincible, ta passion pour la science, et pour toutes nos discussions autour d'un café.

Je remercie sincèrement Madame le Docteur Ebba Brakenhielm. Merci pour ta passion de la science, ton enthousiasme et ta grande pertinence qui ont été pour moi source d'inspiration. Merci également de m'avoir fait confiance pour participer à certains de tes projets, ce fut un réel plaisir de travailler avec toi.

Je voudrais remercier grandement Monsieur le Docteur Lionel Nicol, sans qui l'IRM de cette thèse n'existerait pas. Merci pour ton travail d'une rare qualité, et merci, surtout, pour ces discussions aussi philosophiques que passionnantes.

Je remercie sincèrement Madame le Docteur Isabelle Rémy-Jouet, qui a encadré mon premier stage dans le laboratoire avec une infinie gentillesse, et qui m'a toujours avec bienveillance transmis son savoir.

Ma chère Khedi, merci d'abord pour ton professionnalisme irréprochable, pour ton accueil si chaleureux dans le laboratoire et pour ta (très) grande patience. Et *surtout*, merci pour ton infinie gentillesse, merci d'être si rayonnante, mais également si attentive et tellement, tellement bienveillante. Je suis ravie et honorée d'avoir passé ces quelques années avec toi.

Sylvanie, un grand merci pour ta gentillesse exceptionnelle et ta bonne humeur si bienvenue. Merci pour ta contribution à l'élaboration de cette thèse, pour tout ce que tu m'as appris, et pour les expérimentations que tu as faites, menées avec cette rigueur et cette précision qui sont les tiennes. Ce fut un plaisir de partager ces journées avec toi.

Anaïs, je te remercie sincèrement pour ta disponibilité, ta bonne humeur et pour la grande qualité de ton travail. Merci d'avoir pris le temps de me partager ton savoir, et surtout un immense merci pour ta contribution à l'élaboration de cette thèse.

Nicolas, merci de m'avoir solidement conseillée concernant le Western Blot. Et merci, surtout, pour ta bonne humeur et ta générosité.

Saïda, un grand merci pour ta grande disponibilité, ton aide et pour ta bonne humeur. Bien que les occasions aient été rares, j'en garde un souvenir excellent.

Annie, merci de m'avoir si gentiment appris et de m'avoir aidée à mes débuts dans le laboratoire. Merci pour toutes tes petites attentions qui ont fait de ce laboratoire un lieu agréable à vivre.

Manon, merci pour ton professionnalisme et pour ta grande efficacité. Les occasions ont également été rares, mais toujours agréables.

Je tiens également à remercier les membres de mon comité de suivi de thèse, Monsieur le Docteur Renaud Lesourne, Monsieur le Docteur Renaud Lesourne, Monsieur le Docteur Jean-Christophe Avice et Madame le Docteur Camille Sautreuil, pour leur écoute, leur disponibilité et leurs conseils avisés.

Enfin, je remercie sincèrement Monsieur le Professeur Frédéric Jaisser de m'avoir temporairement accueillie dans son laboratoire parisien. Merci également pour tous vos conseils pertinents au cours de nos diverses collaborations ces dernières années. Merci également à Monsieur le Docteur Smail Messaoudi d'avoir pris le temps de me former au Western Blot. Merci à Monsieur le Docteur Benjamin Bonnard pour son aide précieuse au long de ces quatre dernières années, et enfin, merci à toute l'équipe parisienne pour son accueil chaleureux.

Merci à tous les collègues chercheurs rencontrés lors des divers congrès que j'ai pris plaisir à croiser au fil des ans. Merci à ceux qui m'ont posé des questions si pertinentes lors de mes présentations et qui m'ont permis d'améliorer ma réflexion scientifique. Merci également à Monsieur le Professeur Massimiliano Caprio pour sa grande pertinence scientifique lors de notre collaboration.

Merci à vous, qui étiez des collègues, et qui êtes devenus des amis. Merci à toi, Inès, qui la première m'a accueillie dans le laboratoire, avec cet enthousiasme et cette passion qui te fait aimer de tous. Merci pour tes conseils, pour le temps que tu as pris pour me montrer, alors que j'étais encore stagiaire, comment faire mes premiers pas dans ce domaine passionnant.

Un grand merci à toi, Jean, pour nos discussions, tes conseils et surtout pour cette façon que tu as, si belle, de voir la vie.

Merci à toi, Mouad, pour tes conseils, ta grande gentillesse, et pour ton incroyable capacité de travail, qui force l'admiration.

Ma chère Coraline. Quelle rencontre ! Merci, déjà, de m'avoir accompagnée, avec enthousiasme, courage et une indéfectible bonne humeur, dans nos plannings les plus fous. Et bravo à toi pour cette thèse brillamment menée, j'ai si hâte de voir la suite. Merci pour ton soutien et pour tes encouragements. Et merci *surtout*, d'être devenue une de ces amies que l'on se fait pour la vie.

Matthieu, merci pour ces années partagées au laboratoire. Un grand merci pour ton humour décapant qui tombe toujours à pic et pour ta très grande disponibilité. Merci à toi,

Camille, d'avoir accepté de rejoindre mon comité de suivi de thèse et pour ton incroyable gentillesse. Merci à vous deux pour cette amitié précieuse et ces moments partagés ensemble.

Hind, merci à toi pour ta gentillesse et ta bonne humeur. Et merci pour ce si bon gâteau que tu nous avais préparé ! Courage pour la fin de ta thèse et je te souhaite le meilleur pour la suite.

Merci enfin, à tous ceux avec qui je n'ai pas eu l'honneur de collaborer, mais qui savent faire au quotidien de ce laboratoire un lieu fort agréable.

Au terme de ce parcours, je remercie enfin celles et ceux qui me sont chers et que j'ai quelques peu délaissés ces derniers temps pour achever cette thèse. Leurs attentions et leurs encouragements m'ont accompagnée tout au long de ces années. Je remercie sincèrement mes parents pour leur soutien moral, leur confiance indéfectible, leur sagesse et leur amour infini. Merci également à mes grands-parents, pour leur incroyable soutien et leurs encouragements constants. Merci à Camille, ma chère sœur, et à Alexandre, mon frère adoré. Je n'aurai pu rêver grandir plus heureuse qu'auprès de vous, et je suis si fière de tout ce que vous avez déjà accompli. Merci également Annie et Jean-Pierre, pour ces week-ends si agréables passés ensemble et pour vos conseils et vos encouragements si précieux. Merci enfin, à Guillaume et Isa, pour tous les bons moments passés ensemble et que j'ai hâte de renouveler.

Merci aux amis de toujours ! Même si les occasions ne faisaient plus rares, vous n'avez pas perdu patience et je vous en remercie. Mathilde et David, merci pour cette hospitalité si chaleureuse et cette générosité qui font de chaque rencontre un moment inoubliable. Marianne et Julie, merci pour ces moments si précieux. Antoine, mon ami, merci de m'avoir ouvert les portes de ton havre de paix dans ce Cotentin que j'aime tant. Fabien, merci pour ton hospitalité, ta bonne humeur et pour tes incroyables talents de cuisinier. Claire, merci pour cette amitié forgée sur les bancs de l'ESITech, pour notre amour partagé des randonnées et pour les week-ends passés ensemble. Et un merci tout particulier à toi, François, pour nos discussions aussi tardives que passionnantes.

Dounia, merci d'être cette amie si formidable et depuis si longtemps. Merci pour cette gentillesse et cette générosité qui te caractérisent tant. Merci pour ta persévérance et ton

courage, ces grandes qualités que j'admire profondément et qui m'ont guidées pour repousser, maintes fois, des limites que je pensais avoir atteintes.

Merci à la Dream Team ! Merci les copines (et Thomas !) de m'avoir si bien accueillies dans ma nouvelle vie parisienne. Pour tous les bons moments passés ensemble, toutes nos sorties et surtout pour tous vos encouragements lors de la rédaction de ma thèse, merci du fond du cœur.

Enfin, merci à tous ceux qui, ayant croisé mon chemin, m'ont accordé un de ces sourires qui donne la force d'avancer plus vite et plus loin.

Mes derniers mots seront pour toi, Matthieu, qui m'a apporté au long de ces années un bonheur immense, une tendresse incommensurable, un soutien et des encouragements indéfectibles et une vie à deux toujours si simple et si joyeuse. Merci de faire de ma vie une si belle aventure.

Table des matières

Remerciements	4
Table des matières	10
Table des figures.....	13
Table des tableaux.....	15
Liste des abréviations	17
Résumé scientifique	23
Abstract	25
Préambule	27
Chapitre 1. Revue bibliographique.....	29
1. Le récepteur minéralocorticoïde	29
1.1. Généralités	29
1.2. Aldostérone	30
1.3. Mécanisme d'action	31
1.4. Sélectivité du récepteur minéralocorticoïde.....	35
1.5. Localisation tissulaire du récepteur minéralocorticoïde.....	36
1.6. Antagonistes du récepteur minéralocorticoïde	36
2. L'insuffisance cardiaque chronique.....	39
2.1. Le cœur et le cycle cardiaque.....	39
2.2. Définition de l'insuffisance cardiaque.....	40
2.3. Prise en charge de l'insuffisance cardiaque	62
3. Le syndrome métabolique.....	70
3.1. Définition	70
3.2. Généralités	71
3.3. Diagnostic	72
3.4. Etiologie.....	72
3.5. Physiopathologie du tissu adipeux.....	74
3.6. Thérapies actuellement utilisées.....	83
3.7. Conséquences du syndrome métabolique	83
3.8. Rôle du récepteur minéralocorticoïde dans le syndrome métabolique	86
4. Insuffisance rénale, diabète de type II et événements cardiovasculaires	88
Rationnel	89
Chapitre 2. Matériel et Méthodes.....	91
2.1. Modèles animaux et conditions expérimentales	91
2.1.1. Etude 1.....	91
2.1.2. Etude 2.....	92

2.2. Paramètres métaboliques	93
2.2.1. Composition corporelle par Echo-IRM	93
2.2.2. Test de sensibilité à l'insuline	94
2.2.3. Test de sensibilité au glucose	94
2.2.4. Profil métabolique plasmatique	94
2.2.5. Pesée du gras sous-cutané	95
2.3. Paramètres cardiovasculaires	95
2.3.1. Pléthysmographie.....	95
2.3.2. Echocardiographie.....	95
2.3.3. Paramètres hémodynamiques	98
2.3.4. Fonction coronaire isolée	99
2.3.5. IRM	101
2.3.6. Test à l'effort sur tapis de course	102
2.3.7. Test de stress.....	103
2.3.6. Histologie cardiaque.....	104
2.3.7. Mesure du stress oxydatif des mitochondries du ventricule gauche.....	107
2.3.8. Activité enzymatique mitochondriale	108
2.3.9. Evaluation de l'expression génique par RT-qPCR.....	108
2.3.10. Evaluation du stress oxydatif ventriculaire gauche par Résonance Paramagnétique Electronique	112
2.3.11. Identification des protéines cardiaque par Western Blot	114
2.4. Paramètres rénaux	116
2.4.1. Mesure de la protéinurie.....	116
2.4.2. Evaluation de l'expression génique par RT q-PCR.....	116
2.6. Analyses statistiques	116
Chapitre 3. Résultats	118
3.1. Etude 1.....	118
Données supplémentaires.....	132
Conclusion	137
3.2. Etude 2 : Modèle murin d'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée liée à la ménopause.....	139
Conclusion	158
Chapitre 4. Discussion générale	159
Conclusion	162
Revue bibliographique	163
Annexes	193

Table des figures

Figure 1. Représentation schématique du Récepteur Minéralocorticoïde. Adapté de Viengchareun <i>et al.</i> ⁸	30
Figure 2. Représentation schématique de la transactivation médiée par le RM. Adapté de Yang <i>et al.</i> et Berticchio <i>et al.</i> ^{14,15}	32
Figure 3. Système Rénine-Angiotensine-Aldostérone.....	34
Figure 4. Anatomie interne du cœur. Illustration originale	39
Figure 5. Phases du cycle cardiaque. Adapté de <i>Circulatory Physiology</i> 1.....	40
Figure 6. Evolution du nombre d'admissions pour insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée et pour insuffisance cardiaque à fraction réduite ⁵²	42
Figure 7. Classification échocardiographique de la dysfonction diastolique. Adapté de <i>Congestive Heart Failure – Diastolic Topic Review</i>	45
Figure 8. Etiologie de l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée. D'après <i>JACC Heart Fail</i> , 2014 ⁶⁸	47
Figure 9. Représentation des différences entre un cœur normal et un cœur atteint d'une dysfonction diastolique. D'après la banque d'images de Servier.	49
Figure 10. Physiopathologie du remodelage ventriculaire. D'Après McMurray <i>et al</i> ⁷⁴	50
Figure 11. Représentation schématique du rôle du RM dans l'inflammation et la fibrose. D'après Buonafine <i>et al.</i> ⁹⁹	54
Figure 12. Risque annuel de mortalité cardiovasculaire (échelle logarithmique) en fonction de l'âge de survenue de la ménopause ¹²⁷	60
Figure 13. Mode d'action et conséquence de la suractivation du récepteur minéralocorticoïde. Tiré de Kolhof <i>et al.</i> ¹⁷²	69
Figure 14. Impact physiopathologique de l'augmentation de la masse grasse sur l'inflammation, la fonction vasculaire et la nécrose en fonction de la sévérité de la dysfonction métabolique. D'après <i>Nature Review, Immunology</i>	81
Figure 15. Interaction des adipokines, cytokines et marqueurs inflammatoires contribuant au développement du syndrome métabolique et de ses complications ¹⁷⁸	86
Figure 16. Design expérimental de l'étude 1.	92
Figure 17. Design expérimental de l'étude 2.	93
Figure 18. Mode Temps Mouvement en échocardiographie et mesures associées.....	97
Figure 19. Exemple d'enregistrement de l'intervalle temps-vitesse en mode Doppler pulsé.....	97
Figure 20. Mode Doppler pulsé en échocardiographie permettant la mesure des vitesses des ondes E et A et l'obtention du ratio E/A.....	98
Figure 21. Prise de vue des courbes pression-volumes	99
Figure 22. IRM Brucker Biopsec 4.7 T/30 (Brucker, Allemagne) utilisée pour le petit animal.....	101
Figure 23. Images de coupes de ventricule gauche marquées pour les macrophages de types M1 et non-M1 (haut du panel) et pour les lymphocytes T (bas du panel).	133
Figure 24. Image de coupe du ventricule gauche (marquage CD31, FITC-WGA et coloration de Hoescht) montrant les membranes des cardiomyocytes, leurs noyaux et les vaisseaux.....	134
Figure 25. Représentation schématique de la stimulation par la leptine de la production d'aldostérone par les glandes surrénales.....	160

Table des tableaux

Tableau 1. Comparaison entre les différents antagonistes du récepteur minéralocorticoïde	38
Tableau 2. Classification NYHA de l'insuffisance cardiaque	41
Tableau 3. Classification du syndrome cardiorénal. D'après Ronco <i>et al.</i> ¹²³	58
Tableau 4. Rapport de risque concernant l'âge de la ménopause et la mortalité cardiovasculaire ajusté pour les facteurs de confusion potentiels. Adapté de van der Schouw <i>et al.</i> ¹²⁷	61
Tableau 5. Comparaison d'études cliniques multicentriques randomisés dans l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée.	63
Tableau 6. Critères retenus par l'American Heart Association et le National Heart, Lung, and Blood Pressure Institute (2005) pour le diagnostic du syndrome métabolique. Adapté de Grundy <i>et al.</i> ¹⁷⁷	70
Tableau 7. Critères relatifs au diagnostic du syndrome métabolique en fonction des organismes référents. D'après Skikanthan <i>et al.</i> ¹⁷⁸	71
Tableau 8. Statut en fonction de l'indice de masse corporelle	72
Tableau 9. Facteurs peptidiques et non peptidiques sécrétés par les adipocytes.	76
Tableau 10. Séquences des amorces utilisées pour la PCR	111
Tableau 11. Cholestérol et triglycérides plasmatiques après 16 semaines de régime HFD vs CTL.....	132
Tableau 12. Paramètres de strain après 21 semaines de protocole	132
Tableau 13. Paramètres inflammatoires évalués à partir de coupes de ventricule gauche congelées à -80°C puis immunomarquées pour permettre le comptage des cellules de type M1, non-M1, et des lymphocytes T	133
Table 14. RT-q-PCR permettant la quantification de l'expression de diverses cibles moléculaires d'intérêt dans le ventricule gauche après 24 semaines de protocole	134
Tableau 15. RT-q-PCR à partir de tissu rénal permettant de quantifier l'expression de gènes d'intérêt après 24 semaines de protocole	136

Liste des abréviations

A	Atrial
ACC	American College of Cardiology
ACE	Enzyme de Conversion de l'Angiotensine
ACTH	Hormone Adrénocorticotrope
ADP	Adénosine DiPhosphate
A/F	Acotinase / Fumarase
Ang II	Angiotensine II
ALDO-DHF	Aldosterone Receptor Blockade in Diastolic Heart Failure
ARB	Bloqueur du récepteur de l'Angiotensine
Arglu1	Protéine 1 riche en arginine et en glutamate
ATP	Adénosine TriPhosphate
BNP	Brain Natriuretic Peptide
BSA	Bovine Serum Albumin
CAMKII	Proteine kinase Ca ²⁺ /calmoduline-dépendante
CHARM	Candesartan in Heart Failure: Assessment of Reduction in Mortality and Morbidity
CTL	Contrôle
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
DC	Débit Cardiaque
DE	Dépense Energétique
DFR	Déféroxamine
DOCA	Deoxycorticosterone acetate
DPA TS/TD :	Diamètre de la paroi antérieure en télésystole/télédiastole
DPP TS/TD	Diamètre de la paroi postérieure en télésystole/télédiastole
E	Early
E2	Estradiol
ECG	ElectroCardioGramme
EDTA	Acide éthylène diamine tétra-acétique

EMPHASIS	Eplerenone in Patients with Systolic Heart Failure and Mild Symptoms
EPICA	Epidemiologia da Insuficiencia Cardiaca et Aprendizagem
ER	Récepteur à l'estrogène
ERO	Espèce Réactive de l'Oxygène
ESC	European Society of Cardiology
ETM	Ecart-type à la moyenne
FC	Fréquence Cardiaque
FE	Fraction d'éjection
FITC	Fluorescein IsoThioCyanate
FKBP4	FK506-binding protein 4
FKBP52	FK-binding protein 52
FR	Fraction de Raccourcissement
Gal-3	Galectine-3
GHSR-1a	Growth Hormone Secretagogue Receptor 1a
Glc	Glucose
GMPC	Guanosine MonoPhosphate Cyclique
GRE	Glucose Responsive Element
HDL-C	High-Density Lipoprotein-Cholesterol
HFD	High-Fat Diet
HRE	Hormone Response Element
HRPT1	Hypoxanthine Phosphoribosyltransférase 1
HTN	Hypertension
HS	High-Fat Diet Stop
HSP90	Heat Shock Protein 90
IC	Insuffisance Cardiaque
IC50	Concentration inhibitrice médiane
IEC	Inhibiteur de l'enzyme de conversion
IFM	Mitochondries Interfibrillaires
IKK	Kinase inhibitrice du facteur nucléaire κ - β

IL	Interleukine
IMC	Indice de Masse Corporelle
INSEE	Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques
I-PRESERVE	Irbesartan in Heart Failure with preserved Ejection Fraction
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
ITV	Intervalle Temps Vitesse
JNK	c-jun N-terminal kinase
KIM-1	Kidney Injury Molecule-1
KO	Knock-Out
LCN2	Lipocaline 2
LDL	Low-density Lipoprotein
LDL-C	Low-density Lipoprotein-Cholesterol
L-NNA	L-NG-NitroArginine
MAP	Mitogen-Activated Protein
MCP-1	Monocyte Chemotactic Protein-1
MCSA	Mean Cross Sectional Area
mmHg	Millimètre de mercure
MIF	Mitochondries InterFibrillaires
MMP	MétalloProtéases Matricielles
MSS	Mitochondries SubSarcolemmales
NAFLD	Nonalcoholic fatty liver disease
NASH	Nonalcoholic steatohepatitis
NGAL	Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin
•NO	Oxide Nitrique
NR3C2	Nuclear Receptor Subfamily 3 Group C Member 2
NYHA	New York Heart Association
OCDE	Organisation de Coopération et de Développement Economiques
OPTIMIZE-HF	Organized Program to Initiate Lifesaving Treatment in Hospitalized Patients with Heart Failure
p300/CBP	Histone acetyltransférase p300/CREB-binding protein

PAD	Pression Artérielle Diastolique
PAI-1	Plasminogen Activator Inhibitor 1
PAS	Pression Artérielle Systolique
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PECAM-1	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1
PEDF	Pigment Epithelium-Derived Factor
PEP-CHF	Preserved Perindropil in elderly people with chronic heart failure
PKA	Protéine Kinase A
PKG	Protéine Kinase G
PLB	Phospholamban
PTP1B	Protein-Tyrosine Phosphatase 1B
PTPN1	Protein Tyrosine Phosphatase Non-Receptor Type 1
RGS2	Régulateur de la signalisation des protéines G 2
RM	Récepteur Minéralocorticoïde
RPE	Résonance Paramagnétique Electronique
RVU	Relative Volume Unit
Ryr2	Récepteur à la Ryanodine de type 2
SERCA	Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca ²⁺ -ATPase
Sgk1	Kinase 1 sérique et régulée par les glucocorticoïdes
SNP	Nitroprussiate de Sodium
SRAA	Système Rénine-Angiotensine-Aldostérone
SRC1	Steroid Receptor Activator 1
SSM	Mitochondries Subsarcolemmales
TA	Température Ambiante
TBS	Tris-Buffered Saline
TBS-T	Tris-Buffered Saline-Tween
TGF-β	Facteur de croissance transformant-β
TIMP	Tissue Inhibitor of MetalloProtease
TNF	Facteur de Nécrose Tumorale

TOPCAT	Treatment of Preserved Cardiac Function Heart Failure with an Aldosterone Antagonist
UA	Unité Arbitraire
UCP-1	Uncoupling Protein-1
VE	Volume d'Ejection
VG	Ventricule Gauche
WGA	Wheat Germ Agglutinin
WT	Wild-Type

Résumé scientifique

Les patients obèses et les femmes en postménopause montrent une prévalence plus élevée de dysfonction diastolique ventriculaire gauche, pouvant évoluer en insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée. A ce jour, aucune stratégie thérapeutique n'est adaptée à ces patients. Néanmoins, il a été montré que le système rénine-angiotensine-aldostérone était pathologiquement suractivé dans un contexte d'insuffisance cardiaque. C'est pourquoi nous avons testé l'efficacité de la finérénone, un antagoniste du récepteur minéralocorticoïde non-stéroïdien, dans deux modèles murins d'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée.

La première étude porte sur des souris mâles nourries par un régime riche en graisse pendant 16 semaines. Au terme de ces 16 semaines, le régime alimentaire est normalisé pour deux groupes de souris, dont un reçoit le traitement par la finérénone pendant 8 semaines. Les résultats obtenus montrent que l'amaigrissement conduit à une amélioration des paramètres métaboliques, mais que seul l'ajout du traitement par la finérénone permet une amélioration franche de la dysfonction diastolique et de la capacité d'exercice.

La seconde étude porte sur des souris ovariectomisées à l'âge de 4 mois puis traitées par la finérénone pendant 1 mois à l'âge de 7 mois. Les résultats obtenus montrent une amélioration de la dysfonction diastolique, soutenue par une amélioration de la fonction coronaire et de la capacité d'exercice.

En conclusion, la finérénone améliore la dysfonction cardiovasculaire, la fonction coronaire et la capacité d'exercice dans ces deux modèles murins de dysfonction diastolique associée à une altération des paramètres métaboliques. Ces études soulignent l'intérêt du récepteur minéralocorticoïde comme cible pharmacologique dans le traitement de l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée.

Abstract

Obese patients and postmenopausal women show a higher prevalence of left ventricular diastolic dysfunction, which may progress to heart failure with preserved ejection fraction. To date, no therapeutic strategy is adapted to these patients. Nevertheless, it has been shown that the renin-angiotensin-aldosterone system is pathologically overactivated in heart failure. In this context, we tested the efficacy of finerenone, a non-steroidal mineralocorticoid receptor antagonist, in two mouse models of heart failure with preserved ejection fraction.

The first study involved mice fed a high-fat diet for 16 weeks. At the end of 16 weeks, the diet was normalized in two groups of mice, one of which received treatment with finerenone for 8 weeks. The results show that normalization of the diet shows an improvement of the metabolic parameters, but only the addition of the finerenone treatment allows a clear improvement of the diastolic dysfunction and of the exercise capacity.

The second study involved ovariectomized mice at 4 months of age and then treated with finerenone for 1 month at 7 months of age. The results show an improvement in diastolic dysfunction, supported by an improvement in coronary function and exercise capacity.

In conclusion, finerenone improves cardiovascular dysfunction, coronary function, and exercise capacity in these two mouse models of diastolic dysfunction associated with altered metabolic parameters. These studies highlight the interest of the mineralocorticoid receptor as a pharmaceutical target in the treatment of heart failure with preserved ejection fraction.

Préambule

Les maladies cardiovasculaires constituent la première cause de mortalité dans le monde, touchant environ 2% de la population ¹. En dépit des différentes stratégies thérapeutiques existantes, la prévalence de l'insuffisance cardiaque ne cesse de s'accroître, représentant environ 32% des décès en 2021 d'après l'Organisation Mondiale de la Santé. En parallèle, l'obésité conditionne l'apparition de comorbidités variées, telles que le diabète et l'hypertension, engendrant un contexte pathologique complexe propice au développement de pathologies cardiovasculaires, et particulièrement d'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée, contre lesquelles l'arsenal pharmacologique actuel est insuffisant. En outre, la progression de l'incidence de l'obésité dans le monde, en dépit des actions de prévention menées à l'échelle mondiale, soulignent la nécessité de développer de nouvelles thérapies.

Chapitre 1. Revue bibliographique

1. Le récepteur minéralocorticoïde

1.1. Généralités

Le récepteur minéralocorticoïde (RM) est une protéine de la super famille des récepteurs nucléaires, appartenant au groupe des récepteurs stéroïdiens. Il agit comme un facteur de transcription lorsqu'il est activé par la liaison avec son ligand. Mesurant approximativement 450 kb, il est codé par le gène *NR3C2* (Nuclear Receptor Subfamily 3 Group C Member 2), situé au locus 4q31.1-31.2^{2,3} et est composé de dix exons, dont 8 sont codants. Le RM est constitué de trois domaines fonctionnels (Figure 1) :

- Un domaine N-terminal, codé par l'exon 2, responsable du recrutement de co-régulateurs modulant l'activité transcriptionnelle du RM,
- Un domaine de liaison à l'ADN, codé par les exons 3 et 4, présentant deux motifs en doigt de zinc qui permettent la liaison à l'ADN et la dimérisation du RM,
- Un domaine de liaison au ligand, codé par les exons 5 à 10, qui permet l'interaction entre le RM et son ligand. Ce domaine interagit également avec les protéines chaperonnes (*heat shock protein 90*, hsp90 ou *FK506-binding protein 4*, FKBP4) qui permettent le maintien du RM dans le cytoplasme⁴⁻⁷.

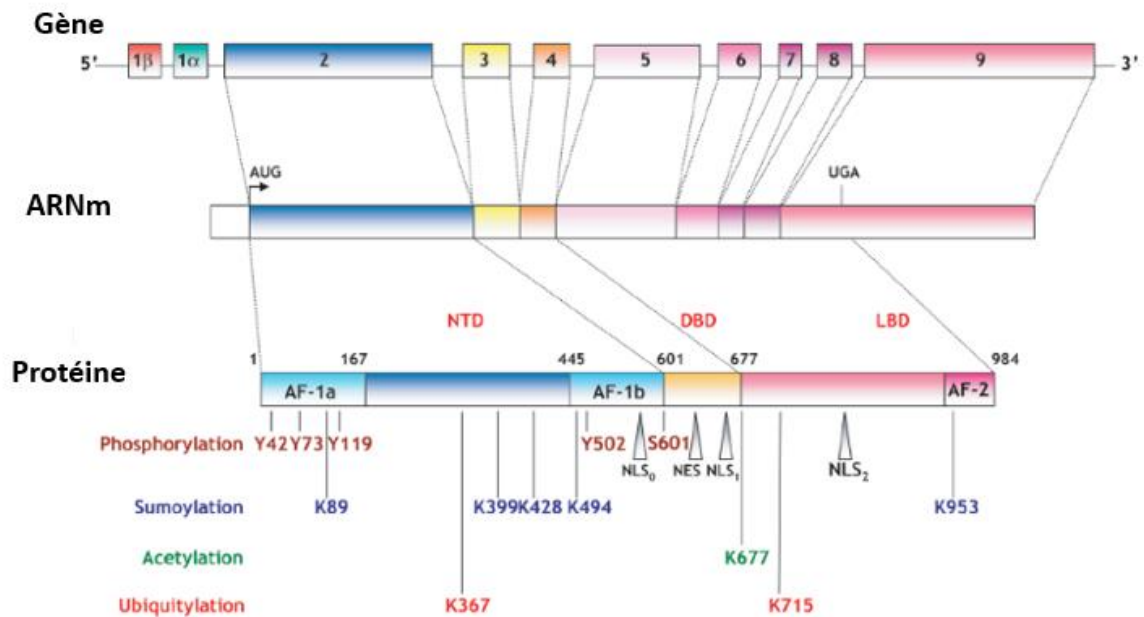


Figure 1. Représentation schématique du Récepteur Minéralocorticoïde. Adapté de Viengchareun *et al.* ⁸.

Le gène codant pour le RM est composé de 10 exons dont 8 sont codants pour l'ARN messager (ARNm). Le RM est composé de 3 régions : une région N-terminale (NTD, codée par l'exon 2), une région de liaison à l'ADN (DBD, codée par les exons 2 et 3) et une région de liaison au ligand (LBD, codés par les exons 5 à 9). Différentes modifications post-traductionnelles peuvent affecter le RM, telles que la phosphorylation, la sumoylation, l'acétylation ou l'ubiquitylation.

1.2. Aldostérone

L'aldostérone, hormone stéroïdienne terminale du système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA) et ligand « naturel » du RM, est synthétisée dans la *zona glomerulosa* du cortex surrénalien. Comme l'ensemble des hormones stéroïdes, elle est dérivée du cholestérol. Le cholestérol est converti en progestérone, en désoxycorticostérone, en corticostérone, puis enfin en aldostérone sous l'effet de réactions dans la mitochondrie et dans le réticulum endoplasmique lisse. La synthèse et la sécrétion de l'aldostérone sont dépendantes de l'angiotensine II, du potassium, de l'hormone adrénocorticotrope (ACTH) et de la leptine ⁹.

L'aldostérone est un composant clé du SRAA, qui permet le maintien de l'équilibre hydrosodé en régulant la réabsorption d'eau, de sodium et de potassium par son action au niveau rénal ¹⁰.

1.3. Mécanisme d'action

En absence de son ligand, le RM est maintenu inactif dans le cytoplasme par des protéines chaperonnes (hsp90, FKBP51). La liaison du RM avec l'aldostérone induit un changement de conformation permettant le recrutement de la *FK-binding protein 52* (FKBP52) puis l'internalisation du complexe dans le noyau cellulaire ¹¹. La dissociation des protéines chaperonnes permet ensuite la dimérisation du RM et son adressage à l'ADN sur ses régions spécifiques *Hormone Response Element* (HRE). Ici, différentes protéines co-régulatrices, parmi lesquelles le *steroid receptor activator* (SRC1) ou l'*histone acetyltransferase p300/CREB-binding protein* (p300/CBP) sont recrutées pour permettre la transcription du gène cible du RM ¹²⁻¹⁴ (Figure 2).

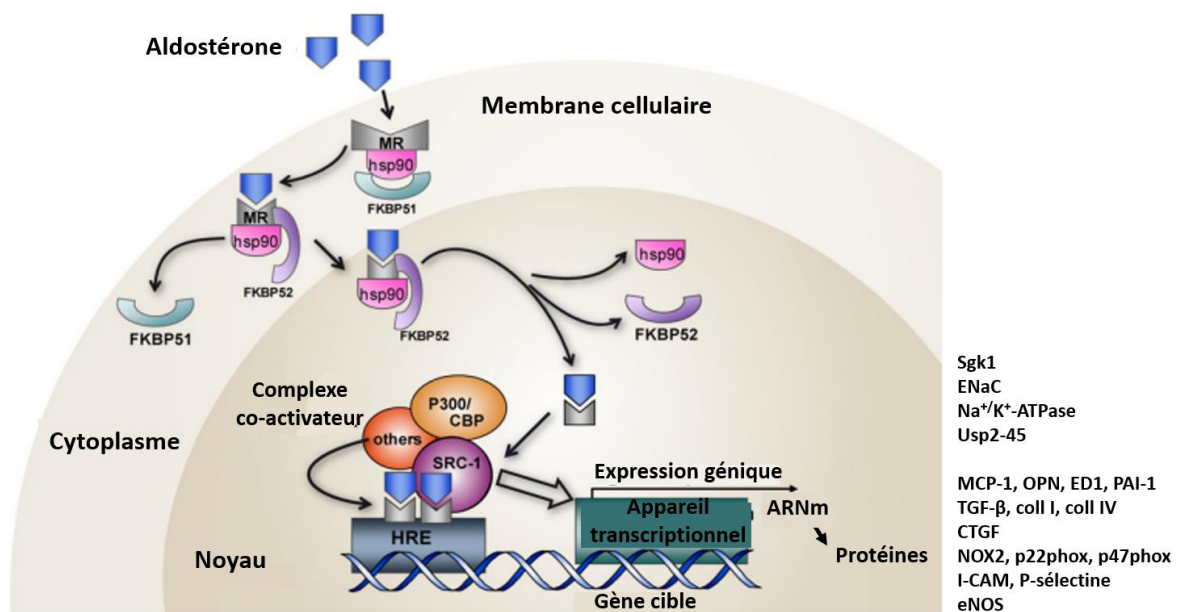


Figure 2. Représentation schématique de la transactivation médiate par le RM. Adapté de Yang *et al.* et Berticchio *et al.* ^{14,15}.

Dans le cytoplasme, le RM est maintenu sous forme inactive par des protéines chaperonnes telles que hsp90 ou FKBP51. La liaison du RM à son ligand entraîne un changement de conformation permettant le recrutement de FKBP52 et l'internalisation du complexe RM/Ligand/FKBP52 dans le noyau cellulaire. Dans le noyau, les protéines chaperonnes se dissocient et le RM se dimérise au niveau des HRE. Ensuite, des co-activateurs tels que SRC-1 ou l'histone acetyltransferase p300/CREB-binding protein (CBP) sont recrutés pour permettre la transcription du gène cible du RM en ARN messager (ARNm) puis en protéines, parmi lesquelles : Serum and Glucocorticoid-regulated Kinase 1 (Sgk1), Epithelial sodium channel (ENaC), Na⁺/K⁺-ATPase, Ubiquitin-specific protease (Usp2-45), monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), osteopontin (OPN), ectodysplasine-A (ED1), plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), Transforming Growth Factor β (TGF-β), Collagen type I (coll I), collagen type IV (coll IV), connective tissue growth factor (CTGF), NADPH oxidase 2 (NOX2), α-subunit of the flavocytochrome b558 (p22phox), neutrophil cytosol factor 1 (p47phox), intercellular adhesion molecule (I-CAM), P-sélectine et endothelial nitric oxide synthase (eNOS).

1.3.1. En conditions rénales physiologiques

La baisse de perfusion rénale et de la concentration en Na⁺ intra-tubulaire au niveau du tubule contourné distal du néphron, perçue par les cellules de l'appareil juxtaglomérulaire, entraîne la sécrétion par celui-ci de la rénine. La rénine permet la conversion de l'angiotensinogène produit par le foie en angiotensine I, converti à son tour en angiotensine II (AII) par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) exprimée à la membrane des cellules endothéliales. L'AII exerce une action vasoconstrictrice, via les récepteurs AT1 des cellules musculaires lisses vasculaires (favorisant une augmentation de la pression artérielle) et stimulant la synthèse et sécrétion d'aldostérone par les cellules de la zone glomérulée de la glande surrénale. L'aldostérone augmente la réabsorption de Na⁺ dans les parties distales

du néphron, conjointement à une augmentation de la volémie dans une action synergique avec l'arginine-vasopressine (qui augmente le nombre qu'aquaporines dans le tubule collecteur du néphron), participant ainsi au contrôle de la volémie et donc de la pression artérielle. Simultanément à la réabsorption de Na^+ , l'aldostérone induit une sécrétion de K^+ . Enfin, une augmentation de K^+ stimule la synthèse d'aldostérone (Figure 3).

Plus précisément, le RM permet la régulation du transport du glucose à travers l'épithélium du néphron distal en initiant la cascade de signalisation permettant le contrôle de l'insertion membranaire ou, si le RM est bloqué par un antagoniste, la dégradation d'ENaC¹⁶. Le transport de l'ENaC induit par le RM est en majeure partie liée à l'action de la kinase 1 sérique et régulée par les glucocorticoïdes (Sgk1), qui phosphoryle et désactive l'ubiquitine ligase Nedd42. En présence d'aldostérone, l'activité de la Nedd42 est inhibée par la Sgk1, ce qui permet l'insertion à la membrane des vésicules ENaC et induit ainsi le transport du sodium.

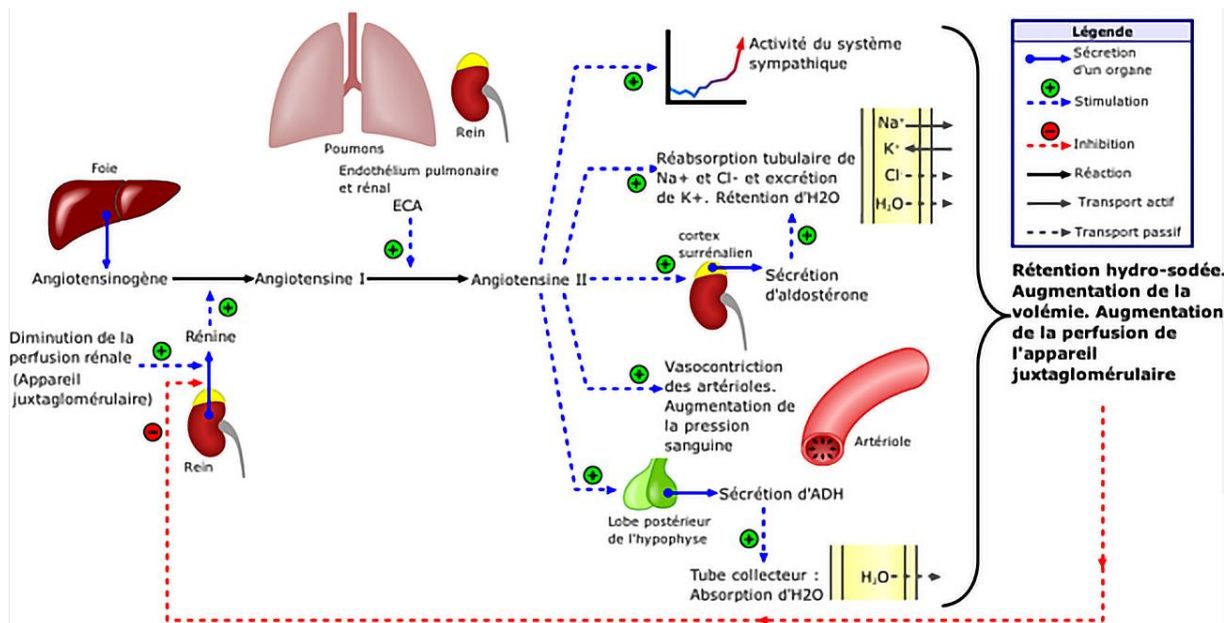


Figure 3. Système Rénine-Angiotensine-Aldostérone

La baisse de perfusion rénale et de la concentration en Na^+ intra-tubulaire au niveau du tubule contourné distal du néphron, perçue par les cellules de l'appareil juxtaglomérulaire, entraîne la sécrétion par celui-ci de rénine. La rénine permet la conversion de l'angiotensinogène produit par le foie en angiotensine I, convertie à son tour en angiotensine II (AII) par l'ACE exprimée à la membrane des cellules endothéliales. L'AII exerce une action vasoconstrictrice, via les récepteurs AT1 des cellules musculaires lisses vasculaires (favorisant une augmentation de la pression artérielle) et stimulant la synthèse et sécrétion d'aldostérone par les cellules de la zone glomérulée de la glande surrénale. L'aldostérone augmente la réabsorption de Na^+ dans les parties distales du néphron, conjointement à une augmentation de la volémie dans une action synergique avec l'arginine-vasopressine (qui augmente le nombre qu'aquaporines dans le tubule collecteur du néphron), participant ainsi au contrôle de la volémie et donc de la pression artérielle. Simultanément à la réabsorption de Na^+ , l'aldostérone induit une sécrétion de K^+ . Enfin, une augmentation de K^+ stimule la synthèse d'aldostérone

Le RM est également impliqué dans la régulation des flux d'hydrogène et de potassium dans les cellules rénales. Ce transport peut être actif ou passif ¹⁷.

1.3.2. En conditions rénales pathologiques

En conditions pathologiques, des effets directs de l'aldostérone sont médiés par le RM, induisant une inflammation tubulo-interstitielle puis une fibrose rénale. Au-delà de son effet sur les cellules tubulaires du néphron distal, le RM est exprimé dans d'autres types cellulaires rénaux : les podocytes, les cellules mésangiales et les cellules endothéliales. La liaison au RM entraîne des effets délétères sur ces cellules : apoptose des podocytes, prolifération et déformation des cellules mésangiales, entraînant une inflammation, une fibrose et une

sclérose des structures glomérulaires et interstitielles. Le blocage du RM par la spironolactone, un antagoniste du RM (15 mg/kg), induit une rémission de la glomérulosclérose et diminue l'hypertrophie cardiaque dans l'insuffisance rénale chronique ¹⁸. Plus généralement, le blocage du RM dans un contexte d'insuffisance rénale a montré des effets bénéfiques ^{19,20}.

1.3.3. Mécanismes d'activation alternatifs

Il a été montré que le RM pouvait être activé indépendamment de la présence d'un ligand par le biais de Rac1, protéine appartenant à la famille des Rho GTPases dans un contexte de pathologies avec protéinurie, mais également d'hypertension artérielle systémique. Ce dernier résultat est intéressant car il offre une piste d'explication concernant les bénéfices des antagonistes du RM même en l'absence d'hyperaldostéronisme ^{21,22}.

1.4. Sélectivité du récepteur minéralocorticoïde

Les hormones glucocorticoïdes, telles que le cortisol, appartiennent au groupe des hormones stéroïdes et sont également dérivées du cholestérol. Leur récepteur spécifique est le récepteur aux glucocorticoïdes, mais elles sont également capables de se lier au RM avec une affinité similaire (constante de dissociation, $K_d = 0.5-2$ nM). De plus, la concentration plasmatique des glucocorticoïdes est 100 à 1000 fois supérieure à celle de l'aldostérone. Le RM peut également se lier, bien qu'avec une affinité moindre, avec les androgènes ou la progestérone ⁸. Dès lors, la sélectivité enzymatique minéralocorticoïde repose sur l'enzyme 11- β HSD2 (11- β -hydroxystéroïde déshydrogénase de type 2), capable de transformer le cortisol en cortisone ou en déhydrocorticostérone, molécules ayant une faible affinité pour le RM ^{23,24}. La co-localisation de la 11- β HSD2 et du RM est donc nécessaire dans les tissus pour permettre la liaison de l'aldostérone au RM et l'induction des voies de signalisation médiées par ce complexe.

La sélectivité du RM repose sur des changements conformationnels induits par le ligand, qui diffèrent entre les glucocorticoïdes et les minéralocorticoïdes, conduisant à des capacités de transactivation différentielles ²⁵. Si le cortisol et l'aldostérone se lient au RM avec une affinité similaire, leurs constantes de dissociation sont différentes. Il a été montré que l'aldostérone se dissocie plus lentement du RM que le cortisol, ce qui suggère que le complexe aldostérone-RM est plus stable. De plus, la caractérisation des interactions N-/C-terminales sont plus fortes en présence d'aldostérone que de cortisol. Ceci implique que les contacts

intramoléculaires directs peuvent favoriser une transconformation dépendante du ligand conduisant au recrutement spécifique de co-régulateurs. Ainsi, la perturbation de ces interactions N-/C- terminales par l'antagoniste spironolactone peut conduire à l'inhibition du RM ²⁶.

1.5. Localisation tissulaire du récepteur minéralocorticoïde

Le clonage du RM en 1987 a permis de localiser l'expression du RM dans les tissus ²⁷. Ainsi, au-delà de son rôle historique rénal, le RM a également été trouvé dans le colon et les glandes sudoripares où il joue un rôle dans le transport de sodium et de potassium, dans des cellules non-épithéliales telles que les cardiomyocytes, les cellules endothéliales et musculaires lisses vasculaires. Le RM a également été identifié dans l'hippocampe, les glandes salivaires, les fibroblastes, les macrophages et les adipocytes ^{25,28,29}.

1.6. Antagonistes du récepteur minéralocorticoïde

Les dernières décennies de recherche ont montré de nombreux effets bénéfiques des antagonistes du RM dans plusieurs pathologies.

Découverte en 1960, la spironolactone, un antagoniste stéroïdien du RM, a d'abord été indiquée dans le traitement des maladies œdémateuses, l'hyperaldostéronisme primaire et l'hypertension artérielle ³⁰. Elle fut ensuite impliquée dans le traitement de l'insuffisance cardiaque en 1995. La spironolactone présente une forte affinité avec le RM, qu'elle déstabilise en facilitant la libération de la hsp90 ³¹. Toutefois, sa capacité de liaison aux récepteurs à la progestérone et aux androgènes due à sa structure stéroïdienne entraîne des effets secondaires tels que la gynécomastie, des troubles du cycles menstruels et de l'impuissance ³².

Dans une volonté de limiter ces effets secondaires, une seconde génération d'antagonistes du RM a été développée, dont l'eplerenone, qui présente une plus grande spécificité envers le RM. Il a été montré que l'eplerenone est capable de déstabiliser le RM, mais possède une affinité pour le récepteur inférieure à celle de la spironolactone et une demi-vie plus faible, ce qui conduit à une dose et une fréquence d'administration plus élevée pour obtenir un effet similaire ^{33,34}.

Néanmoins, un effet secondaire majeur lié à l'utilisation de ces deux molécules stéroïdiennes est le risque de développer une hyperkaliémie. Cet effet secondaire a conduit à

la contre-indication de la prescription de la spironolactone et l'éplerenone dans des conditions d'insuffisance cardiaque et/ou d'insuffisance rénale. En effet, le risque de développer une hyperkaliémie a été estimée à 41.4% des patients souffrant d'insuffisance cardiaque pour une dose de spironolactone de 50 mg (essai clinique RALES) et à 11% pour une dose d'éplerenone de 50mg (essai clinique EMPHASIS-HF) ^{35,36}.

Considérant les effets potentiellement bénéfiques de l'antagonisme du RM dans différentes pathologies ainsi que les effets secondaires pouvant conduire à des contre-indications, une troisième génération d'antagoniste du RM a été développée. Cette génération est constituée de molécules non-stéroïdiennes, parmi lesquelles la finérénone.

Développée par Bayer, la finérénone a une structure dihydropyridine qui agit comme un antagoniste du RM (concentration inhibitrice médiane, $IC_{50} = 18nM$) ³⁷. De plus, la finérénone n'a à priori pas d'affinité pour le canal Ca^{2+} de type-L ($IC_{50} > 10 \mu M$) ³⁸. Le tableau 1 synthétise les différentes propriétés relatives à la spironolactone, l'éplerenone et la finérénone.

Tableau 1. Comparaison entre les différents antagonistes du récepteur minéralocorticoïde

	Classe d'ARM	Spironolactone	Eplerenone	Finérénone
		Stéroïdien	Stéroïdien	Non-stéroïdien
Puissance et sélectivité	Puissance	élevée	faible	Elevée
	Sélectivité	faible	Intermédiaire	Elevée
Mode de liaison	Mode d'antagonisme	Passif	Passif	Encombrement
	MR S810L	Agoniste partiel	Agoniste partiel	Antagoniste
Pharmacocinétique	Métabolites	Multiple, actif	Pas de métabolite actif	Pas de métabolite actif
	Demi-vie (volontaires sains/patients)	Long (>12h/≥24h)	Intermédiaire/court (3h/4-6h)	Court (2.2-2.8h)
Propriétés physicochimiques et distribution	Lipophilie (log D)	3.13	3.03	2.40
	Liaison aux protéines plasmatiques	Elevée (>90%), principalement CBG et albumine	Faible (50%), principalement AGP	Elevée (90%)
	Distribution tissulaire (chez les rongeurs)	Plus élevée dans le rein (au moins 6 fois)	Plus élevée dans le rein	Equilibrée (1 :1)

La finérénone a une puissance et une sélectivité élevées pour le RM (500 fois plus importante que pour les autres récepteurs stéroïdiens), et agit par encombrement du récepteur, contrairement à la spironolactone et l'eplerenone ³⁷.

De plus, il a été montré *in vitro* que la finérénone permet le blocage du récepteur minéralocorticoïde *wild-type* (WT) mais également du mutant S810L, qui est responsable de l'hypertension précoce chez les hommes et de l'hypertension gestationnelle chez les femmes. La progestérone ainsi que la spironolactone et l'eplerenone activent paradoxalement le RM S810L mutant ^{39,40}. De plus, la finérénone serait plus efficace que la spironolactone pour retarder l'internalisation du complexe aldostérone/RM dans le noyau ⁴⁰. Enfin, une étude menée chez le rat suggère une distribution équivalente de la finérénone entre les reins et le cœur, contrairement à l'eplerenone qui serait 3 fois plus présente dans les reins que dans le cœur ⁴¹.

Avant d'aborder le rôle du RM et les effets bénéfiques liés à son antagonisme dans le système cardiovasculaire, rénal et son implication au niveau adipocytaire, je souhaite introduire l'insuffisance cardiaque et le syndrome métabolique, pathologies qui sont au cœur de ce projet de thèse et dont l'état de l'art actuel permet de comprendre la nécessité de

mettre en place de nouvelles stratégies thérapeutiques. Les critères de diagnostic existant en clinique seront également décrits, car l'évaluation fonctionnelle de nos animaux repose sur ces mesures.

2. L'insuffisance cardiaque chronique

2.1. Le cœur et le cycle cardiaque

Le cœur est un organe fibromusculaire assurant la circulation du sang dans l'organisme (Figure 4).

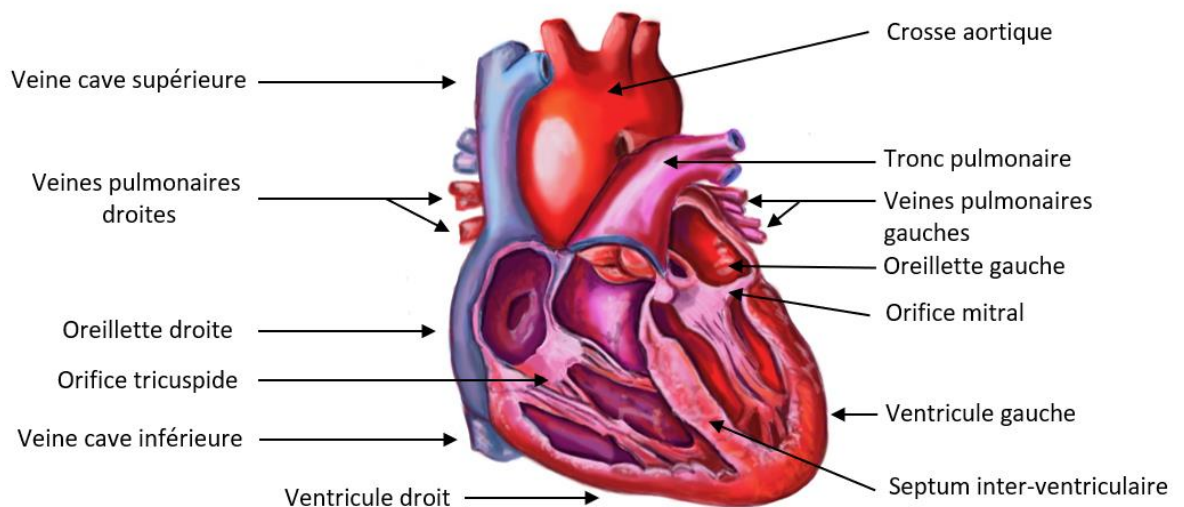


Figure 4. Anatomie interne du cœur. Illustration originale.

Le cœur est constitué de deux atriums et deux ventricules. La séparation entre l'atrium et le ventricule est marquée à gauche par la valve mitrale, et à droite par la valve tricuspide, dont le rôle est d'empêcher le reflux du sang. La paroi séparant les deux cavités est appelée septum interventriculaire. La vascularisation du cœur est réalisée par les artères coronaires, naissant précocement de l'aorte ascendante.

Le cycle cardiaque permet la circulation du sang désaturé en oxygène depuis l'atrium droit via les veines caves supérieures et inférieures jusqu'au ventricule droit, puis dans l'artère pulmonaire. Dans les poumons, le sang perd son dioxyde de carbone, gagne du dioxygène et revient dans l'oreillette gauche via les veines pulmonaires. Le sang progresse ensuite jusqu'au ventricule gauche où il sera pompé vers l'aorte, puis dans la circulation générale. Ces différentes étapes constituent le cycle cardiaque, divisé en systole et en diastole (Figure 5). Les pressions relatives à ces différentes étapes sont mesurées par hémodynamique invasive et permettent l'obtention des courbes pression-volume.

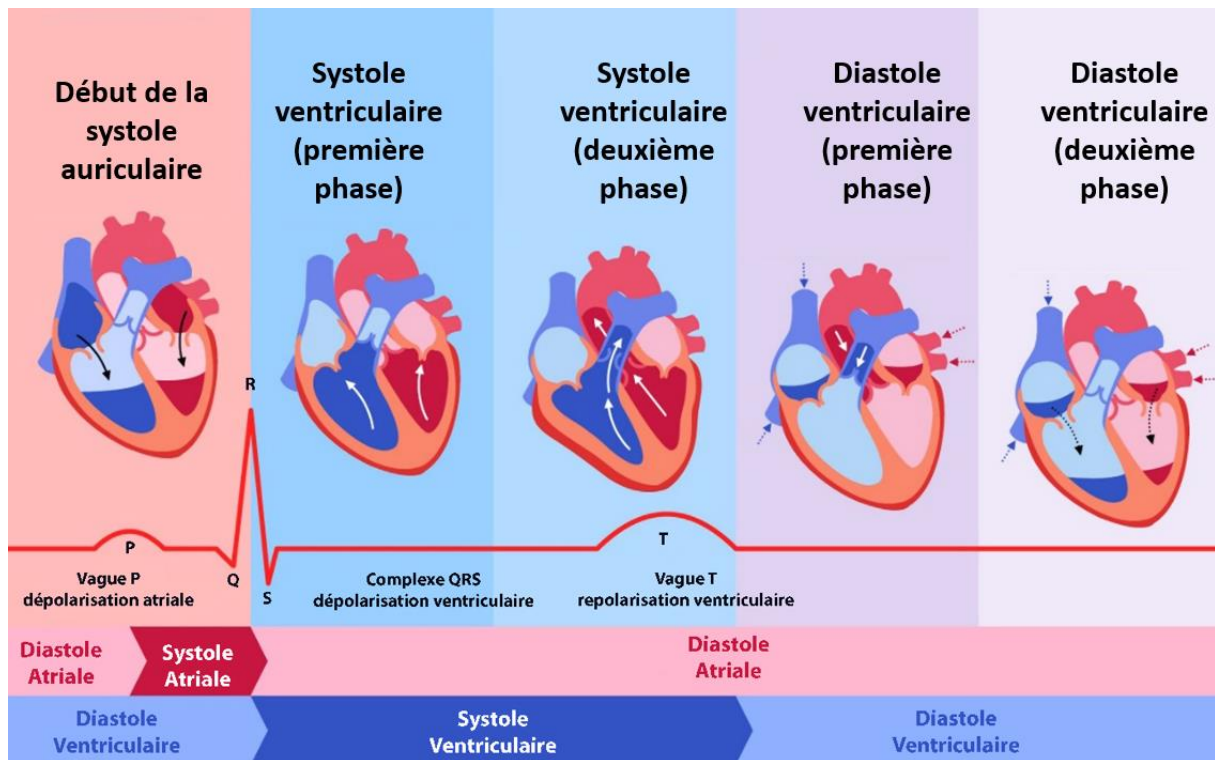


Figure 5. Phases du cycle cardiaque. Adapté de Circulatory Physiology 1.

Au début de la systole auriculaire, les oreillettes se contractent et chassent le sang dans les ventricules. Vient ensuite la première phase, la systole ventriculaire, marquée par le début de la contraction ventriculaire et la fermeture des valves tricuspides et mitrales. En deuxième phase de la systole ventriculaire, on observe l'ouverture des valves pulmonaire et aortique et l'éjection du sang. Ensuite la diastole ventriculaire débute avec la fermeture des valves pulmonaires et aortique et l'entrée du sang dans les atriums. Enfin, la deuxième phase de la diastole ventriculaire concerne la relaxation ventriculaire et le remplissage passif des ventricules.

2.2. Définition de l'insuffisance cardiaque

L'insuffisance cardiaque représente l'incapacité du cœur à assurer un débit sanguin suffisant pour satisfaire les besoins de l'organisme et / ou des pressions de remplissage ventriculaire gauche anormalement élevées. D'un point de vue physiopathologique, l'insuffisance cardiaque se définit par un débit cardiaque trop faible pour subvenir aux besoins métaboliques ou à un débit cardiaque pseudo-normal en raison d'une compensation neuro-humorale, généralement marquée par une augmentation de la pression de remplissage du ventricule gauche ⁴².

La classification de la New York Heart Association (NYHA) est la méthode de référence pour évaluer les degrés d'insuffisance cardiaque selon 4 classes, basée sur le niveau de dyspnée ressentie par le patient (Tableau 2).

Tableau 2. Classification NYHA de l'insuffisance cardiaque

Classe 1	Patient porteur d'une cardiopathie mais sans aucune réduction de l'activité physique
Classe 2	Légère limitation de l'activité physique. Aucune gêne au repos mais l'activité quotidienne ordinaire entraîne une fatigue, une dyspnée ou des palpitations
Classe 3	Limitation marquée des activités physiques. Il n'y a pas de gênes au repos mais une activité moins importante qu'à l'accoutumée provoque des symptômes
Classe 4	Impossibilité de poursuivre une activité sans gêne : les symptômes de l'insuffisance cardiaque sont présents, même au repos, et la gêne est accrue par toute activité physique

2.2.1. Prévalence

Il s'agit d'une affection fréquente, avec une prévalence européenne estimée entre 1.5% et 4% augmentant avec l'âge ⁴³. Plus précisément, l'étude épidémiologique EPICA (Epidemiologia da Insuficiencia Cardíaca e Aprendizagem), conduite à la fin des années 1990 au Portugal, révèle une prévalence de 1,36% pour le groupe 25-49 ans, 2,93% pour le groupe 50-59 ans, 7,63% pour le groupe 60-69 ans, 12,67% pour le groupe 70-78 ans et 16,14% pour le groupe >80 ans ⁴⁴. Ce profil de distribution en fonction de l'âge a été attesté par différentes études menées en Espagne, Allemagne, Chine, etc. ^{42,45-47}. Une étude récente établie la prévalence de l'insuffisance cardiaque à 3.6% au Canada, entre 2.4-2.6% aux Etats-Unis, 4.0% en Allemagne, 1.4% en Italie, entre 1.3 et 3.5% en Chine, 0.3% en Inde et 1.2% en Australie ⁴³.

En France, les pathologies cardiovasculaires ont été la première cause de mortalité en France jusqu'en 2004, aujourd'hui dépassées par les maladies néoplasiques d'après l'INSEE (Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques).

On constate aujourd'hui une augmentation de la prévalence de l'insuffisance cardiaque dans les pays industrialisés, portée d'une part par le vieillissement de la population et d'autre part par une meilleure prise en charge des cardiopathies ischémiques, la réduction de celle-ci permettant une meilleure espérance de vie, mais aussi le développement d'autres pathologies telles que l'insuffisance cardiaque ⁴⁸⁻⁵¹ (Figure 6).

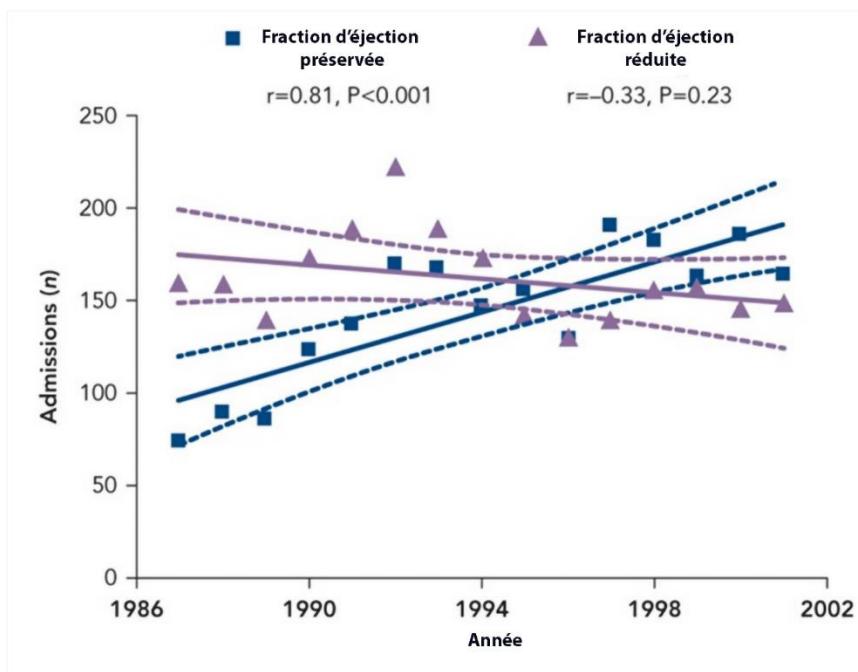


Figure 6. Evolution du nombre d'admissions pour insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée et pour insuffisance cardiaque à fraction réduite ⁵².

Les lignes pleines représentent les lignes de régression correspondant à l'année d'admission et au pourcentage de patients avec insuffisance cardiaque. Les lignes en pointillés représentent 95% d'indice de confiance. On observe une augmentation de la prévalence de l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée.

Les principaux facteurs de risques cardiovasculaires sont l'âge, le sexe, la sédentarité, l'obésité abdominale, le tabagisme, l'hypertension artérielle, l'hypercholestérolémie, les facteurs héréditaires et le stress ⁴⁷.

L'amélioration de la prise en charge thérapeutique ne suffit pas à contrebalancer le mauvais pronostic de cette pathologie, marqué par 50% de décès dans les quatre ans suivant le diagnostic, avec un rôle majeur lié à l'arythmie ⁵³. Cette situation met en exergue la nécessité de développer de nouvelles approches thérapeutiques pour améliorer la morbidité et la qualité de vie des patients.

En effet, l'étude OPTIMIZE-HF (Organized Program to Initiate Lifesaving Treatment in Hospitalized Patients with Heart Failure), comprenant 20 118 patients présentant une insuffisance cardiaque à fraction d'éjection réduite et 21 149 patients présentant une insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée (FE≥40%) n'a pas montré de différence entre ces deux types d'insuffisance cardiaque concernant la mortalité à 60-90 jours (9,8% vs 9,5%), la ré-hospitalisation (29,9% vs 29,2%). Néanmoins, cette étude a montré une plus forte

mortalité à l'hôpital pour les patients présentant une insuffisance cardiaque à fraction d'éjection réduite (3,9% vs 2,9%)⁵⁴.

Une étude similaire a été conduite en Europe, l'étude Euroheart Failure Survey, qui a comparé le pronostic de 3 148 patients présentant une insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée et 3 658 patients présentant une insuffisance cardiaque à fraction d'éjection réduite. Elle a rapporté une mortalité à 90 jours plus élevée pour les patients présentant une fraction d'éjection réduite (12%) comparés aux patients présentant une fraction d'éjection préservée (10%), mais des taux similaires de réadmission (21% vs 22%)⁵⁵. La seconde étude, nommée EuroHeart Failure Survey II, comprenant 3 580 patients hospitalisés pour une insuffisance cardiaque, la mortalité toutes causes confondues a montré une mortalité toutes causes confondues de l'ordre de 6,4%⁵⁶.

2.2.2. L'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection réduite

L'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection réduite est définie par une fraction d'éjection inférieure à 45%, une fraction d'éjection de 60 à 70% étant considérée comme normale. L'échographie est un élément clé du diagnostic, permettant la mesure de la fraction d'éjection, associée à un électrocardiogramme, une radiographie thoracique et le dosage du BNP (*brain natriuretic peptide*) et de son précurseur, le NT pro-BNP. Un dosage de BNP > 400 pg/mL permet le diagnostic de l'insuffisance cardiaque si le tableau clinique est compatible. Ce dosage est également réalisé dans le cas d'une suspicion d'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée. Néanmoins, le taux de BNP seul ne permet pas de conclure à une fraction d'éjection réduite ou préservée⁵⁷.

2.2.3. L'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée

L'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée correspond à une fraction d'éjection supérieure ou égale à 45% et une élévation des pressions de remplissage. Ce type d'insuffisance cardiaque correspond à la présence de symptômes de l'insuffisance cardiaque malgré une fraction d'éjection gauche normale ou subnormale.

Bien que l'on distingue l'insuffisance cardiaque à fraction réduite et l'insuffisance cardiaque à fraction préservée, il existe également un troisième type d'insuffisance cardiaque intermédiaire « *mid-range ejection fraction* » diagnostiquée par des taux de peptides

natriurétiques élevés, la présence d'une pathologie cardiovasculaire structurelle et d'une dysfonction diastolique ⁴².

2.2.3.1. Prévalence de l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée

Les études épidémiologiques Framingham Heart <https://www.framinghamheartstudy.org>) et Epidemiology Project (<http://rochesterproject.org>) soulignent la présence de l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée majoritairement chez les patients âgés, avec une prévalence plus importante chez les femmes, et fortement associée à des comorbidités telles que l'hypertension, le diabète de type 2, l'hypertrophie ventriculaire gauche, l'obésité et l'insuffisance rénale chronique. Ces facteurs de risque de l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée sont multifactoriels et complexes, et il n'existe pas de prévention autre que le traitement de ces facteurs de risque ⁴².

2.2.3.2. Diagnostic de l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée

2.2.3.2.1. Echocardiographie

La technique de premier plan permettant de diagnostiquer une insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée est l'échographie. Elle permet d'obtenir des informations fondamentales concernant la taille de la chambre ventriculaire, l'épaisseur et la déformation des parois, la fonction systolique, les valves et le péricarde, mais également les débits pulmonaires et transmitraux. En échographie, l'onde E (*early*) correspond à la vitesse de remplissage ventriculaire et l'onde A (*atrial*) correspond à une accélération de la vitesse de remplissage provoquée par la contraction de l'oreillette gauche. En conditions physiologiques, l'onde E est supérieure à l'onde A, donnant un ratio E/A de l'ordre de 1.5 ⁵⁸.

Au stade précoce de la dysfonction diastolique, l'altération de la relaxation induit une augmentation de la contraction atriale, conduisant à une réduction du ratio E/A < 1.0. Avec la progression de la dysfonction, la compliance du ventricule gauche est réduite, ce qui entraîne l'augmentation de la pression atriale gauche, et conduit à l'augmentation de la pression de remplissage E en dépit de l'altération de la relaxation. Cela conduit à une pseudonormalisation du ratio E/A. Enfin, pour les patients atteints d'une dysfonction diastolique sévère, la majeure partie du remplissage se produit au niveau de l'onde E, conduisant à un ratio E/A > 2.0 (Figure 7).

Classification échocardiographique de la dysfonction diastolique

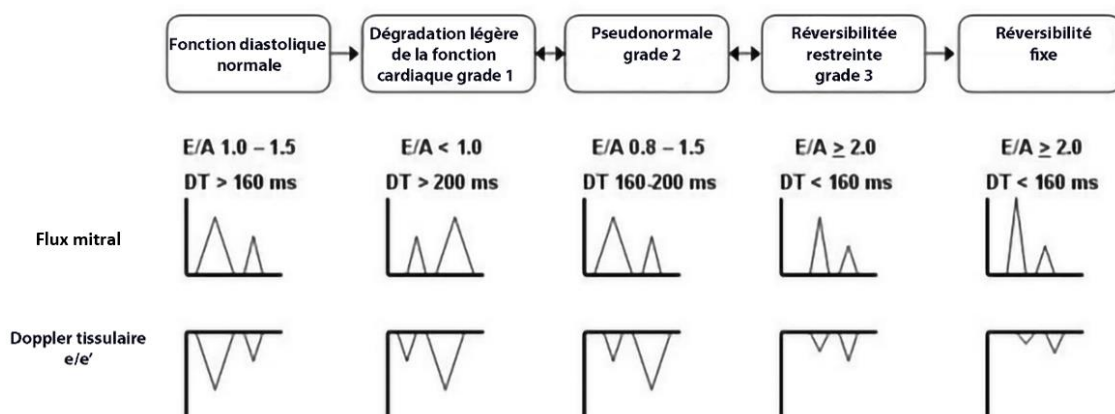


Figure 7. Classification échocardiographique de la dysfonction diastolique. Adapté de Congestive Heart Failure – Diastolic Topic Review.

En conditions de fonction diastolique normale, l'onde E est supérieure à l'onde A, et l'onde e est supérieure à l'onde e'. Le ratio E/A est compris entre 1.0 et 1.5. Lors d'une dégradation légère de la fonction cardiaque (grade I), l'onde E est inférieure à l'onde A, et l'onde e est inférieure à l'onde e'. Le ratio E/A est inférieur à 1.0. Lors de la pseudonormalisation (grade II), l'onde E est à nouveau supérieure à l'onde A, mais l'onde e est inférieure à l'onde e'. Le ratio E/A est compris entre 0.8 et 1.5. Lors de la réversibilité restreinte (grade III), l'onde E est très supérieure à l'onde A et l'onde e est inférieure à l'onde e', mais leur aire sous la courbe est faible. Le ratio E/A est supérieur ou égal à 2.0. Lors de la réversibilité fixe, l'onde E est très supérieure à l'onde A et l'onde e est inférieure à l'onde e', mais leur aire sous la courbe est très faible. Le ratio E/A est supérieur ou égal à 2.0.

Néanmoins, la vitesse des ondes E et A dépend de plusieurs facteurs : le volume sanguin, l'anatomie et la fonction de la valve mitrale, ainsi que la fibrillation atriale (trouble du rythme cardiaque qui accélère le cœur et le fait battre de manière irrégulière). Afin de permettre une meilleure fiabilité du diagnostic, il est conseillé de recourir au Doppler tissulaire, qui permet de mesurer la vitesse de déplacement de l'anneau mitral, appelé E' (e' septal < 7 cm/sec ou e' latéral < 10 cm/sec). Le ratio E/e' (E/e' moyen > 14) constitue ainsi un paramètre échocardiographique déterminant dans le diagnostic de la dysfonction diastolique⁵⁹. Il est à noter que le strain est également abaissé lors de l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée⁶⁰.

2.2.3.2.2. Cathétérisme droit-gauche

Il est également possible de recourir au cathétérisme cardiaque pour diagnostiquer la dysfonction diastolique. Ce test, certes invasif, est le seul permettant l'évaluation directe des pressions de remplissages intraventriculaires (pression ≥ 15 mm Hg au repos ou ≥ 25 mm Hg à

l'effort)⁶¹. Cependant, l'échographie, non invasive, lui est très largement préférée en pratique clinique courante.

2.2.3.2.3. Dosage du taux de BNP

Enfin, le dosage du taux de BNP, évoqué plus haut, contribue au diagnostic sans être spécifique de l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée. Néanmoins, on retrouve très régulièrement chez ces patients des taux de BNP normaux ou peu élevés. Ces taux pseudo-normaux peuvent en partie être expliqués par la présence de l'obésité, comorbidité fréquente de l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée, qui induit une diminution des taux de BNP⁶².

2.2.3.2.4. Imagerie par Résonance Magnétique

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) permet de caractériser la structure tissulaire du myocarde, et particulièrement d'évaluer la fibrose interstitielle en utilisant le T1 mapping. Néanmoins, la corrélation entre la fibrose myocardique et la présence d'une dysfonction diastolique n'est à ce jour pas suffisante au diagnostic d'une insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée. L'IRM pourrait toutefois permettre une stratification du risque des patients en permettant une évaluation du ventricule droit plus précise qu'en échocardiographie⁶³.

1.2.3.3. Physiopathologie de l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée

L'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée se caractérise par un défaut de relaxation du myocarde altérant la relaxation isovolumétrique et le remplissage ventriculaire. Elle s'accompagne généralement d'une hypertrophie ventriculaire gauche concentrique couplée à une augmentation de la densité en collagène et à une raréfaction capillaire, induisant une augmentation de la rigidité du ventricule et donc à une perte de compliance cardiaque et une diminution de l'irrigation sanguine à l'origine de l'altération du remplissage⁶⁴⁻⁶⁶.

La dyspnée est le maître symptôme de l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée. Cela se traduit majoritairement par une intolérance à l'effort, qui elle-même résulte d'une étiologie variée, comprenant notamment la dysfonction diastolique, l'incompétence chronotropique ou l'hypertension pulmonaire⁶⁷.

L'étiologie la plus commune observée dans le cadre du développement d'une insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée comprend les facteurs de risque

suivants : l'ischémie cardiaque, l'hypertension, le vieillissement, l'obésité et la sténose aortique ⁵⁹. Une vue d'ensemble de l'étiologie de l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée est proposée en Figure 8.

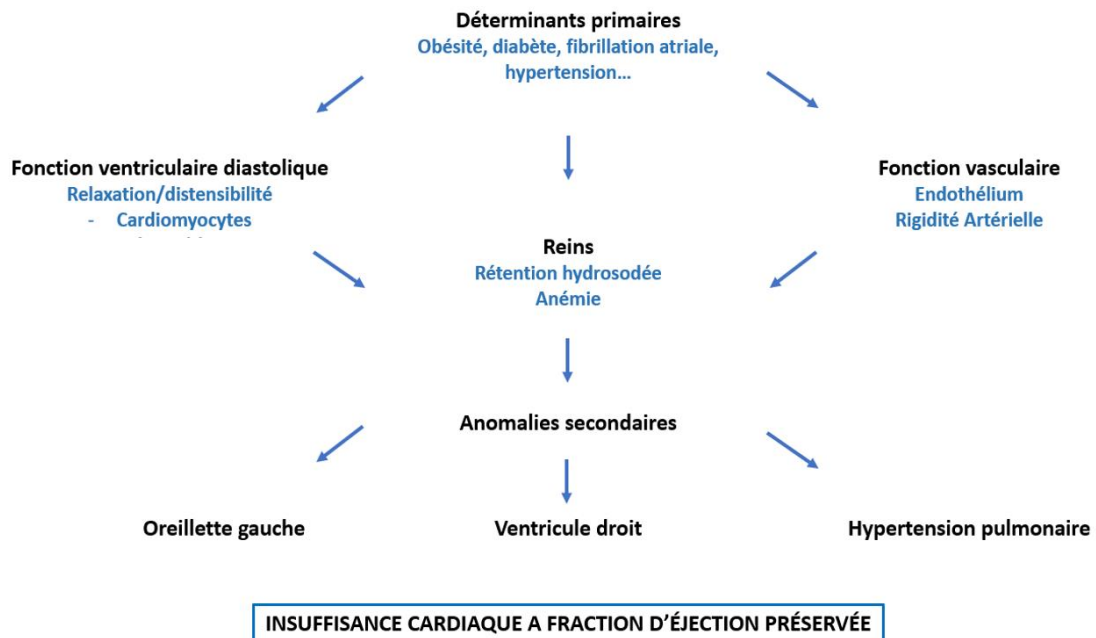


Figure 8. Etiologie de l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée. D'après JACC Heart Fail, 2014 ⁶⁸.

Les déterminants primaires de l'insuffisance cardiaque sont l'obésité, le diabète, la fibrillation atriale ou l'hypertension. Ils impactent trois fonctions : la fonction ventriculaire diastolique, marquée par une atteinte de la capacité de relaxation du cœur, mais également les cardiomyocytes, la fonction rénale à travers des altérations de la rétention hydrosodée, et de l'anémie et enfin la fonction vasculaire avec l'apparition d'une dysfonction endothéliale et une augmentation de la rigidité artérielle. Les dysfonctions ventriculaires diastolique et vasculaire peuvent concourir à la dysfonction rénale. L'ensemble de ces conséquences peut conduire à des anomalies dites secondaires, qui vont impacter l'oreillette gauche, notamment via des troubles du rythme, le ventricule droit (dysfonction) et une hypertension pulmonaire.

La dysfonction diastolique permet au cœur de subvenir aux besoins de l'organisme en oxygène en conditions basales, au prix d'une élévation de la pression de remplissage du ventricule gauche. Cela conduit à des symptômes congestifs en raison de l'augmentation anormale de la relation pression-volume en diastole.

Par ailleurs, cette élévation de la pression de remplissage peut conduire à une congestion pulmonaire, qui potentialise la dyspnée ainsi que la progression vers une dysfonction du ventricule droit. Dans les cas sévères, la rigidité pariétale est telle que l'élévation de la pression de remplissage ne permet plus de compenser, entraînant une

diminution de la fraction d'éjection et du débit cardiaque, causant une intolérance à l'effort⁵⁹ (Figure 8).

L'altération de la relaxation et l'augmentation de la rigidité sont associées à une altération du remplissage en diastole et une diminution de la tolérance normale à l'exercice dans la phase précoce de la dysfonction diastolique. Lorsque la pathologie progresse, les pressions pulmonaires augmentent anormalement pendant l'exercice, induisant une réduction de la capacité à l'effort. Lorsque les pressions de remplissage augmentent davantage, la pression et le volume de l'oreille gauche augmentent et la capacité à l'effort diminue drastiquement, conjointement à l'apparition de signes cliniques d'insuffisance cardiaque congestive.

1.2.3.3.2. Remodelage cardiaque

Le remodelage cardiaque correspond à un état de modification de la structure physiologique du myocarde, ce qui peut correspondre à des conditions d'hypertension, paramètre le plus communément associé aux cardiopathies valvulaires ou congénitales ainsi qu'au cœur en post-infarctus⁶⁹.

Ce mécanisme compensatoire imparfait a pour objectif de permettre le maintien de la fonction cardiaque et conduit à long terme à un remodelage pathologique, qui se traduit par l'apparition d'une hypertrophie ventriculaire gauche et d'une déstructuration de la microarchitecture. En effet, le ventricule gauche, elliptique, devient davantage sphérique et entraîne une altération de la fonction systolique⁷⁰ (Figure 9). Les cardiomyocytes s'hypertrophient mais leur nombre diminue. Lorsque les mécanismes compensatoires sont dépassés, le risque d'épisode aigu, tel qu'une décompensation cardiaque ou un infarctus du myocarde augmente et les axes neuro-humoraux sont suractivés (SRAA et catécholaminergique)^{71,72}.

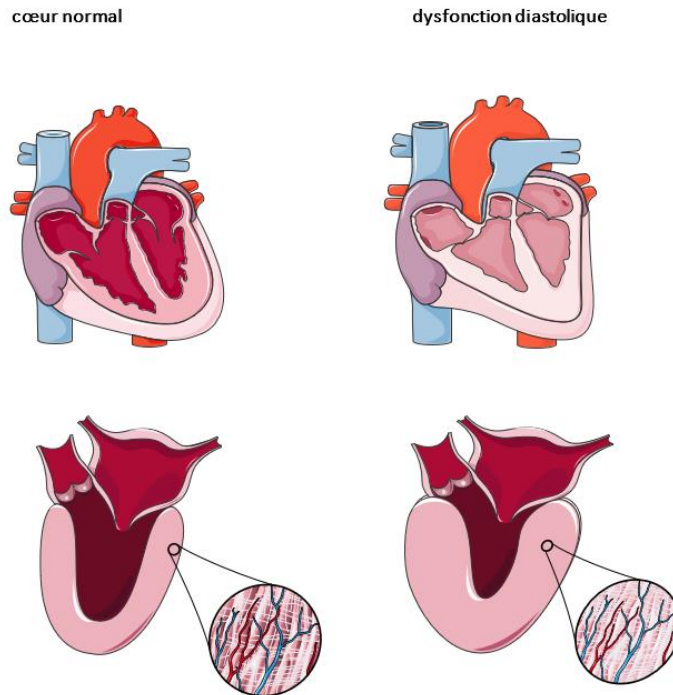


Figure 9. Représentation des différences entre un cœur normal et un cœur atteint d'une dysfonction diastolique. D'après la banque d'images de Servier.

L'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée induit le développement d'une hypertrophie cardiaque concentrique, qui s'accompagne d'une augmentation de la fibrose interstitielle et conduit à la diminution du volume de la cavité ventriculaire. Par ailleurs, il est à noter que l'obésité seule peut conduire au développement de cette hypertrophie concentrique, indépendamment de la présence d'une insuffisance cardiaque ⁷³. Cette hypertrophie concourt à l'intolérance à l'effort retrouvée dans le cadre d'une insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée et se caractérise par un épaissement des parois ventriculaires mais également un arrondissement de la forme du ventricule gauche (originellement elliptique) qui participe à l'altération de la fonction cardiaque.

La figure 10 montre une vue d'ensemble du remodelage ventriculaire.

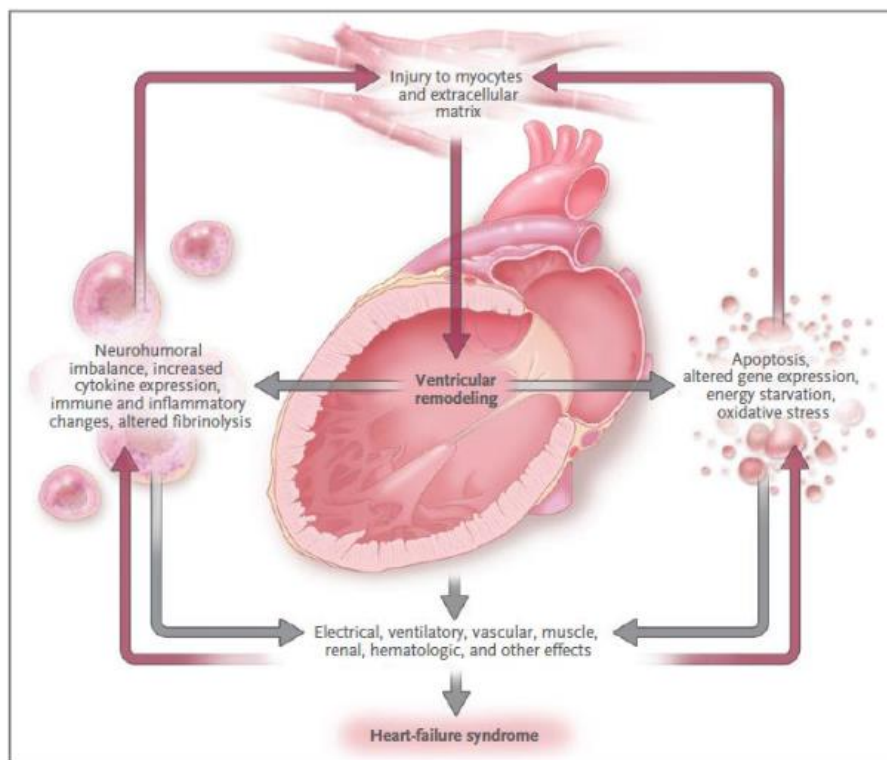


Figure 10. Physiopathologie du remodelage ventriculaire. D'Après McMurray *et al* ⁷⁴.

Cette figure montre que le remodelage ventriculaire conduit d'une part à l'apoptose, à une expression génique altérée, à un manque énergétique et un stress oxydatif, et d'autre part à un déséquilibre neuro-humoral, une augmentation de l'expression des cytokines, des changements des fonctions immunitaire et inflammatoire et une fibrinolyse altérée. Ces modifications peuvent conduire à des altération des myocytes et de la matrice extracellulaire, promouvant le remodelage ventriculaire. Elles peuvent également conduire à des effets électriques, ventilatoires, vasculaires, musculaires, rénaux, hématologiques, etc., qui participent au développement de l'insuffisance cardiaque.

1.2.3.3.3. Hypertrophie des cardiomyocytes et diminution de la biodisponibilité en oxyde nitrique

L'augmentation de la pression de remplissage conduit à une hypertrophie des cardiomyocytes, qui contribue à l'augmentation de la rigidité myocardique, conjointement avec l'augmentation de la fibrose interstitielle. Cette rigidité est liée à une hypophosphorylation de la titine, protéine contribuant à la contraction cardiaque, impliquée dans le contrôle de l'assemblage des protéines sarcomériques ⁷⁵.

L'état pro-inflammatoire retrouvé chez les patients souffrant d'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée entraîne un stress oxydatif et une dysfonction endothéliale. L'inflammation de l'endothélium des vaisseaux réduit la biodisponibilité en oxyde nitrique (\bullet NO) ainsi que la production de guanosine monophosphate cyclique (GMPc), qui causent une diminution de l'activité de la protéine kinase G (PKG). Ce déficit entraîne une

hypophosphorylation de la titine et ainsi une augmentation de la rigidité passive des cardiomyocytes ⁷⁵.

1.2.3.3.4 Fibrose cardiaque

Synthèse des fibres collagéniques :

La matrice extracellulaire permet le maintien des cardiomyocytes et des fibroblastes. Elle est essentiellement composée de collagène, représentant entre 2 à 4% du myocarde dans un cœur sain ⁷⁶. Les fibres de collagène se renouvellent à une fréquence évaluée entre 80 et 120 jours chez l'Homme ⁷⁷. La matrice extracellulaire est majoritairement composée des fibres de type I (85%), qui ont un rôle de résistance et donnent au myocarde sa rigidité, et de type III (10%) qui possèdent des propriétés élastiques ^{76,78}. Ces fibres de type I et III sont synthétisées et sécrétées par les myofibroblastes et les fibroblastes sous forme de précurseurs, qui sont ensuite clivés par des protéinases spécifiques permettant leur intégration dans les fibrilles en formation. Les propeptides libérés, tels que le *procollagen type I carboxy terminal peptide* (PICP) ou le *procollagen type III amino-terminal propeptide* (PIINP) peuvent être détectés dans le sang.

Dégradation des fibres collagéniques

Les molécules de procollagène de type I et III sont dégradées par des métalloprotéases matricielles (MMPs) en pro-peptides C-terminaux et N-terminaux. L'activité des MMPs est inhibée par les *tissue inhibitors of metalloproteases* (TIMPs). L'équilibre entre les MMPs et les TIMPs permet la régulation et le maintien de la structure de la matrice extracellulaire ⁷⁹.

Fibrose myocardique

Le remodelage myocardique consécutif à l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée entraîne une dérégulation de l'équilibre de la matrice extracellulaire, conduisant à une augmentation de la production de fibrose cardiaque (dépôt de collagène) mais également à une diminution de sa dégradation. On distingue deux types de dépôt de collagène, réactif (à la suite d'une atteinte vasculaire coronaire ^{80,81}) et réparateur (à la suite d'une perte de cardiomyocytes due à une nécrose, menant au développement d'un tissu cicatriciel ⁸²⁻⁸⁵).

De plus, le développement de la fibrose myocardique est favorisé par des facteurs inflammatoires (TGF- β) ⁸⁶, cytokines pro-inflammatoires ^{86,87} mais également par le SRAA ⁸⁸.

Par ailleurs, la galectine-3 (Gal-3), β -galactosidase liant la lectine, joue un rôle dans le développement de la fibrose en encourageant la prolifération et le dépôt des fibres

collagéniques de type I par les fibroblastes cardiaques. Il est également suggéré que la fibrose vasculaire induite par l'aldostérone puisse être en partie médiée par l'action de la Gal-3. Cette galactosidase pourrait donc constituer une cible thérapeutique d'intérêt dans la prise en charge du développement de la fibrose myocardique ^{79,89,90}.

Enfin, le diabète, dont la prévalence est estimée entre 30 à 50% des patients, contribue à l'hypertrophie des cardiomyocytes, à l'augmentation de la matrice extracellulaire ainsi qu'au développement d'une microangiopathie intramyocardique ⁶⁹.

Récepteur minéralocorticoïde, macrophages et fibrose

Des études cliniques et précliniques ont montré que l'administration d'antagonistes du RM entraîne la diminution des marqueurs de la fibrose cardiaque dans un contexte d'insuffisance cardiaque. Une étude menée sur 31 patients présentant une insuffisance cardiaque chronique traités avec 50 à 100 mg/jour de spironolactone en complément d'un traitement inhibiteur de l'ACE a montré une diminution des taux circulants de l' amino-peptide N-terminal pro-collagène de type III ⁹¹. Des résultats concordants ont été observés dans les essais cliniques RALES, EPHESUS et EMPHASIS-HF ⁹²⁻⁹⁵.

En contexte d'insuffisance cardiaque, il a été montré que les macrophages et leur implication dans le développement de l'inflammation, contribuent au développement de la fibrose. En effet, des souris KO-RM dans les macrophages, soumises à un challenge DOCA(*deoxycorticosterone acetate*)/sel promouvant l'hypertension, n'ont pas montré de fibrose après 8 semaines, contrairement aux souris WT ⁹⁶. Leur étude suggère que l'activation de la voie c-Jun NH2-terminal kinase est dépendante du RM, régulant la transcription de facteurs pro-fibrotiques. En contexte d'insuffisance rénale chronique, il a récemment été montré que le KO-RM dans les macrophages diminue l'augmentation de l'expression de protéines pro-fibrotiques telles que la fibronectine et le TGF β , ce qui limite le développement de fibrose interstitielle rénale ⁹⁷.

Toutefois, en raison de l'absence d'activité de la 11 β -HSD2 dans les macrophages, il est possible que l'activité du RM dans les macrophages soit médiée davantage par les glucocorticoïdes que par l'aldostérone. Une étude menée par Rickard *et al.* dans un modèle de souris KO pour le RM dans les macrophages a mis en évidence une réduction de la fibrose cardiaque induite par les minéralocorticoïdes, sans modification du recrutement des macrophages dans le cœur ⁹⁸.

Ainsi, bien que le RM macrophagique semble impliqué dans la mise en place de fibrose dans un contexte d'insuffisance cardiaque, des études complémentaires restent à mener pour comprendre plus finement les mécanismes impliqués.

Enfin, Jaisser *et al.* ont proposé un schéma fonctionnel de la signalisation du RM dans le développement de la fibrose et de l'inflammation, qui implique un rôle pro-oxydant du RM, conduisant à l'activation de la voie NF- κ B, elle-même à l'origine de la synthèse de cytokines pro-inflammatoires. Ce schéma suggère également un rétrocontrôle positif effectué par Rac1 sur le RM.

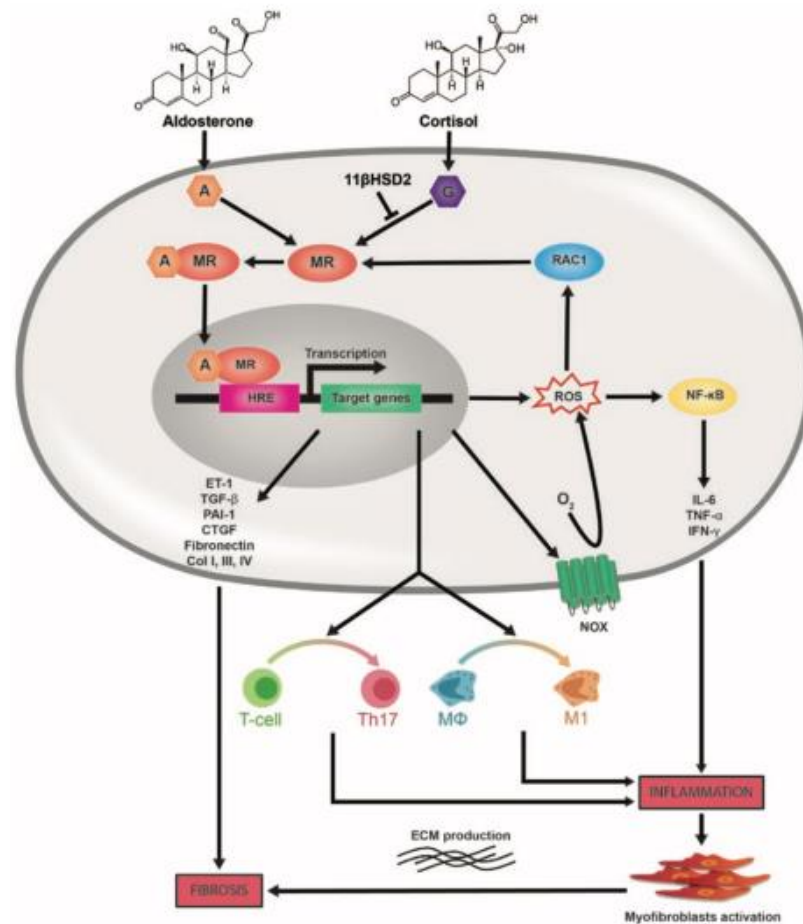


Figure 11. Représentation schématique du rôle du RM dans l'inflammation et la fibrose. D'après Buonafine *et al.* ⁹⁹.

Le RM se lie à l'aldostérone en l'absence de la 11βHSD2. Cette liaison entraîne la translocation dans le noyau du complexe aldostérone/RM qui se fixe sur les régions Hormone Response Element (HRE), induisant la transcription de gènes cibles tels que ET-1, TGF-β, PAI-1, CTGF, la fibronectine, Col I, III, IV qui peuvent jouer un rôle dans la mise en place de la fibrose. Également, cette activation du RM peut conduire à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), qui active la voie NF-κB et conduit à la production de cytokines pro-inflammatoires telles que IL-6 ou TNF-α. Cette voie est également stimulée par Nox. L'activation du RM peut également conduire à la différenciation des lymphocytes T en Th17 et la polarisation des macrophages MΦ en M1, ces deux processus soutenant le développement de l'inflammation. Enfin, un rétrocontrôle positif de Rac1 sur le RM induit par les ROS est également suggéré.

Prise en charge thérapeutique du collagène interstitiel myocardique

Les inhibiteurs de l'ACE et les ARB (bloqueurs du récepteur de l'A II) affectent directement la relaxation myocardique et la compliance en inhibant la production ou en bloquant les récepteurs de l'A II, ce qui conduit à la diminution du dépôt collagénique et de la fibrose ^{100,101}. Toutefois, les résultats prometteurs montrant les bénéfices de l'antagonisme du RM pour lutter contre la fibrose cardiaque constituent une piste thérapeutique.

1.2.3.3.5. Suractivation des systèmes neuro-humoraux

Les mécanismes adaptatifs neuro-humoraux permettent de compenser la baisse du débit cardiaque. En conditions pathologiques, la fréquence cardiaque augmente en raison de l'augmentation de l'activité sympathique et/ou de la diminution de l'activité du système parasympathique. Cela entraîne également une augmentation du retour veineux ainsi qu'une dilatation périphérique, qui résulte en l'augmentation du volume d'éjection. A terme, cela peut favoriser l'ischémie, les arythmies et l'aggravation de l'insuffisance cardiaque ¹⁰². La stimulation du système sympathique entraîne également des effets inotropes, induisant une vasoconstriction périphérique permettant une redistribution vasculaire vers le cerveau et le cœur. A terme, elle entraîne une augmentation délétère de la postcharge. Également, cette stimulation noradrénergique entraîne une baisse de la perfusion rénale, qui provoque une augmentation de la perfusion des néphrons profonds et favorise ainsi la rétention hydrosodée.

Dans un second temps, la progression de l'insuffisance cardiaque entraîne une augmentation des concentrations d'Angiotensine II et d'aldostérone consécutive à la suractivation du SRAA. La diminution de perfusion rénale contribue également à la suractivation de ce système. L'Angiotensine II dispense plusieurs effets : augmentation de la vasoconstriction due à la noradrénaline et l'aldostérone, augmentation de la rétention sodée, potentialisation du système sympathique consécutive à l'augmentation de la volémie provoquée par la rétention hydrosodée et enfin, développement de l'hypertrophie cardiaque ¹⁰³.

Enfin, dans l'insuffisance cardiaque grave, on observe une activation pathologique du système arginine-vasopressine dans le but de maintenir la pression artérielle. Cela entraîne une rétention d'eau supplémentaire à celle déjà causée par la rétention hydrosodée et provoque une hyponatrémie, qui est de mauvais pronostic ¹⁰⁴.

En parallèle, les systèmes vasoconstricteurs (système de l'endothéline) et vasodilatateurs (Facteur Atrial-Natriurétique et BNP) sont activés en réponse aux dérégulations induites par la progression de l'insuffisance cardiaque ⁶⁷.

2.2.4. Conséquences vasculaires de l'insuffisance cardiaque

Comme évoqué précédemment, la fonction vasculaire, et notamment la fonction endothéliale, sont impliquées dans l'insuffisance cardiaque.

2.2.4.1.1. L'endothélium et le •NO

L'endothélium joue un rôle majeur dans la régulation du tonus vasculaire. En effet, il libère des molécules aux propriétés vasoconstrictrices (endothéline, thromboxane A2) et vasodilatatrices (•NO, prostacycline) ¹⁰⁵. Le •NO est libéré en réponse aux forces de cisaillement de l'endothélium. Il permet l'atténuation de la réponse contractile face à plusieurs vasopresseurs tels que la noradrénaline, l'A II et l'endothéline.

Le •NO libère également des facteurs à action anticoagulante en conditions physiologiques ou pro-coagulante en conditions pathologiques, jouant ainsi un rôle dans le développement de l'athérosclérose ¹⁰⁶. Enfin, les monocytes jouent également un rôle dans le développement de la dysfonction endothéliale retrouvée dans un contexte d'insuffisance cardiaque. Ils sont en effet attirés dans l'intima par les LDL (*Low-Density Lipoproteines*) oxydées et le MCP-1. Le monocyte se différencie en macrophage dans l'intima et devient capable de fixer les LDL oxydées, contribuant ainsi au développement de la pathologie vasculaire ¹⁰⁷. L'évaluation de la fonction endothéliale en clinique s'effectue en injectant de l'acétylcholine dans une artère afin de mesurer les changements de tonus vasculaires qui en résultent ¹⁰⁸.

2.2.4.2. Pathologie vasculaire

La dysfonction endothéliale provoquée par l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée, entraînant une limitation de la biodisponibilité en •NO, a un rôle crucial dans la vasodilatation inadéquate retrouvée dans ces conditions pathologiques. De plus, la diminution de la biodisponibilité en •NO entraîne une augmentation de la pression artérielle lors de la systole ainsi qu'un effet vasoconstricteur accru de la noradrénaline, de l'A II et de l'endothéline. Par ailleurs, l'augmentation de la rigidité artérielle contribue elle-aussi à l'altération de la fonction vasculaire ¹⁰⁹.

2.2.4.3. Dysfonction coronaire dans l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée

Les patients souffrant d'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée peuvent également être atteints de maladie coronarienne, ayant un impact délétère sur la fonction ventriculaire à long terme mais également sur la mortalité ¹¹⁰. La prévalence d'une dysfonction endothéliale coronaire chez les patients atteints d'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée est évaluée entre 50% et 68% ^{111,112}. La dysfonction endothéliale coronaire serait potentialisée par l'inflammation microvasculaire, qui provoquerait un stress oxydatif ¹⁰⁹. L'ensemble de ces dysfonctions entraîne une diminution de la biodisponibilité en •NO, qui participe à l'altération de la relaxation myocytaire observée chez les patients atteints

d'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée ^{113,114}. Par ailleurs, une étude menée sur 70 patients (âge moyen : 43±11 ans) a mis en évidence la corrélation entre la dysfonction diastolique isolée et l'altération de la fonction coronaire dépendante de l'acétycholine ¹¹⁵. Enfin, il a été montré que les patients avec une insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée ont une dysfonction microvasculaire coronarienne ¹¹⁶ ainsi qu'une réduction de la réserve coronaire ¹¹⁷.

Néanmoins, les études visant à évaluer l'effet de stratégies thérapeutiques visant à la restauration des niveaux de •NO ou de GMPc n'ont à ce jour pas démontré d'effet bénéfique sur la capacité à l'effort des patients, soulignant la nécessité de poursuivre les recherches dans ce domaine ¹¹⁸.

2.2.4.4. Rôle du récepteur minéralocorticoïde dans les cellules endothéliales

La surexpression du RM dans les cellules endothéliales murines conduit à une augmentation de la pression artérielle systémique et une augmentation de la réponse aux vasoconstricteurs (A II, endothéline, thromboxane) ¹¹⁹.

2.2.4.5. Rôle du récepteur minéralocorticoïde dans les cellules musculaires lisses vasculaires

Une étude menée par Guéret *et al.* sur un modèle d'insuffisance cardiaque post-infarctus du myocarde chez des souris KO pour le RM dans les cellules vasculaires musculaires lisses a montré une amélioration de l'élastance et de la compliance du ventricule gauche (VG) ainsi qu'une diminution de la fibrose interstitielle associée à une augmentation de la réserve coronaire mesurée par IRM. Cette étude a également montré une diminution du stress oxydatif et une augmentation de la biodisponibilité en •NO sur des artères coronaires isolées. Les mêmes résultats ont été obtenus en traitant les souris avec de la finérénone ¹²⁰.

2.2.5. Syndrome cardiorénal

Le syndrome cardiorénal a été décrit par Claudio Ronco comme « une entité physiopathologique complexe touchant le cœur et les reins dans laquelle la dysfonction aigüe ou chronique d'un des organes peut induire une dysfonction aigüe ou chronique de l'autre organe ». En effet, environ un quart des patients hospitalisés pour une décompensation cardiaque (définie comme une aggravation brutale et transitoire des symptômes de l'insuffisance cardiaque) présentent également une insuffisance rénale. Inversement, les patients souffrant d'une insuffisance rénale présentent une plus forte prévalence d'insuffisance cardiaque ¹²¹. Pour preuve, Smith *et al.* ont montré, dans une cohorte de 80 000 patients atteints d'insuffisance cardiaque, que 60% d'entre eux présentaient un débit de filtration glomérulaire inférieur à 90mL/min (la fonction rénale étant dite normale lorsque le débit de filtration glomérulaire est supérieur ou égal à 90 mL/min) et 30% d'entre eux présentaient un débit inférieur à 53 mL/min ¹²². Le syndrome cardiorénal est classé en 5 types en fonction des interactions entre les deux organes et de sa sévérité, comme détaillé dans le tableau ci-dessous.

Tableau 3. Classification du syndrome cardiorénal. D'après Ronco *et al.* ¹²³.

Classification	Atteinte primitive	Atteinte secondaire
Type 1 : syndrome cardiorénal aigu	Insuffisance cardiaque aigüe (choc cardiogénique, décompensation aigüe d'une insuffisance cardiaque congestive)	Insuffisance rénale aigüe
Type 2 : syndrome cardiorénal chronique	Insuffisance cardiaque chronique (insuffisance cardiaque congestive)	Insuffisance rénale chronique progressive, voire permanente
Type 3 : syndrome cardiorénal aigu	Insuffisance rénale aigüe (nécrose tubulaire aigüe toxique ou ischémique, glomérulonéphrite)	Insuffisance cardiaque aigüe (ischémique, arythmique ou décompensation d'une insuffisance cardiaque congestive)
Type 4 : Syndrome cardiorénal chronique	Insuffisance rénale chronique (glomérulaire ou interstitielle chronique)	Insuffisance cardiaque chronique systolique et/ou diastolique (coronaropathie, cardiopathie hypertrophique, arythmie)
Type 5 : syndrome cardiorénal secondaire	Pathologie systémique aigüe ou chronique (sepsis, vascularite, diabète, amylose)	Insuffisance cardiaque et rénale

2.2.6. Autres conséquences de l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée

Les patients avec une insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée peuvent avoir une altération de la composition des muscles squelettiques des extrémités. En effet, des biopsies musculaires ont montré une augmentation du tissu adipeux au détriment des fibres musculaires et de la densité capillaire chez ces individus. Enfin, ces patients sont davantage sujets à l'anémie qui, altérant le transport de l'oxygène, est délétère en conditions d'efforts ¹²⁴.

2.2.7. Disparité Homme/Femme dans l'insuffisance cardiaque

De nombreuses différences existent entre les hommes et les femmes concernant l'épidémiologie et le pronostic des pathologies cardiovasculaires. Alors que l'incidence des pathologies cardiovasculaires augmentent chez les hommes à partir de 30 ans, l'incidence de ces pathologies est nettement inférieure chez les femmes avant la ménopause ¹²⁵. Cependant, après la ménopause (âge moyen 51 ans ¹²⁶, l'incidence des pathologies cardiovasculaires et la mortalité augmente progressivement ^{125,127} (Figure 12 et tableau 4). Cela pourrait s'expliquer par la perte de l'effet cardioprotecteur supposé de l'œstrogène, dont la concentration diminue très fortement avec la réduction de la fonction ovarienne au début de la ménopause. Par ailleurs, la déficience en œstrogène pourrait induire des variations en taux de lipides sanguins, qui pourraient à leur tour altérer indirectement la fonction cardiaque ¹²⁸.

Toutefois, les femmes ayant une insuffisance cardiaque ont un meilleur pronostic que les hommes, bien que cela dépende fortement de l'étiologie du patient ¹²⁹. A ce sujet, une analyse post-hoc de l'essai clinique TOPCAT montre que la spironolactone a été associée à une réduction de la mortalité toutes causes confondues chez les femmes (n= 882, P=0.01) mais pas chez les hommes (n=885) ¹³⁰. Une seconde étude menée par Dewan *et al.* chez 4 458 femmes et 4 010 hommes inclus dans les essais cliniques CHARM-Preserved (Candesartan in Heart Failure : Assessment of Reduction in Mortality and morbidity) ayant une fraction d'éjection $\geq 45\%$, I-Preserve (Irbesartan in heart failure with Preserved ejection fraction) et TOPCAT-Americas (Treatment of Preserved Cardiac Function Heart Failure with an Aldosterone Antagonist trial) a montré que les femmes atteintes étaient plus âgées, plus souvent obèses et hypertendues, mais moins susceptibles de souffrir d'une maladie coronarienne ou de fibrillation auriculaire. Les femmes présentaient plus de symptômes, de

signes congestifs et d'une moins bonne qualité de vie. Malgré cela, le risque de décès lié à une pathologie cardiovasculaire est réduit pour les femmes comparés aux hommes. Ceci peut en partie être expliqué par un risque nettement plus faible de mort subite ($P < 0.001$) pour les femmes comparées aux hommes. De plus, le ratio E/A était plus faible chez femmes que chez les hommes (1.1 vs 1.2) ¹³¹.

Par conséquent, les différents mécanismes liés aux disparités homme / femme concernant l'insuffisance cardiaque, et en particulier dans le contexte de la ménopause, sont aujourd'hui peu connus et soulignent la nécessité de conduire davantage d'investigations sur le sujet pour améliorer l'efficacité de la prise en charge des patientes.

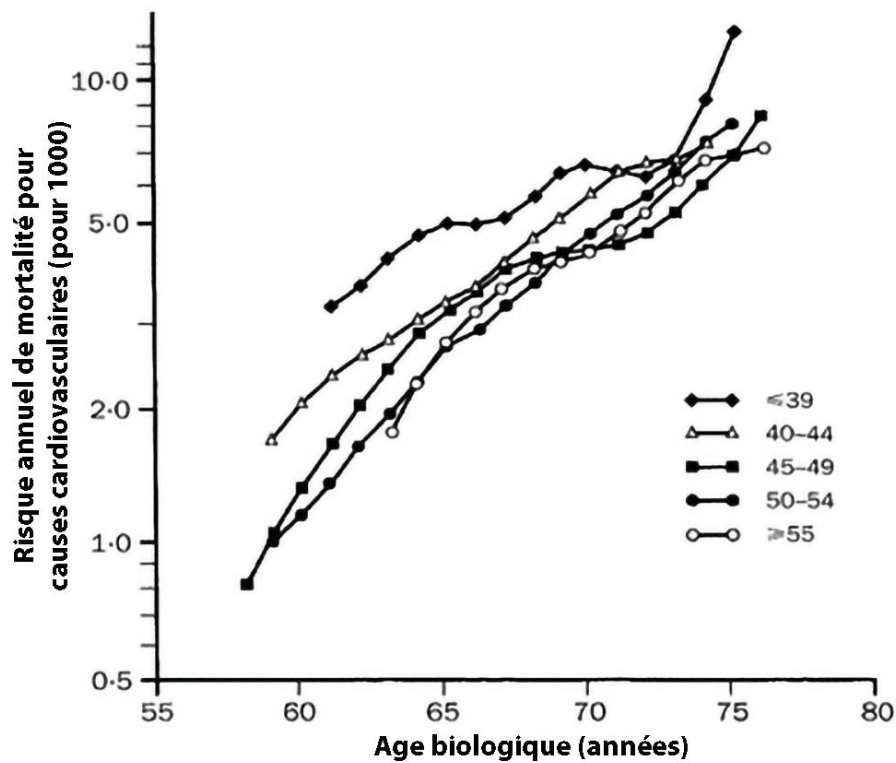


Figure 12. Risque annuel de mortalité cardiovasculaire (échelle logarithmique) en fonction de l'âge de survenue de la ménopause ¹²⁷.

On observe une augmentation progressive du risque annuel de mortalité pour causes cardiovasculaires en fonction de l'âge biologique pour les tranches d'âge évaluées (≤39 ans, 40-44 ans, 45-49 ans, 50-54 ans, ≥55 ans) suggérant le rôle de la ménopause dans la survenue d'événements cardiovasculaires létaux.

Tableau 4. Rapport de risque concernant l'âge de la ménopause et la mortalité cardiovasculaire ajusté pour les facteurs de confusion potentiels. Adapté de van der Schouw *et al.* ¹²⁷.

	Rapport de risque (95% CI)
Brut, ajusté par rapport à l'âge biologique	0.982 (0.968-0.966)
Ajusté pour toutes les variables simultanément	0.983 (0.975-0.998)
Ajusté pour les variables individuelles	
Année de naissance	0.982 (0.968-0.996)
Ménopause naturelle	0.981 (0.966-0.996)
Utilisation de contraceptif oral	0.983 (0.969-0.998)
Age au premier accouchement	0.983 (0.969-0.998)
IMC > 30 kg/m ²	0.982 (0.968-0.997)
Répartition de la graisse du haut du corps	0.982 (0.696-0.996)
Tabagisme	0.985 (0.971-0.999)
Hypertension	0.982 (0.968-0.996)
Diabète	0.982 (0.968-0.996)
Pathologie cardiovasculaire antérieure	0.984 (0.969-0.998)

De plus, le diabète et l'hypertension sont des facteurs de risque de maladies cardiovasculaires plus importants chez les femmes que chez les hommes ¹³². Il y a également une plus grande prévalence d'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée pour les femmes que pour les hommes ^{56,133}.

Deux études de cohortes ont évalué la relation entre l'âge de la ménopause et le risque d'insuffisance cardiaque. La première a inclus 22 256 femmes en post-ménopause ¹³⁴ et la seconde a inclus 2 947 femmes en post-ménopause ¹²⁸. Ces deux études ont permis de mettre en évidence une association entre la ménopause précoce et l'augmentation du risque d'insuffisance cardiaque. Par ailleurs, Rahman *et al.* ont relevé une augmentation du risque d'insuffisance cardiaque pour les femmes ayant leur ménopause entre 46 et 49 ans comparé au groupe de référence. De plus, chaque année supplémentaire avant la survenue de la ménopause permet une diminution du risque d'insuffisance cardiaque estimée entre 2 et 4%. Il est également intéressant de noter que la progestérone est un antagoniste naturel du RM ¹³⁵.

En conclusion, l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée est une pathologie multifactorielle et complexe, dont les effets sont médiés par des atteintes cardiovasculaires mais également musculaires et du système nerveux autonome. Les facteurs

de risque majeurs de cette insuffisance cardiaque, que sont l'obésité, l'hypertension, le diabète et l'insuffisance rénale, jouent un rôle majeur dans l'apparition d'un état pro-inflammatoire systémique et d'un stress oxydatif, qui entraînent ensuite l'apparition d'une dysfonction endothéliale et d'une réduction de la biodisponibilité en •NO.

Par ailleurs, la multitude des facteurs de risque ainsi que des facteurs physiopathologiques associés rendent plus ardue l'exploitation des essais cliniques. En effet, il est possible que ces essais aient inclus, en raison de l'hétérogénéité de ce syndrome clinique, des patients présentant des physiopathologies sous-jacentes différentes, ce qui peut engendrer en retour une hétérogénéité des réponses thérapeutiques ¹³⁶.

2.3. Prise en charge de l'insuffisance cardiaque

2.3.1. Prise en charge de l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection réduite

Les stratégies thérapeutiques actuelles du traitement de l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection réduite reposent sur l'inhibition de l'activation délétère des systèmes rénine-angiotensine-aldostérone et catécholaminergique ^{1,137,138}.

De nombreuses essais cliniques ont permis de statuer sur l'efficacité des inhibiteurs de l'enzymes de conversion ¹³⁹, des β -bloquants ¹⁴⁰ et des antagonistes du récepteur minéralocorticoïde ¹⁴¹⁻¹⁴³. Ces innovations ont montré une amélioration nette du pronostic des patients atteints d'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection réduite ^{144,145}.

2.3.2. Prise en charge de l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée

Contrairement à l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection réduite, il n'y a aujourd'hui pas de stratégie thérapeutique ayant démontré son efficacité pour l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée (tableau 5) ^{146,147}.

Tableau 5. Comparaison d'études cliniques multicentriques randomisés dans l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée.

Etude	Médicament	N	FE	Age (années)	Femme (%)	HTN (%)	Coronarien (%)	Diabète (%)	Critère principal	Résultat global
RELAX	Sildenafil	216	≥50 %	69	48	85	39	43	VO2 max	Neutre
TOPCAT	Spironolactone	3445	≥45 %	69	52	91	59	32	Mortalité CV, arrêt cardiaque, hospitalisation IC	Neutre
ALDO-DHF	Spironolactone	422	≥50 %	67	52	92	40	17	CO2 max, fonction diastolique	Neutre
I-Preserve	Irbesartan	4128	≥45 %	72	60	88	48	27	Mortalité toute-cause, hospitalisation CV	Neutre
CHARM-Preserved	Candesartan	3023	>40 %	67	40	64	60	28	Mortalité CV, hospitalisation IC	Neutre
DIG-PEF	Digoxine	988	>45 %	67	41	60	56	29	Hospitalisation IC, mortalité IC	Neutre
PEP-CHF	Périndopril	850	>40 %	75	55	79	27	21	Mortalité toute-cause, hospitalisation IC	Neutre
SENIORS	Néбиволол	752	>35 %	76	50	78	77	24	Mortalité toute-cause, hospitalisation CV	Neutre

La stratégie primaire de prise en charge de l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée repose sur le contrôle de certains facteurs de risques : arrêt du tabac et traitement contre l'hypertension, l'hypercholestérolémie et la dysfonction coronaire. Elle s'accompagne de modifications du style de vie des patients, à travers une perte de poids, un changement du régime alimentaire, une limitation de la consommation d'alcool et une activité physique régulière ⁵⁹.

Par ailleurs, le diagnostic précoce a une importance majeure, puisqu'il permet de prévenir les altérations structurelles irréversibles ainsi que limiter la progression vers une insuffisance cardiaque à fraction d'éjection réduite. A ce jour, aucun essai clinique n'a permis d'identifier une stratégie thérapeutique globale permettant d'améliorer la survie des patients présentant une insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée ¹⁴⁸. En effet, il n'existe pas de solutions pharmacologiques permettant un effet lusitrope seul. Par conséquent, les thérapies actuelles ne sont pas aussi bien définies que pour l'insuffisance cardiaque à fraction

d'éjection réduite. Il est également à noter que le traitement optimal définit pour la prise en charge de l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection réduite peut conduire à une détérioration de l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée ⁵⁹. En l'absence d'essais cliniques concluants quant à la stratégie thérapeutique à adopter pour la prise en charge de l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée, l'American College of Cardiology et l'American Heart Association ont mis en place des guidelines divisées en plusieurs objectifs.

En premier lieu, le traitement des facteurs de risque et des pathologies sous-jacentes. Ensuite, la prévention et le traitement de l'hypertension et de l'ischémie cardiaque. Eventuellement, un recours à la chirurgie pour enlever une partie du péricarde atteint est possible en cas d'inflammation chronique ou d'irritation. En troisième lieu, l'amélioration de la relaxation ventriculaire (inhibiteurs de l'ACE, inhibiteurs des canaux calciques). Le quatrième objectif contre la diminution de l'hypertrophie ventriculaire gauche, c'est-à-dire de permettre la diminution de l'épaisseur des parois et du collagène interstitiel (inhibiteurs de l'ACE, ARB, antagonistes de l'aldostérone, β -bloquants, inhibiteurs des canaux calciques). En cinquième lieu, le maintien de la synchronicité atrioventriculaire par la prise en charge de la tachycardie (β -bloquants en première intention, sinon inhibiteurs des canaux calciques). Le sixième objectif est l'optimisation des paramètres hémodynamiques (inhibiteurs de l'ACE, antagonistes de l'aldostérone (dont l'effet n'a pas été démontré), rétention d'eau et de sel, diurèse ou dialyse). Le sixième point concerne l'augmentation de la survie. A ce jour, seuls les inhibiteurs de l'ACE et les β -bloquants ont montré un bénéfice sur la survie des patients ¹⁴⁸. Concernant ces derniers, ils contribuent en effet au contrôle du rythme cardiaque, la prévention de la tachycardie et ainsi qu'à l'augmentation du temps de remplissage. Les β -bloquants permettent également la diminution de la pression artérielle et de l'ischémie cardiaque, contribuant ainsi à la diminution de l'hypertrophie ventriculaire gauche ¹⁴⁹. Enfin, le dernier chapitre de ces guidelines concerne la prévention de la rechute par le suivi du patient (contrôle de la pression artérielle, du poids, ajustement des traitements diurétiques et pratique sportive régulière) ⁵⁹.

Considérant cet état des lieux de la prise en charge actuelle de l'insuffisance cardiaque, il convient maintenant de s'intéresser au rôle du RM dans ces pathologies.

Tout d'abord, il a été montré en 1942 que la DOCA induit une néphropathie associée à une hypertrophie cardiaque chez des poussins. Cette étude montre pour la première fois les effets délétères de l'aldostérone ¹⁵⁰. Il a ensuite été montré en 1960 que la spironolactone améliore les lésions cardiaques induites par l'aldostérone ¹⁵¹. De nombreuses études ont ensuite suivi, montrant l'implication du RM et les effets bénéfiques de son antagonisme.

2.3.3. Rôle du récepteur minéralocorticoïde dans la physiopathologie cardiaque

Une activation du RM a été mise en évidence dans différentes pathologies cardiovasculaires telles que l'hypertension, l'insuffisance cardiaque et l'infarctus du myocarde ¹⁵². De plus, les antagonistes du RM ont montré une diminution de la morbidité et de la mortalité chez les patients atteints d'insuffisance cardiaque ^{141,142,153}.

L'insuffisance cardiaque se caractérise notamment par des taux élevés d'aldostérone plasmatique ¹⁵⁴, eux-mêmes associés avec une réduction de la capacité fonctionnelle ¹⁵⁵ et une augmentation de la mortalité liées aux pathologies cardiovasculaires ou au développement d'une insuffisance cardiaque post-infarctus du myocarde ¹⁵⁶.

On peut souligner que les taux d'aldostérone chez les patients ayant une insuffisance cardiaque restent élevés en dépit de l'utilisation d'IEC (inhibiteur de l'enzyme de conversion), ARB et β -bloquants ¹⁵⁷. En cause, la fuite de l'aldostérone apparaissant chez les patients traités à long terme par des IEC et ARB ¹⁵⁸. Une étude menée sur des patients souffrant d'insuffisance rénale chronique et ayant une fuite d'aldostérone et traités par des antagonistes du RM a montré une amélioration de la protéinurie ¹⁵⁹.

La surexpression du MR spécifiquement dans les cardiomyocytes murins entraîne une augmentation des troubles du rythme (extrasystoles ventriculaires, arythmies) ¹⁶⁰. Ces troubles du rythme pourraient être liés à une altération de l'activité du récepteur à la ryanodine qui entraîne une altération de l'homéostasie calciques et de la modulation des transients calciques ¹⁶¹.

Par ailleurs, Favre *et al.* ont montré que la surexpression du RM dans les cardiomyocytes conduit à une modification de la structure des vaisseaux coronaires, provoquant la survenue d'une dysfonction endothéliale, contrée par un traitement à la

spironolactone (40 mg/kg/jour dans l'eau de boisson pendant 4 semaines), mais également d'une augmentation du stress oxydatif ¹⁶².

Une étude menée sur des rats soumis à un challenge DOCA/sel a montré une amélioration des dommages fonctionnels et structurels du cœur et des reins à un dosage n'affectant pas la pression artérielle systémique. Plus particulièrement, la finérénone a permis de réduire l'hypertrophie cardiaques, les taux de BNP et la protéinurie plus efficacement que l'eplerénone ⁴¹.

Une seconde étude menée sur des souris en post-infarctus du myocarde induit par une ligature de l'artère coronaire a montré une amélioration de la compliance et de l'élastance du VG et une diminution de fibrose interstitielle après 2 mois de traitement par la finérénone ¹²⁰. De plus, le traitement a permis une conservation de la réserve coronaire mesurée par IRM ainsi qu'une amélioration de la fonction endothéliale mesurée par artériographie.

Ensuite, une étude menée dans un modèle d'insuffisance cardiaque induite par surcharge de pression a montré une meilleure diminution de l'hypertrophie myocardique dans le groupe traité par la finérénone que pour le groupe traité par l'eplerénone ¹⁶³.

Enfin, il a été montré dans un modèle de diabète de type II et d'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée (Rats Zucker, *ob/ob*, KO pour le récepteur à la leptine) que la finérénone permet une diminution de la protéinurie après 3 mois de traitement, une amélioration de la fonction diastolique, une réduction de l'hypertrophie du VG et du collagène interstitiel du VG. Ces résultats soutiennent l'hypothèse que la finérénone pourrait avoir un effet bénéfique pour les patients avec une insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée et un diabète de type II ¹⁶⁴.

Concernant les essais cliniques menées sur l'effet d'antagonistes du SRAA sur l'insuffisance cardiaque, l'étude CHARM-Preserved a montré une réduction du nombre d'hospitalisations pour les patients traités par le candesartan (IEC). Toutefois, en dépit du critère d'inclusion de fraction d'éjection limite de 40%, on peut se demander si cette cohorte est réellement représentative d'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée. De plus, l'essai clinique I-Preserve, qui a comme critère d'inclusion une FE > 45% et pourrait donc mieux cibler la population d'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée, n'a pas

montré de bénéfices liés au traitement concernant la qualité de vie et le nombre d'hospitalisations liées à l'insuffisance cardiaque.

L'étude RALES (Randomized Aldactone Evaluation Study), comprenant 1663 patients ayant une insuffisance cardiaque catégorisée NYHA III-IV randomisés en deux groupes : spironolactone (26 mg en moyenne) et placebo en plus du traitement standard fut la première grande étude menée sur l'efficacité d'un antagonisme du RM sur l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection réduite. Elle a mis en évidence une diminution de 30% de la mortalité globale (35% vs 46% dans le groupe placebo) ¹⁴¹. Le traitement de ces patients était réparti comme suit : 94% sous IEC, 100% sous diurétiques de l'anse, 72% sous digoxine, 10% sous bêta-bloquants. Les effets secondaires relevés lors de cette étude ont été la gynécomastie (10 vs 1% dans le groupe placebo) ainsi que d'hyperkaliémie (14% vs 3,4% et provoquant une hausse de la mortalité de 0.03% à 0.2%) ¹⁶⁵.

La seconde étude majeure est EPHEsus, comprenant 6 642 patients symptomatiques d'une dysfonction cardiaque post-infarctus randomisés en deux groupes : eplerenone (43 mg en moyenne) versus placebo en supplément du traitement standard ¹⁶⁶. Cette étude a montré une augmentation de la biodisponibilité en •NO, une diminution des taux de propeptide procollagène III ainsi que de procollagène III, une réduction de la masse ventriculaire, une diminution de la variabilité de la fréquence cardiaque, une amélioration de la fraction d'éjection et une diminution des volumes ventriculaires après infarctus du myocarde. Enfin, elle a également mis en avant une amélioration de la fonction diastolique ¹⁶⁷.

Ensuite, l'étude EMPHASIS (Eplerenone in patients with Systolic Heart Failure and Mild Symptoms) menée sur 2 737 patients ayant une insuffisance cardiaque de classe NYHA II et une fraction d'éjection $\leq 35\%$, a évalué l'efficacité de l'eplerenone (50mg maximum) en supplément des traitements habituels. Le critère principal de cette étude est la mort liée aux causes cardiovasculaires ainsi que la fréquence d'hospitalisation pour insuffisance cardiaque. Le taux obtenu est favorable au traitement par l'eplerenone avec un premier critère évalué à 18,3% parmi les patients recevant l'eplerenone et 25.9% dans le groupe placebo. Plus précisément, 12,5% des patients recevant l'eplerenone sont décédés pendant l'étude contre 15.5% pour le groupe placebo. Le nombre d'hospitalisation pour cause d'insuffisance cardiaque a également été réduit. Enfin, un taux de potassium sérique > 5.5 mmol/L a été relevé chez 11.8% des patients traités contre 7.2% dans le groupe placebo ¹⁵³.

L'étude clinique TOPCAT (Treatment of Preserved Cardiac Function Heart Failure with Aldosterone Antagonist), qui avait pour objectif d'évaluer l'efficacité de la spironolactone sur l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée ¹⁶⁸ n'a pas montré de bénéfices sur la mortalité et la fréquence d'hospitalisations pour insuffisance cardiaque. Néanmoins, une analyse post-hoc a montré un effet positif du traitement pour les patients du continent américain ¹⁶⁹. De plus, une seconde étude compilant différents résultats relatifs à l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée a mis en lumière les différences géographiques de définition de cette pathologie, soulignant la nécessité d'une harmonisation des critères afin de produire des résultats cliniques fiables et comparables ¹⁷⁰.

Une étude menée sur 1 012 patients ayant eu un infarctus du myocarde avec sus-décalage du segment ST traités précocement avec de l'eplerenone a permis une diminution des taux de BNP et NT-pro BNP. Ces résultats encourageants nécessitent toutefois d'être plus amplement étudiés ¹⁷¹.

De plus, on peut noter que l'essai ALDO-DHF (Aldosterone Receptor Blockade in Diastolic Heart Failure) n'a pas permis de mettre en évidence d'amélioration fonctionnelle, même si l'étude montre une amélioration de la fonction diastolique via le ratio E/E' évalué en échocardiographie ¹⁷⁰. Cet essai n'ayant toutefois pas été conçu pour évaluer le nombre d'hospitalisation ou la survie des patients, il est difficile de tirer une conclusion à partir de ses résultats.

La figure 13 résume les conséquences de la suractivation du récepteur minéralocorticoïde.

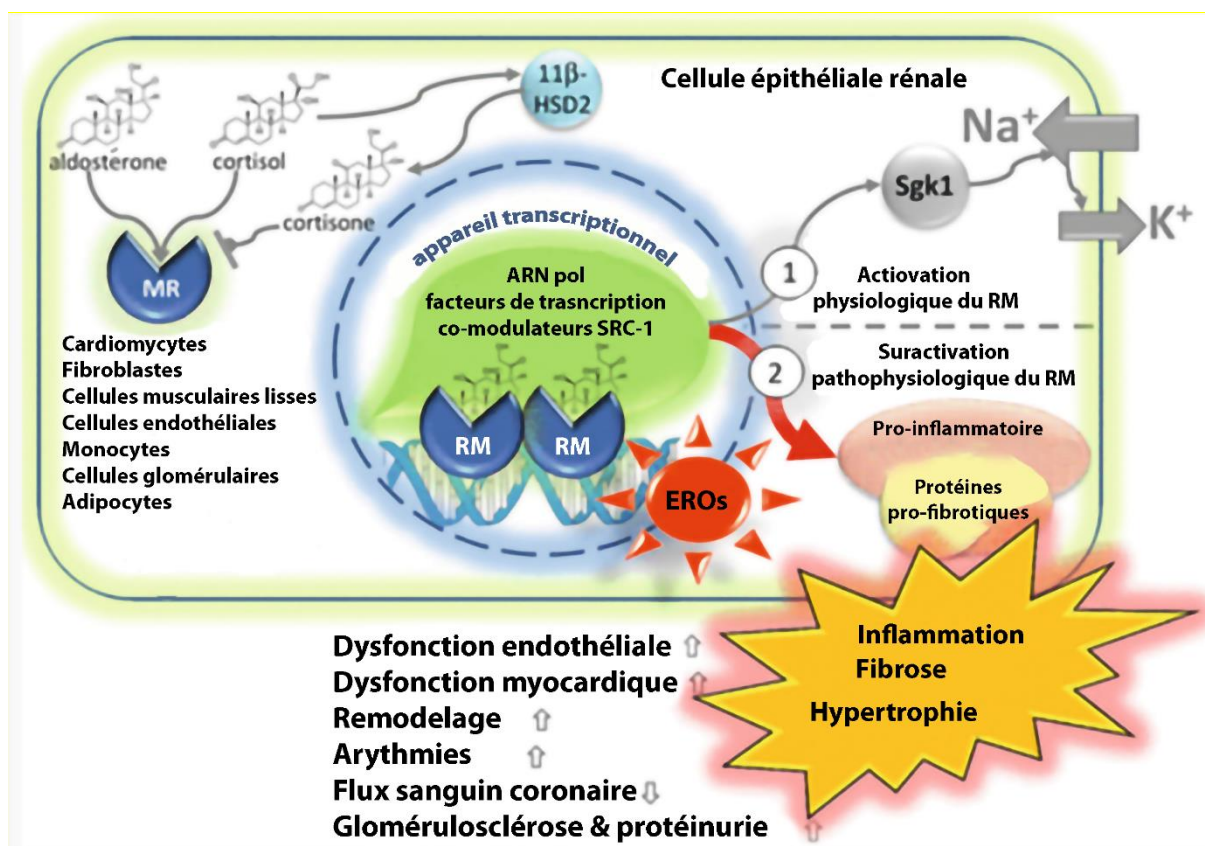


Figure 13. Mode d'action et conséquence de la suractivation du récepteur minéralocorticoïde. Tiré de Kolhof et al.¹⁷².

Cette illustration rappelle que le RM est exprimé dans les cardiomyocytes, les fibroblastes, les cellules musculaires lisses, les cellules endothéliales, les monocytes, les cellules glomérulaires et les adipocytes. La suractivation pathophysiologique du RM conduit, avec une implication des espèces réactives de l'oxygène, à la synthèse de protéines pro-fibrotiques, qui concourent au développement d'une inflammation, d'une fibrose et d'une hypertrophie. Au terme de ce processus, on observe une augmentation de la dysfonction endothéliale, de la dysfonction myocardique, du remodelage, de l'arythmie, de la glomérulosclérose et de la protéinurie, ainsi qu'une diminution du flux sanguin coronaire.

Enfin, la dysfonction coronaire est également améliorée par la spironolactone chez des patients atteints de diabète de type 2¹⁷³ et également par l'eplerenone¹⁷⁴.

Cette dernière étude permet de souligner un enjeu clinique majeur du traitement de l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée : les comorbidités qui y sont associées. Plus particulièrement le diabète de type et l'obésité, constituants majeurs du syndrome métabolique.

3. Le syndrome métabolique

3.1. Définition

Avec une prévalence estimée à 25% de la population mondiale en 2018 et en croissante augmentation, le syndrome métabolique se caractérise par la présence de 3 critères parmi 5 critères révélateurs de dérégulations métaboliques : obésité centrale, hypertension, hypertriglycéridémie, hyperglycémie à jeun et hypercholestérolémie (caractérisée par des taux plasmatiques élevés de cholestérol à lipoprotéines de basse densité (*low-density lipoprotein-cholesterol*, LDL-C) et réduits de cholestérol à lipoprotéines de haute densité (*high-density lipoprotein-cholesterol*, HDL-C) dont les seuils de diagnostic sont présentés en Tableaux 6 et 7 ¹⁷⁵. Ce syndrome est fortement associé à des facteurs de risque tels que le diabète de type 2 et les complications cardiovasculaires. Il s'appuie également fortement sur le développement de la résistance à l'insuline.

D'après les critères de l'American Heart Association (AHA), environ 35% des adultes américains, et 50% des adultes âgés de 60 ans ou plus ont un syndrome métabolique ¹⁷⁶.

Tableau 6. Critères retenus par l'American Heart Association et le National Heart, Lung, and Blood Pressure Institute (2005) pour le diagnostic du syndrome métabolique. Adapté de Grundy *et al.* ¹⁷⁷.

Critère	Seuils
Tour de taille élevé	≥102 cm (homme) ≥88 cm (femme)
Triglycérides élevés	≥150 mg/dL (1.7 mmol/L), ou Traitement de l'hypertriglycéridémie
High Density Lipoprotein-Cholesterol (HDL-C) réduits	<40 mg/dL (1.03 mmol/L) (homme) <50 mg/dL (1.3 mmol/L) (femme)
Pression systémique élevée	Pression systolique systémique ≥130 mmHg, ou Pression diastolique systémique ≥85 mmHg, ou Traitement de l'hypertension ou patient présentant un historique clinique d'hypertension
Glycémie à jeun élevée	≥100 mg/dL, ou Traitement de l'hyperglycémie

Tableau 7. Critères relatifs au diagnostic du syndrome métabolique en fonction des organismes référents.
D'après Skikanthan *et al.* ¹⁷⁸.

	IDF (Obésité + ≥2)	AHA (≥3)	NCEP ATP III (≥3)	OMS (Résistance à l'insuline/diabète + ≥2)	EGIR (hyperinsulinémie + ≥2)
Obésité	IMC >30 kg/m ² ou seuils de tour de taille spécifique au sexe et à l'origine ethnique	Tour de taille >101 cm pour les hommes et >88 cm pour les femmes	Tour de taille > 101 cm pour les hommes et >88 cm pour les femmes	Ratio tour de taille/ tour de hance > 0.9 pour les hommes et > 0.85 pour les femmes ou IMC>30 kg/m ²	Tour de taille ≥ 94 cm pour les hommes et ≥80 cm pour les femmes
Triglycérides élevés	TG ≥150mg/dL ou traitement	TG à jeun ≥ 150 mg/dL ou traitement	TG≥ 150 mg/dL ou traitement	TG≥150 mg/dL	TG≥177 mg/dL
HDL diminués	HDL<40 mg/dL pour les hommes et <50 mg/dL pour les femmes ou traitement	HDL<40 mg/dL pour les hommes et <50 mg/dL pour les femmes ou traitement	HDL<40 mg/dL pour les hommes et <50 mg/dL pour les femmes ou traitement	HDL <35 mg/dL pour les hommes et <39 mg/dL pour les femmes.	HDL < 39 mg/dL
Hypertension	PAS ≥130 ou PAD ≥85 mmHg ou traitement d'une hypertension précédemment diagnostiquée	Pression artérielle > 130/85 mmHg ou traitement d'une hypertension	PAS ≥130 ou PAD ≥85 mmHg ou traitement d'une hypertension	Pression artérielle ≥ 140/90 mmHg	Pression artérielle ≥ 140/90 mm Hg ou traitement d'une hypertension
Hyperglycémie	Glycémie plasmatique à jeun >100 mg/dL ou diabète de type II précédemment diagnostiqué	Glycémie à jeun > 100 mg/dL ou traitement	Glycémie à jeun > 100 mg/dL ou traitement	Résistance à l'insuline requise	Résistance à l'insuline requise (insuline plasmatique > 75 ^{ème} percentile)
Autres				Albumine urinaire ≥ 20 µg/min pour ratio albumine/créatinine ≥ 30 mg/g	

IDF : International Diabetes Federation, AHA : American Heart Association, NCEP ATP III : National Cholesterol Education Program – Adult Treatment Panel III, OMS : Organisation Mondiale de la Santé, EGIR : European Group for the Study of Insulin Resistance, IMC : Indice de masse corporelle, TG : triglycérides, HDL : High Density Lipoproteins, PAS : Pression Artérielle Systolique, PAD : Pression Artérielle Diastolique

3.2. Généralités

La prévalence du syndrome métabolique est en constante augmentation, d'une part aux Etats-Unis (29.2% vs 34.2% entre 1999 et 2006 ¹⁷⁹ mais également en Asie et en Amérique latine où les chiffres ne cessent de croître. En France, 1 individu sur 10 est obèse (chiffres OCDE [Organisation de Coopération de de Développement Economiques], juillet 2014). Il est intéressant de noter que cette augmentation de la prévalence, fortement soutenue par la propagation du « *Western diet* », est également appuyé par la disparité génétique des populations touchées, présentant plus ou moins de prédispositions au développement de la résistance à l'insuline. Ainsi, certaines populations américaines d'origine caucasienne,

africaine ou hispanique, avec une augmentation marginale du tour de taille (94-101cm pour les hommes, 80-87cm pour les femmes), peuvent présenter des facteurs génétiques contribuant fortement au développement d'une résistance à l'insuline, constituant ainsi une sous-population particulièrement à risque ¹⁸⁰⁻¹⁸².

3.3. Diagnostic

Le diagnostic de l'obésité repose sur l'indice de masse corporelle (IMC = poids (kg) / taille²(cm) >30) (Tableau 8).

Tableau 8. Statut en fonction de l'indice de masse corporelle

Indice de masse corporelle	Statut
< 18.5	Sous-poids
18.5-24.9	Normal
25.0-29.9	Surpoids
30.0-34.9	Obésité (classe I)
35.0-39.9	Obésité (classe II)
>40.0	Obésité sévère (classe III)

L'IMC constitue une estimation correcte de la masse grasse corporelle pour la majorité de la population générale. Il est néanmoins inadapté pour les sportifs de haut niveau, présentant une masse musculaire élevée, et également pour les enfants. Le diagnostic de l'obésité peut être complété d'une mesure du tour de taille, avec des seuils diagnostics fixés à >80cm pour les femmes et >102cm pour les hommes.

3.4. Etiologie

3.4.1. Etiologie comportementale de l'obésité

Le développement de l'obésité est fortement corrélé avec l'urbanisation et la diminution de l'activité physique. Par ailleurs, le temps du repas a diminué au cours des dernières décennies au point de ne plus permettre aux mécanismes de satiété d'agir (actifs après 30 min). De plus, une nourriture riche en triglycérides et en lipides active à la fois le circuit de la récompense et celui de l'accoutumance, entraînant une addiction chez une partie de la population ¹⁸³.

En outre, d'autres facteurs de risque prédisposants et combinés peuvent aboutir au développement de l'obésité. Tout d'abord, le patrimoine génétique peut conditionner à la fois la prise de masse grasse et la distribution de celle-ci, mais également l'efficacité du

métabolisme de conversion de la prise alimentaire en énergie, particulièrement lors de l'activité physique.

L'historique clinique des patients peut également jouer un rôle dans le développement de l'obésité, par exemple dans des contextes de syndrome de Prader-Willi ¹⁸⁴ ou de Cushing ¹⁸⁵, ou dans un contexte d'arthrose induisant une perte/réduction d'activité physique ¹⁸⁶. De plus, certains traitements peuvent provoquer une augmentation de la masse grasse si celle-ci n'est pas compensée par un régime alimentaire ou une activité physique adaptée (antidépresseurs, anti-diabétiques, antipsychotiques, stéroïdes, β -bloquants).

3.4.2. Etiologie génétique de l'obésité

Outre l'étiologie comportementale, on peut classer les facteurs génétiques et épigénétiques favorisant l'obésité en plusieurs classes :

- 1) Facteurs responsables de la régulation hormonale de l'appétit et de la satiété,
- 2) Facteurs régulant les taux de glucose corporels ¹⁸⁷⁻¹⁸⁹,
- 3) Régulation du taux métabolique basal ^{190,191},
- 4) Facteurs régulant la quantité, la disposition et la distribution des adipocytes ^{192,193},
- 5) Facteurs modulant la différenciations les cellules progénitrices ^{194,195},
- 6) Facteurs déterminant la lignée cellulaire adipocytaire ^{196,197}.

3.4.3. Obésité liée à la ménopause

L'augmentation de la prévalence du surpoids et de l'obésité chez les femmes en postménopause est un enjeu de santé public majeur ^{198,199}. En effet, la prévalence de l'obésité, qui augmente également le risque de survenue de complications cardiovasculaires, augmente significativement chez les femmes américaines après 40 ans. La prévalence est de 65% entre 40 et 59 ans et 73.8% au-delà de 60 ans ²⁰⁰.

Néanmoins, les mécanismes sous-jacents expliquant le lien entre la ménopause et l'obésité sont encore à ce jour peu connus. Il a été suggéré que la déficience en œstrogène pourrait être une cause majeure du développement de l'obésité ²⁰¹. En effet, la déficience en œstrogène favorise la dysfonction métabolique qui peut conduire à un diabète de type 2, un syndrome métabolique et des pathologies cardiovasculaires ²⁰²⁻²⁰⁴.

Chez l'homme comme chez la femme, les stéroïdes sexuels permettent la régulation du métabolisme des adipocytes. Ils influencent également les dépôts lipidiques^{205,206}. De fait, les hommes ont une quantité de masse grasse totale inférieure à celle des femmes mais principalement localisée au niveau du tissu adipeux intra-abdominal alors que les femmes ont une concentration de tissu adipeux localisé davantage au niveau glutéal, fémoral et sous-cutané²⁰⁷. Il est intéressant de noter que la distribution de la masse grasse abdominale varie chez les femmes avant et après la ménopause^{208,209}. En effet, la diminution de la concentration en ostéogène chez les femmes ménopausées conduit à une perte de masse grasse sous-cutanée et une augmentation de la masse grasse abdominale²¹⁰.

De plus, une étude menée sur un modèle murin d'ovariectomie associée à un régime riche en graisse a montré que l'administration d'E2 (estradiol) aux souris permet une amélioration de la sensibilité au glucose et de la sensibilité à l'insuline chez les souris WT mais pas chez les souris ER α ^{-/-} (ER : récepteur à l'estrogène). Ensuite, des études précliniques conduites sur le rat suggèrent que l'œstrogène contribueraient à renforcer les propriétés thermogéniques des adipocytes du tissu adipeux brun, via une augmentation de l'expression de la UCP1 (uncoupling protein 1)^{211,212}.

Par ailleurs, l'estrogène participe à la production d'ATP des mitochondries en agissant sur leur chaîne respiratoire. Or, l'ER α est exprimé dans le tissu adipeux brun et principalement localisé dans les mitochondries. Par conséquent, cibler ce récepteur ER α pourrait être une stratégie thérapeutique intéressante pour réduire la survenue du diabète de type 2 lié à l'obésité²¹³⁻²¹⁵.

Enfin, les taux d'œstrogène et les taux de leptine sont positivement corrélés chez la femme en préménopause^{216,217}. Les taux d'œstrogène et d'adiponectine sont eux inversement associés.

3.5. Physiopathologie du tissu adipeux

3.5.1. Définition

Le tissu adipeux est un tissu conjonctif majoritairement constitué d'adipocytes et de matrice extra-cellulaire. On distingue trois types de tissu adipeux chez l'Homme : le tissu adipeux blanc, le tissu adipeux brun et le tissu adipeux beige (également appelé *brite* ou *brown in white*), qui est localisée au sein du tissu adipeux blanc²¹⁸.

Chez l'Homme, le tissu adipeux est constitué à plus de 95% de tissu adipeux blanc. Il représente chez l'homme 15 à 20% de la masse totale, et 20 à 25% chez la femme.

Le tissu adipeux contient également des pré-adipocytes, cellules souches adultes qui permettront la formation d'adipocytes en fonction de la balance énergétique, des conditions hormonales et des conditions de nutrition. Parmi les autres types cellulaires constituant ce tissu, on retrouve les fibroblastes, les macrophages, les cellules sanguines et endothéliales^{219,220}.

3.5.2. Dérégulation de la fonction endocrine du tissu adipeux dans un contexte d'obésité

L'obésité centrale se caractérise par un déséquilibre de l'homéostasie calorique, induisant une accumulation de tissu adipeux péri-viscéral et sous-cutané, et entraînant une hyperplasie et une hypertrophie des adipocytes en raison d'un stockage important de triglycérides.

Le tissu adipeux, outre sa fonction de stockage énergétique, possède également une fonction endocrine. Il sécrète de nombreuses hormones, les adipokines (leptine, TNF- α par exemple)²²⁰. Le tissu adipeux est également capable de transformer certaines hormones telles que les stéroïdes sexuels (Tableau 9).

Tableau 9. Facteurs peptidiques et non peptidiques sécrétés par les adipocytes.

Facteurs sécrétés	Régulation hormonale
Lipoprotéine lipase	Augmentation : - Insuline - Glucocorticoïdes Diminution : - Catécholamines - Hormone somatotrope - Testostérone
Angiotensinogène	Augmentation : Glucocorticoïdes
Inhibiteur de l'activateur de plasminogène-1 Facteur de nécrose tumorale- α Protéine de transfert des ester de cholestérol Protéine de liaison du rétinol	Augmentation : - Insuline
Facteurs D (adipsine), C3, B et C1q	Diminution de l'expression génique de l'insuline
Production du facteur C38 précurseur de l' <i>acylation stimulating protein</i>	Augmentation de la sécrétion de l'insuline
Leptine	Augmentations : - Androgènes - Insuline - TNF- α - Glucocorticoïdes Diminution : - Catécholamines - Œstrogènes
Transporteur soluble de la leptine	
Facteur insulinomimétique-1 Monobutyryne Androgènes et œstrogènes	Augmentation : - Hormone somatotrope

L'obésité entraîne une dérégulation de la synthèse de cytokines par le tissu adipeux, induisant le passage d'un phénotype anti-inflammatoire (intégrant l'action de l'adiponectine et la *secreted frizzled-related protein 5*) vers un phénotype pro-inflammatoire²²¹. Celui-ci est médié d'une part par la diminution de l'expression des cytokines anti-inflammatoires et d'autre part par une augmentation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires (leptine, résistine, *retinol binding protein 4*, lipocaline-2, TNF et IL-6). Ceci conduit tout d'abord à une inflammation de bas grade du tissu adipeux, menant à une infiltration de ce tissu par les macrophages M1 eux-mêmes producteurs et libérateurs de cytokines pro-inflammatoires,

dont le TNF qui potentialise le développement de la résistance à l'insuline au sein des adipocytes. En effet, le TNF se fixe sur son récepteur membranaire TNFR1, induisant l'activation de différentes *mitogen-activated protein* (MAP) kinases, dont la kinase inhibitrice du facteur nucléaire k-B (IKK) et la c-jun N-terminal kinase (JNK), impliquées dans la phosphorylation de la sérine du substrat du récepteur à l'insuline, qui supprime la signalisation de l'insuline ^{222,223}.

En outre, le *pigment epithelium-derived factor* (PEDF), libéré par les adipocytes dans un contexte d'obésité et dont l'expression est régulée positivement chez les individus atteints de syndrome métabolique ou de diabète de type 2, entraîne une désensibilisation à l'insuline des tissus musculaires et hépatiques. Ceci conduit à une augmentation de la production d'insuline par le pancréas, puis à un cercle vicieux altérant la fonction pancréatique et aboutissant à une diminution de la production d'insuline, qui potentialise la survenue d'un diabète de type 2. D'autre part, le PEDF induit une signalisation pro-inflammatoire qui est associée à une réduction de l'action indépendante de la liaison de l'insuline à son récepteur (RI : récepteur à l'insuline), événement contribuant au développement de la résistance à l'insuline, en particulier dans le muscle squelettique et le foie ²²⁴. Enfin, la libération d'acides gras libres par le tissu adipeux entraîne également le développement de la résistance à l'insuline au sein du muscle squelettique et du foie.

La mise en place de cette inflammation de bas grade induit une réponse inflammatoire exacerbée du tissu adipeux corrélée à l'augmentation de la masse grasse. Cette réponse repose sur l'infiltration macrophagique du tissu adipeux, la résistance à l'insuline, une réponse exagérée de l'IL-6 et du TNF- α à des stimuli inflammatoires additionnels ¹⁷⁸, une augmentation de l'adhésion leucocytaire et plaquettaire et à un stress oxydatif (augmentation des taux de LDL-C oxydées et d'acide uriques) et une augmentation des facteurs pro-thrombotiques (PAI-1) ¹⁷⁸.

3.5.2.1. Adiponectine

L'adiponectine (une protéine plasmatique produite par les adipocytes ayant des propriétés anti-athérogénique et sensibilisant à l'insuline) est également suggérée comme biomarqueurs du syndrome métabolique. En effet, une étude conduite sur 661 patients japonais adultes (479 hommes, 53 ± 10 ans et 182 femmes 56 ± 10 ans) a permis d'obtenir une corrélation négative entre les taux d'adiponectine et le tour de taille, l'insuline plasmatique à jeun et les pressions artérielles systoliques et diastoliques. De plus, une corrélation positive a été établie entre les taux d'adiponectine et les concentrations en HDL cholestérol ²²⁵.

A l'inverse, Skrikanthan *et al.* ont identifié une diminution des taux de cytokines anti-inflammatoires (IL-10), de la ghréline (une hormone sécrétée principalement par l'estomac qui stimule directement l'appétit via l'activation du *GH secretagogue receptor 1a* (GHSR-1a) dans l'hypothalamus et indirectement en induisant l'augmentation de l'expression de peptides orexigènes ^{226,227}, de l'adiponectine et du facteur anti-oxident (PON-1).

En effet, les cytokines pro-inflammatoires, ainsi que les espèces réactives de l'oxygène libérées dans la circulation générale, couplées aux conditions d'hypertriglycémie et d'hypercholestérolémie du syndrome métabolique vont altérer l'ensemble de la fonction vasculaire, notamment en provoquant une augmentation de la résistance artérielle. A ceci s'ajoute l'augmentation de masse grasse qui induit une augmentation de la volémie, elle-même susceptible d'augmenter la pression artérielle et participant ainsi au développement de l'hypertension.

3.5.2.2. Plasminogen Activator Inhibitor -1

Le PAI-1 est un inhibiteur de la sérine peptidase dont la fonction est de moduler le remodelage et la fibrinolyse de la matrice extracellulaire en inhibant la fibrinolyse intravasculaire et protéolyse associée à la cellule ²²⁸. En conditions physiologiques, le PAI-1 est sécrété dans la circulation ou l'espace extracellulaire par les cellules endothéliales, les adipocytes, les cellules musculaires lisses vasculaires et les hépatocytes. En conditions pathologiques, la production de PAI-1 est induite par des marqueurs pro-inflammatoires et pro-oxydants. En effet, il a été montré que si des taux élevés de TNF- α , TGF- β , angiotensine II, glucocorticoïdes et insuline mais également l'hypoxie et les espèces réactives de l'oxygène,

stimulent la production de PAI-1 par les adipocytes et induisent des effets délétères sur le système vasculaire, l'inflammation, l'adiposité et la résistance à l'insuline ²²⁹.

Le taux de PAI-1 est un biomarqueur du syndrome métabolique ²³⁰⁻²³², particulièrement associé avec l'IMC, les triglycérides et la résistance à l'insuline ²²⁹. A nouveau, cette corrélation positive entre le taux de PAI-1 et la sévérité du syndrome métabolique est davantage établi chez les hommes que chez les femmes ²³³.

De plus, le PAI-1 pourrait être associé à l'inhibition de la dégradation de la fibrine et du remodelage de la paroi vasculaire, identifiant ainsi ce peptide comme un facteur de risque important de pathologies artérielles coronaires et, plus largement, de risque cardiovasculaire ^{234,235}. Ma *et al.* ont montré que l'antagonisme du récepteur minéralocorticoïde prévient l'effet de l'activation du SRAA sur l'antigène PAI-1 chez les sujets normo-tendus (n=18) et améliore l'équilibre fibrinolytique chez les sujets hypertendus (n=20) par un mécanisme indépendant du potassium ²³⁶.

3.5.2.3. La leptine :

La leptine est une adipokine qui, en conditions physiologiques, permet de réduire l'appétit, augmenter la dépense énergétique, augmenter l'activité sympathique, faciliter l'utilisation du glucose et améliorer la sensibilité à l'insuline ²³⁷. Elle est exprimée proportionnellement à la masse adipeuse.

Le récepteur à la leptine est situé dans l'hypothalamus où la liaison de l'hormone permet de réduire l'appétit et augmenter la dépense énergétique. Néanmoins, ce récepteur a également été identifié dans le cœur (notamment au niveau du muscle lisse et de l'endothélium), le foie, les reins, pancréas, la vaisseaux sanguins cérébraux et dans le myomètre ²³⁸. En raison de la large localisation de la leptine, ses effets sont variés.

Au niveau cardiaque, le récepteur à la leptine (OB-Rb) est impliqué dans le remodelage structurel du myocarde ²³⁹. Concernant l'implication de la leptine dans l'hypertrophie du VG, il n'y a à ce jour pas de consensus scientifique établi permettant de conclure soit sur l'effet protecteur de la leptine, soit sur son effet délétère. Néanmoins, il est à noter que la majorité des études soutient plutôt la thèse d'un effet délétère qui potentialise le développement de l'hypertrophie du VG ^{238,240}. Par ailleurs, plusieurs études ont montré que les taux de leptines

permettent de prédire la survenue d'un infarctus du myocarde, contribuant à soutenir l'hypothèse d'un effet délétère d'une haute concentration de leptine sur le myocarde ²⁴¹.

Enfin, la leptine dispense également des effets vasculaires. Elle est en effet associée au développement de l'hypertension, de l'angiogenèse et de l'athérosclérose ²³⁸.

De plus, la leptine est un biomarqueur clé du syndrome métabolique. Plusieurs études conduites sur des populations différentes ont permis de montrer que des taux élevés de leptine sont associés avec l'obésité, la résistance à l'insuline, l'infarctus du myocarde et l'insuffisance cardiaque congestive ²³⁸. Ce biomarqueur est également prédictif du développement d'un syndrome métabolique chez les enfants âgés de 6 à 11 ans ²⁴².

Des taux élevés de leptine ont également été identifiées chez des femmes en postménopause ayant un syndrome métabolique, avec une corrélation positive entre la concentration en leptine et l'obésité abdominale ainsi que la concentration de leptine et le nombre de critères du syndrome métabolique identifiés dans cette population ²⁴³.

Le lien entre le taux de leptine et le nombre de critères du syndrome métabolique a également été identifié dans une étude menée sur la population coréenne, où il apparaît que la concentration sérique en leptine est corrélée avec le nombre de critères du syndrome métabolique, et ce indépendamment de la présence ou non d'une obésité chez ces individus. Cela suggère que la réduction de la concentration en leptine pourrait avoir un effet bénéfique, indépendant de la perte de poids ²⁴⁴.

En opposition à cela, une autre étude menée par Martins *et al.* a mis en évidence une corrélation positive entre la leptine et l'obésité, l'hyperinsulinémie et la résistance à l'insuline ²⁴⁵.

Il est également intéressant de noter que l'utilisation du ratio leptine / adiponectine pourrait constituer un biomarqueur plus pertinent du syndrome métabolique ²⁴⁶. En effet, une étude menée sur une cohorte de patients japonais a mis en évidence l'association entre la valeur de ce ratio et le nombre de critères du syndrome métabolique retrouvés chez ces individus ²⁴⁷. Néanmoins, Cicero *et al.* ont suggéré que le ratio leptine / adiponectine serait pertinent pour les hommes, mais nettement moins pour les femmes, dont les taux plus élevés d'adiponectine constituerait une protection contre le syndrome métabolique ²⁴⁸.

En conclusion, si l'association entre le taux de leptine et son association précise avec les critères du syndrome métabolique ne font pas encore consensus au sein de la communauté scientifique et nécessitent des recherches plus approfondies, il n'en demeure pas moins que la leptine est un marqueur prédictif du syndrome métabolique, permettant à l'échelle de la population générale un screening soutenant le diagnostic.

3.5.3. Physiopathologie du tissu adipeux, taux d'aldostérone et implication du récepteur minéralocorticoïde

Dans un contexte d'obésité, l'accumulation du tissu adipeux péri-viscéral conduit à une activation du SRAA, avec une augmentation de la sécrétion locale d'angiotensinogène²⁴⁹⁻²⁵¹. Cette suractivation, conjointe à celle du système catécholaminergiques, participe au remodelage cardiovasculaire²⁵⁰ (Figure 14).

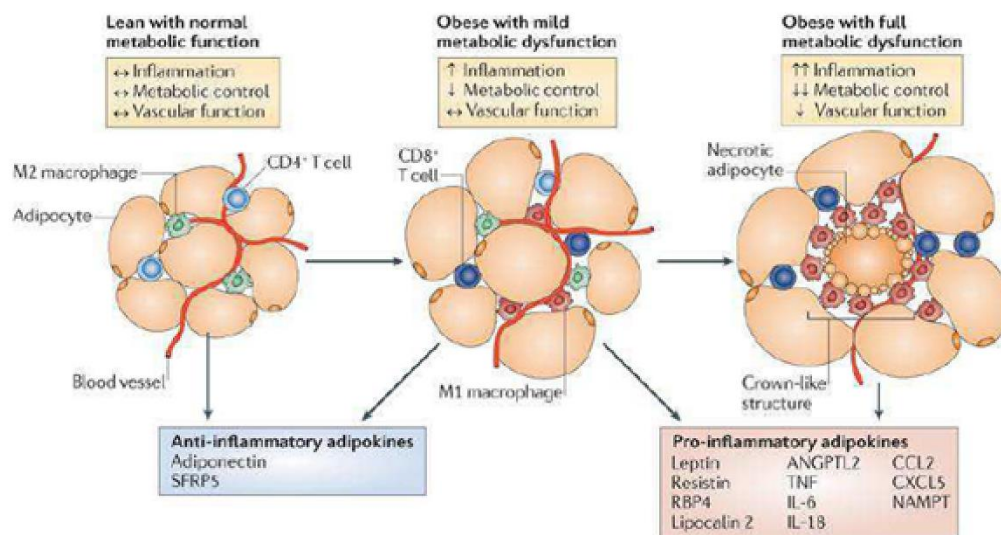


Figure 14. Impact physiopathologique de l'augmentation de la masse grasse sur l'inflammation, la fonction vasculaire et la nécrose en fonction de la sévérité de la dysfonction métabolique. D'après Nature Review, Immunology

Chez l'individu normal, l'inflammation, le contrôle métabolique et la fonction vasculaire sont régulées et à l'équilibre. Des adipokines anti-inflammatoires telles que l'adiponectine ou la secreted frizzled related protein 5 (SFRP5) sont synthétisées. Chez l'individu obèse avec une dysfonction métabolique modérée, on observe une augmentation de l'inflammation marquée notamment par l'apparition de cellules T CD8⁺ et de macrophages de type M1, une diminution du contrôle métabolique, mais un maintien de la fonction vasculaire. Les adipokines anti-inflammatoires précédemment évoquées sont toujours produites, mais en association avec des adipokines pro-inflammatoires, telles que la leptine, la résistine, le TNF ou l'IL-6. Chez l'individu obèse avec une dysfonction métabolique « totale », on observe une forte inflammation, une forte baisse du contrôle métabolique et une dysfonction vasculaire. L'adipocyte acquiert une structure en couronne, une nécrose adipocytaire survient, et des adipokines pro-inflammatoires sont synthétisées.

Il a également été montré que les patients ayant une obésité abdominale et une insuffisance cardiaque à fraction d'éjection réduite ont des concentrations élevées d'aldostérone sérique. Néanmoins, on ignore si les patients obèses avec une insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée ont une concentration d'aldostérone plus élevée sur les patients obèses avec une insuffisance cardiaque à fraction d'éjection réduite ²⁵².

Il a été montré que le RM a un effet pro-adipogénique, suggérant qu'il pourrait être impliqué dans l'accumulation des graisses via l'augmentation de l'expression du peroxysome proliferator-activated receptor-gamme (PPAR γ) ²⁵³. Il a été observé que l'inactivation du RM adipocytaire chez des souris mâles nourries par un régime riche en graisse pendant 16 semaines conduit à la diminution de l'expression des gènes de l'adipogenèse ²⁵⁴.

Le RM est également impliqué dans le blanchissement du tissu adipeux brun, le brunissement du tissu adipeux blanc et l'autophagie ²⁵⁵.

Enfin, l'intérêt potentiel des antagonistes du RM pour le traitement des maladies métaboliques a été suggéré. En effet, un traitement de 2 semaines par la spironolactone chez des individus adultes en bonne santé conduit à l'activation du tissu adipeux brun ²⁵⁶. Ces résultats restent toutefois à approfondir avant de pouvoir conclure sur l'effet bénéfique potentiel de l'antagonisme du RM sur le tissu adipeux.

Par ailleurs, les taux élevés d'aldostérone sont corrélés avec la présence d'un syndrome métabolique et de pathologies cardiovasculaires et rénales ²⁵⁷. Marzolla *et al.* ont mis en évidence un cross-talk entre le tissu adipeux et la glande surrénale, qui pourrait fournir une voie d'explication entre les taux élevés d'aldostérone et le syndrome métabolique. Particulièrement, l'activation du RM dans le tissu adipeux contribuerait à l'inflammation du tissu adipeux médiée par l'adipocyte ²⁵⁸.

En conclusion, bien que la pathogenèse du syndrome métabolique et de ses dysfonctions associées soit aujourd'hui encore méconnue, le consensus scientifique actuel s'accorde à dire que l'obésité centrale et la résistance à l'insuline sont les causes principales à l'origine des dysfonctions cardiovasculaires liées au syndrome métabolique. L'impact du RM dans ce processus pathologique est suggéré, mais reste à déterminer.

3.6. Thérapies actuellement utilisées

Le traitement médicamenteux de l'obésité concerne les individus présentant un IMC>30 ou ceux présentant un IMC>27 associé à des comorbidités telles que le diabète de type 2, l'hypertension, l'apnée du sommeil. En première intention, l'objectif est d'atteindre une perte de poids modérée (3 à 5% du poids corporel), associée à un changement des habitudes alimentaires et une activité physique adaptée et régulière. En parallèle, des traitements médicamenteux favorisant la perte de poids peuvent être prescrits, tels que l'orlistat (Xenical) (bloqueur de la lipase intestinale) et le toiramate (Sqymia) (antiépileptique), le bupropion (anti-dépresseur) et la naltrexone (Contrave) (antagoniste opiacé). Les cas extrêmes (IMC>40, IMC>35 associé à une comorbidité sévère de l'obésité ou patients prêts à assumer le changement d'habitudes de vie nécessaire à la réussite de la thérapie) quant à eux peuvent faire l'objet d'une chirurgie bariatrique (bypass ou sleevectomie principalement), qui présente à la fois le plus haut taux de réussite et de risque.

Le traitement, qu'il soit médicamenteux ou chirurgical, nécessite ensuite une alimentation surveillée et la pratique quotidienne d'exercice physique pour pallier la reprise de poids.

3.7. Conséquences du syndrome métabolique

3.7.1. Conséquences cardiaques

Le surpoids et l'obésité sont des comorbidités fréquentes de l'insuffisance cardiaque. Bien que les prévalences varient en fonction des populations étudiées, il est estimé qu'entre 29 et 40% des patients avec une insuffisance cardiaque sont en surpoids et 30 à 49% sont obèses. De plus, la prévalence de l'obésité chez les individus ayant une insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée (80%) est significativement plus importante que chez les patients ayant une insuffisance cardiaque à fraction d'éjection réduite (<50%) ^{259,260}.

Les individus ayant un syndrome métabolique présentent 2 fois plus de pathologies cardiovasculaires que la population générale. Ces patients présentent également un risque accru de mortalité liée aux pathologies cardiovasculaires ²⁶¹. En cause, les différentes dérégulations évoquées plus haut mais également les dysfonctions vasculaires et rénales. Un des enjeux majeurs cliniques actuel est la détection et prise en charge précoces des potentielles complications cardiovasculaires ^{262,263}.

3.7.2. Conséquences vasculaires

L'obésité, ou plus largement le syndrome métabolique, entraîne une altération de la fonction vasculaire. Cette altération conduit à une diminution de la perfusion des membres inférieurs, potentialisant la survenue d'événements ischémiques (en particulier d'ulcères des membres inférieurs). En outre, cette altération de la fonction vasculaire est préjudiciable au bon fonctionnement des organes et augmente les risques de dysfonctions cardiaques et rénales. Plus précisément, l'élévation des taux circulants de cholestérol et de triglycérides potentialise l'inflammation ainsi que la dysfonction endothéliale et contribue ainsi d'une part au développement de l'insuffisance cardiaque et d'autre part à la progression d'athérosclérose. Plus particulièrement, les patients atteints d'un syndrome métabolique ont une prévalence plus élevée de dysfonction cardiaque diastolique ²⁶⁴⁻²⁶⁶.

3.7.3. Conséquences rénales

De plus, de récents travaux ont montré une forte association entre l'obésité et la protéinurie et/ou la réduction de la fonction rénale. En effet, l'obésité entraîne une hyperfiltration glomérulaire, elle-même pouvant conduire à une dysfonction rénale. Des études pré-cliniques suggèrent que cette hyperfiltration serait en partie associée à l'augmentation de l'adiposité viscérale (via une modulation des taux de leptine) et de la production d'adipokines pro-inflammatoires, stimulant ensemble la production d'aldostérone par les glandes surrénales ^{267,268}.

Parmi d'autres facteurs pouvant influencer la progression de la pathologie se trouvent l'inflammation tissulaire ainsi que le stress oxydatif, contribuant à leur tour à l'altération de la filtration glomérulaire, et pouvant conduire à une fibrose glomérulaire et tubulointerstitielle ²⁶⁹. L'épidémie d'obésité a entraîné une augmentation de l'incidence de la glomérulopathie liée à l'obésité, caractérisée par une protéinurie, une glomérulomégalie, une glomérulosclérose progressive et un déclin fonctionnel rénal. Une étude rétrospective qui a évalué des échantillons de biopsies de reins natifs reçus à l'Université Columbia (New York, États-Unis) a signalé une multiplication par 10 de l'incidence de la glomérulopathie liée à l'obésité, qui est passée de 0,2 % en 1986-1990 à 2,0 % en 1996-2000, puis à 2,7 % en 2001-2015. Dans cette étude, toutes les biopsies de glomérulopathie liée à l'obésité ont été

réalisées pour une maladie rénale manifeste : 56 % des patients présentaient une protéinurie et 44 % une protéinurie et une insuffisance rénale ²⁶⁹.

3.7.4. Diabète de type II

Une proportion importante d'individus ayant un syndrome métabolique a une résistance à l'insuline, ce qui conduit à une augmentation du risque de développement de diabète de type II. De plus, l'apparition du diabète de type II chez un patient augmente également l'incidence de pathologies cardiovasculaires.

3.7.5. Autres conséquences

Au-delà des pathologies cardiovasculaires et du diabète de type II, les individus ayant un syndrome métabolique présentent également une prévalence plus élevée de syndrome des ovaires polykystiques, foie gras, cholestérol, calculs biliaires, asthme, troubles du sommeil et certaines formes de cancer ^{270,271}.

3.7.6. Synthèse

La figure 15 synthétise les interactions entre les adipokines, cytokines et les marqueurs inflammatoires contribuant au développement du syndrome métabolique et de ses complications associées.

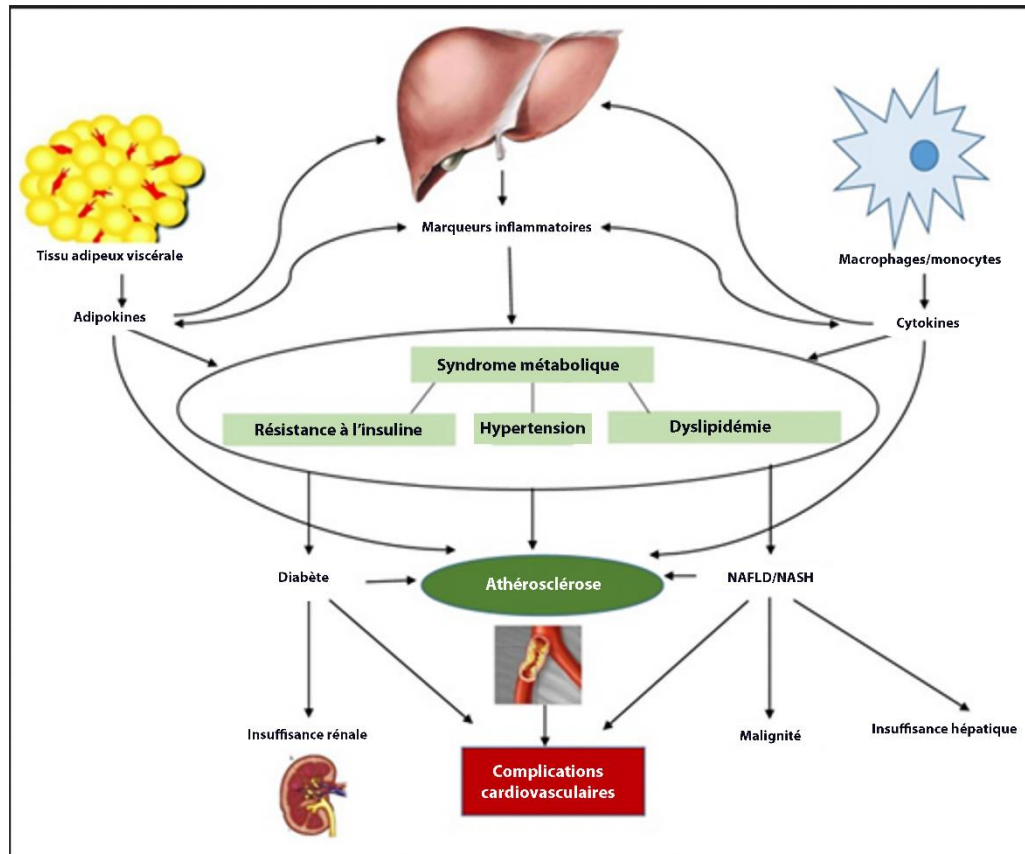


Figure 15. Interaction des adipokines, cytokines et marqueurs inflammatoires contribuant au développement du syndrome métabolique et de ses complications ¹⁷⁸.

HTN : Hypertension. NAFLD/NASH : Nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis

Le tissu adipeux viscéral, en conditions de syndrome métabolique, induit la production d'adipokines pro-inflammatoires, qui vont potentialiser la synthèse de marqueurs inflammatoires et de cytokines, jouer un rôle dans la résistance à l'insuline, l'hypertension et la dyslipidémie liées au syndrome métabolique et promouvoir le développement de l'athérosclérose, elle-même à l'origine de complications cardiovasculaires.

3.8. Rôle du récepteur minéralocorticoïde dans le syndrome métabolique

Des études cliniques et précliniques suggèrent des relations étroites entre le syndrome métabolique, la résistance à l'insuline et l'hypertension, impliquant le RM ^{272,273}. En effet, le rôle potentiel de l'aldostérone dans le développement des altérations métaboliques est suggéré dans l'hypertension essentielle. En particulier, une corrélation positive a été montrée entre le taux d'aldostérone et le glucose plasmatique, l'insuline, le peptide-C (peptide de

connexion assurant la liaison entre les chaînes A et B de l'insuline et marqueur de la sécrétion d'insuline) et l'index HOMA (HOMeostasis Model Assessment of insuline resistance) chez des individus blancs, et entre le taux d'aldostérone, le tour de taille, le cholestérol total, la triglycéridémie, le taux d'insuline et l'index HOMA chez des individus noirs.

En accord avec ceci, une seconde étude rapporte une association entre le taux d'aldostérone plasmatique et le syndrome métabolique ²⁷⁴. Également, un taux plus élevé d'événements cardiovasculaires est observé chez les patients atteints d'aldostéronisme primaire, et cette étude montre que ces individus sont davantage concernés par le syndrome métabolique comparés aux individus hypertendus (41% vs 29.6%) ²⁷⁵. En particulier, Fallo *et al.* ont observé une altération plus fréquente du métabolisme du glucose chez les patients avec un aldostéronisme primaire, soutenant ainsi l'implication du SRAA dans les altérations métaboliques.

De plus, il a été montré que la spironolactone améliore la dysfonction diastolique induite par un régime riche en graisse et en sucre (*Western Diet*) administré pendant 16 semaines chez des souris femelles. Une autre étude menée sur des souris rendue obèses par un régime riche en graisse (45%) montre que dans les adipocytes, le RM contribue à la sécrétion d'adipokines, à la résistance à l'insuline et à la conversion du tissu adipeux brun en tissu adipeux blanc, contribuant ainsi globalement aux phénotypes pro-diabétique et pro-inflammatoire et à l'augmentation de masse grasse. Cette suractivation du RM serait liée à l'inflammation excessive des adipocytes viscéraux et périvasculaires. Ensuite, une étude menée sur des souris *db/db* présentant une délétion du récepteur à la leptine et spontanément obèses, ainsi que sur des patients obèses, montre une augmentation de l'activation du RM dans le tissu adipeux viscéral et sous-cutané. Une autre étude menée sur des souris adipo-RMOE surexprimant le RM spécifiquement dans les adipocytes montre que, soumises à un régime normal, ces souris présentent une prise de poids associée à une augmentation de la masse du tissu adipeux viscéral avec une hypertrophie des adipocytes, par rapport à des souris contrôles. De même, la glycémie à jeun et la concentration en insuline plasmatique sont augmentées chez ces souris adipo-RMOE.

Concernant les conséquences cardiovasculaires de l'obésité, une étude menée sur des rats DOCA-Salt/Obèses avec dysfonction diastolique et traités avec 15 mg/kg/j d'eplerenone pendant 5 semaines, montre une diminution de l'hypertrophie ventriculaire gauche, de la

fibrose interstitielle et périvasculaire et du stress oxydatif ²⁷⁶. Une seconde étude, menée sur des rats Zucker obèses âgés de 29 semaines, ayant également une dysfonction diastolique et traités avec 1 mg/kg/j de spironolactone pendant 3 semaines montre une diminution de la fibrose périvasculaire et interstitielle, du stress oxydatif et de l'inflammation. Particulièrement, cette étude souligne l'importance de l'inflammation dans le tissu adipeux dans un contexte de syndrome métabolique ²⁷⁷.

4. Insuffisance rénale, diabète de type II et événements cardiovasculaires

A la croisée des chemins entre l'insuffisance rénale chronique, l'insuffisance cardiaque et le diabète de type II, l'essai clinique FIGARO-DKD portant sur 5 734 patients atteints d'insuffisance rénale chronique et de diabète de type II a étudié l'effet de la finérénone. Les résultats montrent une diminution de l'insuffisance rénale, d'une diminution durable du débit de filtration glomérulaire estimé ou de mort par cause rénale pour les patients traités par la finérénone. De plus, un moindre risque de mort par cause cardiovasculaire, d'infarctus du myocarde non fatal, d'AVC non fatal ou d'hospitalisation pour insuffisance cardiaque a également été montré chez ces patients. Ensemble, ces résultats soutiennent les effets bénéfiques de la finérénone ²⁷⁸.

De plus, l'essai clinique FIDELIO-DKD, portant sur les effets de la finérénone chez 13 911 patients atteints d'insuffisance rénale chronique et de diabète de type II a montré une diminution du risque d'événement cardiovasculaire lors d'un suivi médian de 2,6 ans. L'incidence d'hyperkaliémie observée est de 2.3% pour les patients avec des antécédents cardiovasculaires traités par la finérénone contre 0.8% des patients traités par un placebo et 2.2% pour les patients sans antécédents cardiovasculaires traités par la finérénone contre 1.0% pour les patients traités par un placebo ²⁷⁹.

A ce jour, la finérénone est approuvée aux Etats-Unis (juillet 2021) et dans l'Union Européenne (février 2022) pour réduire le risque de diminution durable du débit de filtration glomérulaire estimé, d'insuffisance rénale terminale, de décès d'origine cardiovasculaire, d'infarctus du myocarde non fatal et d'hospitalisation pour insuffisance cardiaque chez les adultes atteints d'insuffisance rénale chronique associée à un diabète de type II. Un essai clinique de phase III étudie la finérénone chez des patients atteints d'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée ²⁸⁰.

Rationnel

Il n'y a à ce jour pas de consensus scientifique et de preuve formelle pour la prise en charge thérapeutiques des patients avec une insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée. Cette pathologie, multifactorielle et complexe, nécessite des essais cliniques randomisés à large échelle afin de positionner une stratégie thérapeutique non seulement fiable mais également adaptée aux différents phénotypes des patients.

En effet, l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée est étroitement associée avec plusieurs comorbidités telles que l'hypertension, l'obésité, le diabète de type II ou la ménopause qui peuvent perturber le mode d'action des stratégies thérapeutiques positionnées pour l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection réduite.

Dans ce contexte, les antagonistes du récepteur minéralocorticoïde, affranchis de leurs effets secondaires grâce à la formulation non stéroïdienne de la finénéronne, pourraient être une solution thérapeutique intéressante, même si les essais cliniques menés jusqu'ici peinent à fournir des résultats satisfaisants.

C'est pourquoi l'objectif de cette thèse est de tester l'efficacité de la finénéronne dans deux modèles murins d'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée ; tout d'abord à travers une première étude portant sur un modèle de souris rendues obèses par un régime riche en graisse, régime qui est ensuite normalisé et associé au traitement, et ensuite, à travers une seconde étude portant sur un modèle de souris ovariectomisées.

Chapitre 2. Matériel et Méthodes

2.1. Modèles animaux et conditions expérimentales

Les expérimentations menées au cours de cette thèse de doctorat respectent les normes et réglementations éthiques en vigueur (CENOMEXA C2EA-54).

Les souris ont été hébergées en portoir ventilé, avec un accès à l'eau et à la nourriture *ad libitum*, en cycle jour/nuit 12h avec une température contrôlée entre $22\pm 2^{\circ}\text{C}$. Les cages sont dans la mesure du possible constituées de 5 souris, permettant une organisation hiérarchique similaire entre les cages.

2.1.1. Etude 1

Des souris de souche B6D2 ont été nourries par un régime riche en graisse pendant 16 semaines. Au sein du laboratoire, le Dr Roche a mené une étude portant sur des souris FVB/N mâles nourris par un régime gras (60% des calories délivrées sous forme lipidique) pendant 16 semaines identique à celui utilisé lors de notre étude 1. Son étude a montré une augmentation de la glycémie à jeun et des taux plasmatiques d'insuline, accompagnée d'une augmentation des acides gras libres et du LDL-C. De plus, l'altération de la fonction endothéliale coronaire, l'augmentation de la fibrose cardiaque, la diminution du ratio E/A et de la relation pression-volume en télédiastole ont montré que ce modèle d'obésité conduit à une dysfonction diastolique après 16 semaines de régime, qui s'accompagne de désordres métaboliques ²⁸¹. Nous avons donc utilisé ce modèle, mais sur la souche B6D2, qui est la souche des souris surexprimant le RM dans les cardiomyocytes, utilisée dans les études préliminaires à ce projet.

Le régime gras contient 20% de protéines, 36% de lipides, 36.7% de glucides, 4.5% de minéraux et 14.5% d'amidon, délivrant 5.5 kcal/g. Le régime contrôle contient 52% de glucides, 21.4% de protéines, 4% de fibres, 5.4% de minéraux et 5.1% de lipides. La nourriture riche en graisse s'oxydant rapidement, elle a été remplacée chaque semaine. Le poids des souris ainsi que leur consommation de nourriture ont été mesurés chaque semaine sur la même balance.

A l'issue de ces 16 semaines, les souris mâles de souche B6D2 ont été séparées en 3 groupes pour 8 semaines supplémentaires :

- 1) Souris maintenues sous régime gras (HFD)
- 2) Souris avec retour au régime standard (A03 SAFE, 3,2 kcal/g) (HS)
- 3) Souris avec retour au régime standard (A03 SAFE, 3.2 kcal/g) et traitement par la finérénone (HS+Fine). La finérénone, fournie par Bayer AG, a été incorporée dans la nourriture standard en poudre à la dose de 1 mg/kg/jour.

Remarque : Des tunnels en carton ont été ajoutés comme enrichissement de l'environnement dans chaque cage, de manière à améliorer le bien-être animal.

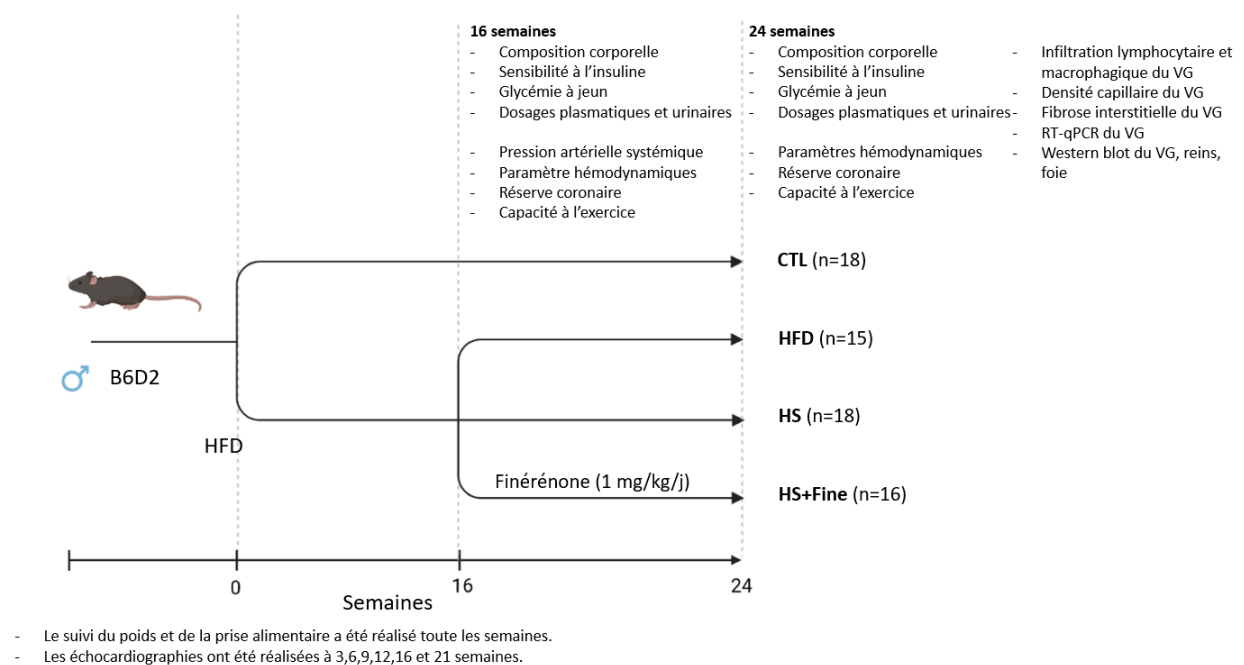


Figure 16. Design expérimental de l'étude 1.

2.1.2. Etude 2

Des souris femelles de fond génétique B6D2 WT ont été ovariectomisées à 12 semaines pour obtenir un modèle de postménopause, puis séparées à 7 mois en deux groupes :

- 1) Souris ayant reçues une opération fantôme (*sham*) (CTL),
- 2) Souris ovariectomisées (OVX),
- 3) Souris ovariectomisées recevant un traitement par la finérénone pendant 1 mois (1 mg/kg/jour) mixée à de la nourriture en poudre (A03 SAFE).

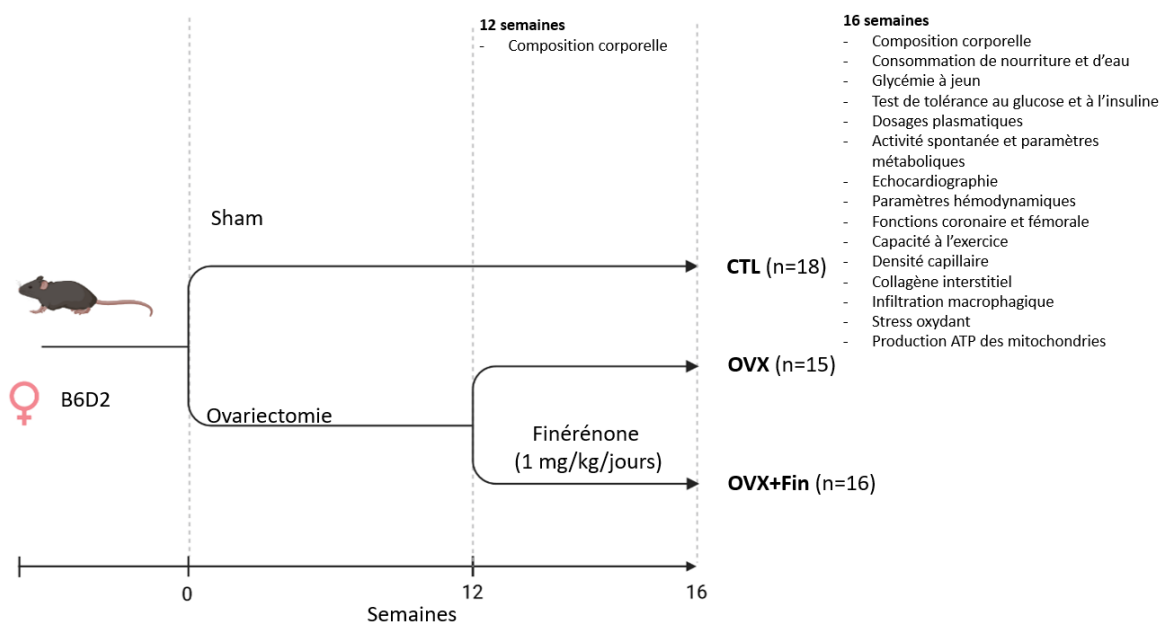


Figure 17. Design expérimental de l'étude 2.

Procédure d'ovariectomie :

Les souris ont été anesthésiées par injection intrapéritonéale (IP) (0.01 mL/g) de xylazine/kétamine (0.2mL xylazine Rompun 1% Bayer + 1mL kétamine, Imalgene + 8.8 mL de sérum physiologique). L'anesthésie a été maintenue par inhalation d'isoflurane (1-2%). Après une double incision dorsolatérale et la séparation de la musculature, le coussinet adipeux ovarien a été écarté, puis la région sous-ovarienne a été clampée, ligaturée en 2 points et retirée. Ensuite, l'artère ovarienne est ligaturée en 2 points et sectionnée. Enfin, les muscles et la peau ont été recousus. Le succès de l'ovariectomie a été vérifié au sacrifice des souris en pesant l'utérus résiduel.

2.2. Paramètres métaboliques

2.2.1. Composition corporelle par Echo-IRM

La composition corporelle a été suivie par Echo-IRM EMR-185 (Echo-IRM, Houston, Texas), permettant d'obtenir les masses grasse et maigre ainsi que la teneur en eau présente dans le tissu maigre. L'écho-IRM est une technique non-invasive, utilisant un champ magnétique de faible fréquence pour dénombrer les atomes d'hydrogène contenus dans les lipides et l'eau. La calibration est réalisée avec de l'huile de canola, dont la composition chimique est similaire à celle des rongeurs. La masse grasse inclut toutes les cellules adipeuses du corps. La masse maigre correspond à la masse musculaire (incluant les organes et l'eau),

en excluant la masse grasse, les os et les poils. Ces paramètres sont normalisés par rapport au poids de l'animal pour obtenir les pourcentages de masse grasse, masse maigre et teneur en eau dans la masse maigre.

Cette mesure permet d'évaluer finement les changements corporels lors de la prise de poids, ou de l'amaigrissement des animaux.

2.2.2. Test de sensibilité à l'insuline

Le test de sensibilité à l'insuline permet d'observer les variations de la glycémie à la suite d'une mise à jeun suivie d'une injection de glucose. La perte de sensibilité à l'insuline est largement décrite dans le syndrome métabolique et joue un rôle majeur dans le diabète de type II.

Après un jeûne de 9h à 15h, on injecte de l'insuline humaine (Actrapid, Novo Nordisk, France) par IP (0.75 u/kg). La glycémie est mesurée avant l'injection (t=0), puis après 15, 30, 45, 60, 90 et 120 minutes. La queue est légèrement incisée puis une goutte de sang est déposée sur une bandelette réactive (Glu-Test Strips, Nova Biomedicals, Royaume-Uni), lue par glucomètre (Stat Strip Xpress-I, Nova Biomedicals, Royaume-Uni).

2.2.3. Test de sensibilité au glucose

Le test de sensibilité au glucose permet d'observer les variations de la glycémie suite à une mise à jeun suivie d'une injection de glucose. L'hyperglycémie à jeun, notamment, est un des critères de diagnostic du syndrome métabolique.

Après un jeûne de 9h à 15h, les souris sont gavées avec du glucose (2.0 u/kg). La glycémie est mesurée avant le gavage, puis à 15, 30, 45, 90 et 120 minutes. La queue est légèrement incisée puis une goutte de sang est déposée sur une bandelette réactive (Glu-Test Strips, Nova Biomedicals, Royaume-Uni), lue par glucomètre (Stat Strip Xpress-I, Nova Biomedicals, Royaume-Uni).

2.2.4. Profil métabolique plasmatique

Les taux de triglycérides et le cholestérol total plasmatiques ont été mesurés en utilisant l'Idexx Catalyst Dx (Paris, France). La mesure repose sur une technologie brevetée de plaquettes composées d'une première couche de filtre appelée couche de dispersion et permettant de limiter les substances altérantes et d'obtenir une distribution homogène de l'échantillon, puis d'une couche filtrante qui retient les substances qui interfèrent avec les

résultats, d'une couche réactive où les réactifs réagissent avec l'échantillon, une couche indicateur où l'échantillon est recueilli pour analyse spectrale et enfin une couche support pour l'interface optique.

L'élévation des taux plasmatiques de cholestérol et de triglycérides est un critère de diagnostic du syndrome métabolique et est le témoin de désordre métabolique.

2.2.5. Pesée du gras sous-cutané

Le gras sous-cutané a été prélevé au niveau abdominal et pesé. Le gras sous-cutané abdominal est lié avec la résistance à l'insuline et le syndrome métabolique ²⁸².

2.3. Paramètres cardiovasculaires

2.3.1. Pléthysmographie

La pression périphérique est mesurée de manière non-invasive par pléthysmographie à la queue (CODA, Kent Scientific Corporation). Un brassard se gonfle jusqu'à un niveau de pression supérieur à la pression systolique, puis se dégonfle lentement. Une habitude de 15 cycles répétée 3 fois est réalisée pendant 2 jours, puis les mesures sont réalisées pendant les 3 jours suivants (15 cycles répétés 3 fois).

L'hypertension est un des critères du syndrome métabolique. Il est également une des causes du développement de pathologies cardiovasculaires.

2.3.2. Echocardiographie

L'échographie est une technique d'imagerie employant les ultrasons émis et reçus par la sonde. L'élément de base de l'échographie est la plupart du temps une céramique piézoélectrique qui, soumise à des impulsions électriques, vibre et génère des ultrasons. Les échos enregistrés dépendent des obstacles rencontrés par les ultrasons, soit de l'échogénicité des tissus.

Comme évoqué précédemment, l'échographie est une technique centrale de diagnostic de l'insuffisance cardiaque, car elle permet la visualisation et la mesure des paramètres tissulaires et des flux sanguins (échographie Doppler).

Les mesures échographiques ont été utilisées en utilisant un échographe Vevo 3100 (Fuji Film) équipé d'une sonde linéaire d'une fréquence de 14 MHz sur des souris anesthésiées par inhalation d'isoflurane (dose comprise entre 1.5% et 2% en fonction du poids de l'animal). L'acquisition des images en mode temps-mouvement (bidimensionnel) est réalisée

en vue parasternale petit axe au niveau des muscles papillaires du ventricule gauche, permettant de mesurer les diamètres systolique et diastolique du ventricule gauche ainsi que les épaisseurs des parois antérieures et postérieures (Figure 18). La fraction de raccourcissement, indicateur de contractilité, est calculé comme :

$$\text{Fraction de raccourcissement (\%)} = \frac{\text{diamètre diastolique} - \text{diamètre systolique}}{\text{diamètre diastolique}} \times 100$$

L'intégrale Temps-Vitesse (ITV, cm) et la fréquence cardiaque a été mesurée en Doppler pulsé au niveau de l'aorte thoracique (Figure 19). Ces paramètres permettent de calculer le volume d'éjection :

$$\text{Volume d'éjection (mL)} = \text{ITV aortique} \times \pi \times \frac{\text{Diamètre aorte}^2}{4}$$

et le débit cardiaque :

$$\text{Débit cardiaque mL/min} = \text{Volume d'éjection} \times \text{Fréquence cardiaque}$$

Le flux mitral est mesuré en Doppler pulsé permettant de calculer les ratios E/A et E/E', indicateurs de la fonction diastolique. L'onde E (pour *Early*) correspond à la Vitesse de remplissage ventriculaire. L'onde A (pour *Atrial*) correspond à la contraction de l'oreillette déclenchant la fin du remplissage (Figure 20).

La dilatation en fonction du flux médiée par la température a été mesurée au niveau de l'artère fémorale gauche. Un tube connecté à un bain-marie était attaché au niveau du dessous de la patte de la souris avec une sonde de température. Les mesures ont été prises à 34, 37, 40 et 43°C. Le diamètre artériel a été acquis en B-mode et le flux sanguin et la fréquence cardiaque en mode Doppler.

Les données ont été analysées avec le logiciel VevoLab3100. Le volume d'éjection fémoral (mL/battement) a été calculé comme suit :

$$\text{Volume d'éjection} \frac{\text{mL}}{\text{battement}} = \text{ITV} \times \pi \times \frac{\text{diamètre artère fémorale}^2}{4} \times 100$$

Le débit fémoral (mL/min) a été calculé comme suit :

$$\text{Débit fémoral mL/min} = 60 \times \text{Volume d'éjection} \times \text{Fréquence cardiaque}$$

Le shear stress (dynes/cm²) a été calculé comme suit :

$$\text{Shear stress} = \frac{4\mu \times \text{Débit fémoral}}{60} \times \left(\frac{\pi \times \text{Diamètre artère fémorale}}{2} \right)^3$$

Avec viscosité (μ) = 0.0021.

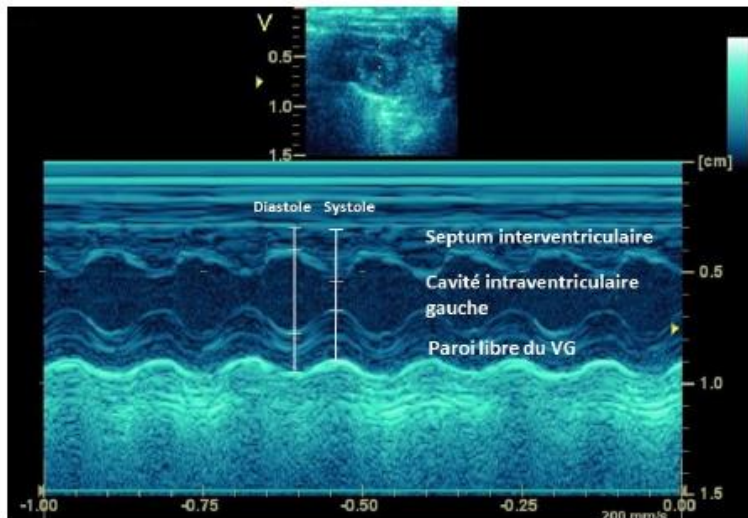


Figure 18. Mode Temps Mouvement en échocardiographie et mesures associées

Cette image montre le mode temps mouvement en échocardiographie qui met en évidence les phases de systole et de diastole du ventricule gauche. En haut on voit le septum interventriculaire, au centre la cavité intraventriculaire gauche, puis la paroi libre du ventricule gauche. L'épaisseur des parois et le diamètre des ventricules sont mesurés en systole et en diastole.

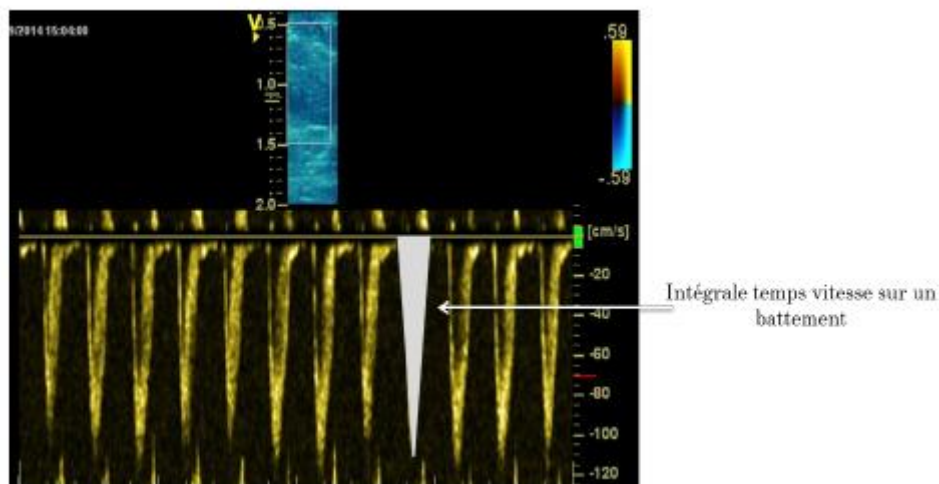


Figure 19. Exemple d'enregistrement de l'intervalle temps-vitesse en mode Doppler pulsé

Cette image montre un exemple des pics obtenus au niveau de l'aorte thoracique. Chaque pic correspond à un cycle cardiaque. La zone grisée correspond à l'aire sous la courbe qui est mesurée.

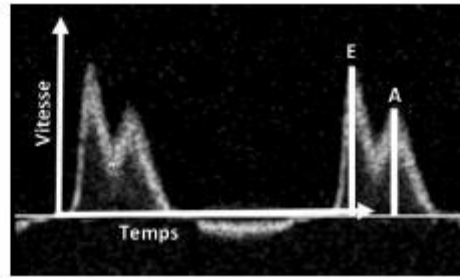


Figure 20. Mode Doppler pulsé en échocardiographie permettant la mesure des vitesses des ondes E et A et l'obtention du ratio E/A

Cette image montre la mesure des vitesses de l'onde E (premier pic) et de l'onde A (deuxième pic). Le ratio des ondes E/A est un indicateur de la dysfonction diastolique.

2.3.3. Paramètres hémodynamiques

L'hémodynamique invasive permet la mesure des pressions intraventriculaires et caractérise finement les dysfonctions systoliques ou diastoliques.

Les souris ont été anesthésiées (Inactin® hydrate C-IIIIN, Sigma, 10 mg/kg/ IP) et la carotide droite a été cathétérisée avec un micro-manomètre de conductance miniaturisé pour l'enregistrement de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque. La sonde est ensuite placée dans le VG pour la mesure des pressions intraventriculaires gauche. Les courbes pression-volumes sont relevées à l'état basal puis en augmentant la postcharge en occluant délicatement l'aorte abdominale avec un coton-tige. Les data sont stockées et analysées avec le logiciel *conductance data acquisition and analysis* de Millar. Enfin, les relations pression-volumes en télésystole et télédiastole sont mesurées ou calculées (Figure 21).

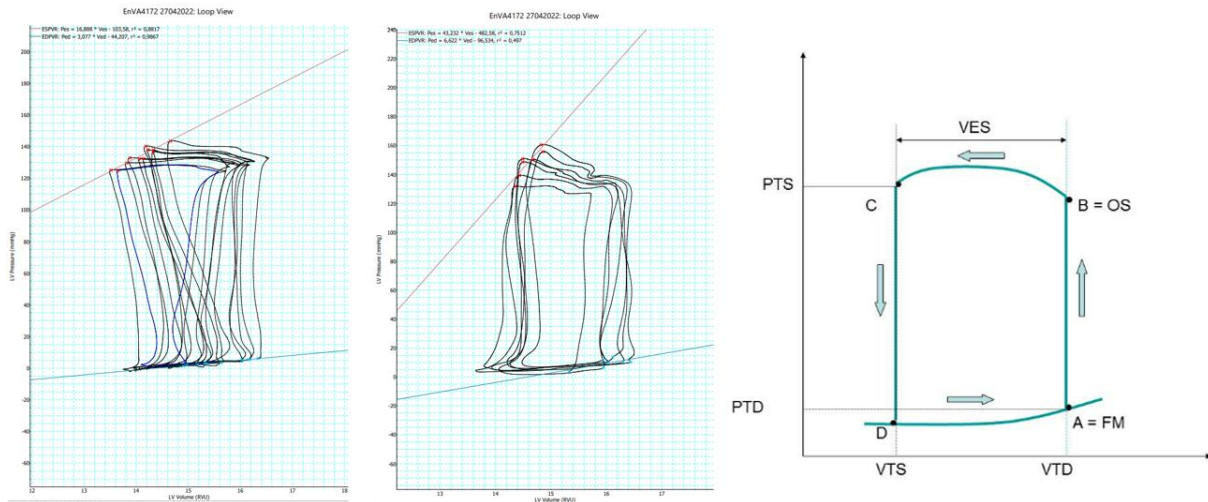


Figure 21. Prise de vue des courbes pression-volumes

A gauche : exemple de courbes pression-volume obtenue avec notre équipement. A droite : représentation schématique de la courbe pression-volume. La contraction débute à partir du point A de coordonnées (VTD (volume télédiastolique), PTD (pression télédiastolique)). La phase isovolumétrique se passe entre le point A et le point B. Le volume ne change pas et la pression augmente, on obtient donc une droite. Au point B, l'éjection ventriculaire rapide débute, conjointement avec une augmentation de la pression. La contraction se termine jusqu'au point C de coordonnées (VTS (volume télésystolique), PTS (pression télésystolique)). Du point C au point D se passe la phase de relaxation isovolumétrique. Le volume ne change pas et la pression diminue, on obtient à nouveau une droite. Au point D, la valve auriculo-ventriculaire s'ouvre et le remplissage diastolique commence. Du point D à A, on observe la compliance générale du ventricule gauche, conséquence de la relaxation, et de la rigidité de la chambre ventriculaire (c'est-à-dire la distensibilité passive) dans la seconde partie du remplissage diastolique. Ainsi, le volume d'éjection systolique (VES) correspond à la distance entre les points VTD et VTS. La fraction d'éjection est exprimée comme suit : $FE = VES/VTD$.

Ensuite, lors de la variation de la postcharge, on observe une relation entre le VTS et la PTS : plus la PTS augmente, plus le VTS augmente. Au fur et à mesure des cycles cardiaques, les VTS obtenus selon les différentes PTS se répartissent sur la droite d'élastance télésystolique, qui coupe l'axe des volumes à distance de l'origine en un point appelé V_d .

2.3.4. Fonction coronaire isolée

La dysfonction endothéliale est décrite dans l'insuffisance cardiaque, mais également dans le syndrome métabolique. L'étude de la fonction coronaire isolée par artériographie permet d'évaluer la contraction ou la relaxation des vaisseaux soumis à différents neurotransmetteurs.

La fonction endothéliale a été évaluée dans une artère coronaire isolée prélevée sur un cœur placé dans un tampon Krebs froid et oxygéné. Un segment de 1.5-2 mm de l'artère coronaire interseptale (diamètre interne $<120\mu\text{m}$) a été monté sur un myographe (DMT, Aarhus, Danemark). Après normalisation par équilibrage des pressions intra- et extra

artérielles, la réponse à l'acétylcholine (10^{-9} à 3.10^{-5} mol/L) et la relaxation indépendante de l'endothélium au nitroprussiate de sodium (SNP (10^{-9} à 3.10^{-5} mol/L)) ont été obtenues dans des segments artériels pré-contractés avec de la sérotonine (10^{-5} mol/L). Dans certaines expériences, la réponse à l'acétylcholine a été évaluée après 35 min d'incubation avec l'inhibiteur de la NO synthase L-NG-nitro-arginine (L-NNA, 10^{-4} mol/L) ou avec inhibiteur de la nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphatase (NAPDH)-oxydase (apocynine, 10^{-4} mol/L).

2.3.5. IRM

2.3.5.1. Matériel et anesthésie



Figure 22. IRM Brucker Biopsec 4.7 T/30 (Brucker, Allemagne) utilisée pour le petit animal

L'IRM est constituée de plusieurs parties : le tunnel de l'aimant dans lequel est introduit l'animal, l'aimant supraconducteur qui produit le champ magnétique principal, qui est constant et permanent, trois bobines de gradient de champ magnétique qui sont placées autour du tunnel de l'aimant. Chaque bobine crée des variations d'intensité du champ magnétique grâce au passage d'un courant électrique selon un axe qui lui est propre : la bobine X selon l'axe droite-gauche, la bobine Y selon l'axe avant-arrière et la bobine Z selon l'axe haut-bas. Également, l'IRM est composée de correcteurs de champ magnétique dont le rôle est de compenser les défauts d'inhomogénéité du champ magnétique principal, des antennes capables de produire ou de capter le signal de radiofréquence.

Le principe de l'IRM repose sur le phénomène de résonance magnétique nucléaire, portant sur le couplage entre le moment magnétique du noyau des atomes et le champ magnétique externe. En effet certains noyaux et particulièrement l'hydrogène, possèdent un moment magnétique de spin. Soumis à un champ magnétique, les noyaux d'hydrogène présent dans le sang se distribuent en 2 populations tournant autour du champ magnétique principal B_0 avec un sens (précession) parallèle ou antiparallèle. L'obtention d'une image est permise par une modification du champ magnétique par induction d'une onde de radiofréquence B_1 . Les noyaux d'hydrogène reviennent à leur position initiale après l'arrêt de l'onde B_1 en émettant une onde de radiofréquence captée par l'antenne, traduisant ainsi le mouvement du sang dans le tissu. Les protons ayant des comportements magnétiques différents en fonction du tissu, ces différences génèrent des images. Une nouvelle acquisition est faite en marquant directement les atomes d'hydrogène des molécules d'eau de la zone d'acquisition, ce qui permet la discrimination du bruit de fond lié aux spins statiques. La différence entre ces deux acquisitions met en évidence le flux de sang dans les tissus, et par

conséquent la perfusion myocardique. Les acquisitions sont synchronisées au cycle cardiaque grâce à un système de monitoring (SA Instruments Inc., New-York, Etats-Unis).

La réserve coronaire est ensuite définie comme la différence entre la perfusion maximale et la perfusion basale du VG, la perfusion maximale étant obtenue après injection de Dipyridamole (inhibiteur du transport des nucléosides et inhibiteur de la phosphodiesterase 3, 2.5µg/kg, IP) entraînant une vasodilatation sélective des artères coronaires sans baisse de la pression artérielle systémique à la concentration utilisée pour la mesure.

Les IRM ont été effectuées dans ce projet de recherche pour caractériser la perfusion myocardique et en déduire la réserve coronaire, qui est impactée dans un contexte d'insuffisance cardiaque.

Les IRM sont réalisées avec une IRM Brucker Biospec 4.7 T/30 (Brucker™, Allemagne) (Figure 22). Les souris sont anesthésiées par IP d'hydrate de chloral (320 mg/kg, Sigma-Aldrich, France).

2.3.6. Test à l'effort sur tapis de course

Le test d'effort a été réalisé au Service Commun d'Analyse Comportementale (SCAC) de l'Université de Rouen Normandie, en utilisant un tapis de course avec une pente à 5%. Le test d'effort est classiquement utilisé chez l'Homme en cardiologie où il est couplé à un électrocardiogramme. L'objectif est d'augmenter le travail et la fréquence cardiaques, et par conséquent la consommation en oxygène pour révéler une ischémie visible sur l'électrocardiogramme. De plus, il est classiquement décrit que la capacité à fournir un effort prolongé est diminuée dans un contexte d'insuffisance cardiaque. C'est pourquoi nous avons réalisé des tests à l'effort sur tapis de course dans nos deux modèles. Le test de l'étude 2 vise à évaluer la fonction cardiaque à travers un test d'endurance, puis un test de stress, plus court et avec une augmentation rapide de la vitesse de course. Le test d'endurance a été ensuite adapté lors de l'étude 1 en augmentant la vitesse constante de manière à raccourcir la durée du test pour les animaux.

Etude 1 :

Les souris ont été familiarisées avec l'instrument pendant 3 jours (jour 1 : 10 min à 12 m/min, jour 2 : 10 min à 9 m/min puis 10 min à 12 m/min, jour 3 : augmentation de 0 à 10

m/min puis augmentation graduelle toutes les 2 min jusqu'à atteindre 25 m/min). Le test à l'effort a été réalisé le 4^{ème} jour (10 min) 12 m/min puis augmentation de la vitesse de 1.2 m/min jusqu'à une vitesse maximale de 32m/min). Le choc délivré à la souris si elle tombe sur la grille est réglé comme suit : fréquence : 3 Hz, intensité : 4 mA). Le nombre de chocs cumulés apparaît par intervalle d'une minute lors du test. Le critère d'exclusion retenu est un nombre de chocs > 20 chocs/min.

Etude 2 :

Les souris ont été familiarisées avec le tapis de course pendant 2 jours consécutifs jusqu'à ce qu'elles atteignent une vitesse maximale de 15 m/min pendant 10 min. Elles ont ensuite réalisé un test d'endurance, avec une augmentation de la vitesse toutes les 30sec de 0 à 2.5 min jusqu'à obtenir une vitesse de 25 m/min, vitesse qui est ensuite maintenue pendant 57 min. Un test de stress a été également réalisée avec une augmentation de la vitesse de 2 m/min toutes les 2 min, avec une vitesse initiale de 13 m/min et une vitesse maximale de 35 m/min).

2.3.7. Test de stress

Lors de ce test de stress, les souris sont placées dans un « *open field* » équipé d'une roue. Cette méthode permet d'évaluer différents aspects comportementaux chez la souris, tels que le retard moteur, la réponse à la nouveauté, l'exploration mais également les réponses au stress ou l'anxiété. Si le lien entre le stress et l'obésité a été décrit chez l'Homme, il a également été suggéré chez la souris. En effet, après 8 semaines de régime gras, Li *et al.* ont observé des comportements d'anxiété et de dépression chez leurs animaux ²⁸³. Nous avons souhaité évaluer ceci dans notre modèle de postménopause.

Le métabolisme énergétique a été évalué en utilisant un système de calorimétrie indirecte combiné à une roue pour mesurer le VO₂, VCO₂, dépense énergétique et activité locomotrice. Les souris ont été acclimatées 8h avant le test dans des cages individuelles équipées d'une roue (PhenoMaster, TSE Systems GmbH, Bad Homburg, Germany), avec un accès libre à l'eau et la nourriture.

Les volumes d'O₂ et CO₂ ont été mesurés toutes les 10 min pour un total de 2 périodes consécutives de 24h pour déterminer le VO₂, VCO₂ et la dépense énergétique calculée comme suit :

$$\text{Dépense énergétique} = \text{VO}_2 \times \left(3.815 + \left(1.232 \times \frac{\text{VCO}_2}{\text{VO}_2} \right) \right) \times 4.1868$$

L'activité locomotrice horizontale et verticale a également été évaluée par un système de faisceau infrarouge multidimensionnel.

2.3.6. Histologie cardiaque

Les cœurs ont été prélevés et le VG, le VD et les oreillettes gauche et droite ont été disséqués et pesés. Le VG, placé dans un cryotube, est ensuite temporairement stocké dans de l'azote liquide le temps des expérimentations puis conservé à -80°C.

2.3.6.1. Quantification du collagène par coloration au Rouge Sirius

L'augmentation de la fibrose interstitielle survient dans un contexte d'insuffisance cardiaque²⁸⁴. De plus, l'activation du RM a un effet pro-fibrotique. C'est pourquoi nous avons évalué la fibrose cardiaque dans nos modèles sur des coupes de VG, lieu majeur du remodelage.

Etude 1 :

Des coupes de cœur de 5µm sont réalisés au cryostat, puis colorées au rouge Sirius pour permettre la détection des fibres de collagène. Le rouge Sirius est un colorant acide hydrophile qui permet une coloration des fibres de collagène. Le principe est basé sur les liaisons fortes entre les groupements acides sulfoniques présents dans le colorant et les groupements basiques des fibres de collagène. Cette technique permet de permettre en évidence principalement les fibres de collagène de type I, mais également celles de type III. L'observation du collagène a été faite au microscope photonique, au grossissement x20, à une lumière d'environ 2.8, un temps d'exposition de 44 ms, avec un réglage automatique des couleurs, avec entre 6 et 9 photos par région du ventricule gauche. La quantification est ensuite réalisée sur le logiciel Image Pro.

2.3.6.2. Quantification des fibres de collagène I et III

Etude 2 :

Lors de cette étude, nous avons souhaité obtenir une définition plus fine du collagène entre ciblant les fibres de collagène I et III, qui sont simultanément marquées par le Rouge Sirius.

La densité des fibres de collagène de type I et III a été mesurée à partir de coupe de VG de 6µm après un blocage d'1 heure par la BSA (*Bovin Serum Albumin*) puis une incubation avec les anticorps primaires anti-collagène I (Collagen-I Abcam ab34710, rabbit, 1/1000) et anti-collagène III (Collagen III α 1 NovusBio NPB126547, goat, 1/500). Les coupes ont ensuite été rincées 3x5 min avec du PBS 1x puis incubées 30 min avec les anticorps secondaires (Donkey anti-rabbit couplé au FITC (fluorescein isothiocyanate), Jackson Immunoresearch 711-095-152, à une dilution de 1/400 et Donkey anti-goat Dylight-550, Interchil A50-201D3, 1/400). L'analyse d'image a été réalisée en utilisant le logiciel Image J et la surface des fibres de collagène présente est exprimée sous forme de pourcentage.

2.3.6.3. Nombre de cardiomyocytes et densité capillaire

Comme évoqué précédemment, le nombre de cardiomyocytes ainsi que la densité capillaire sont affectés en contexte d'insuffisance cardiaque. Afin de caractériser plus finement l'insuffisance cardiaque observée dans nos modèles, nous avons marqué des coupes de VG pour visualiser les membranes et les noyaux des cardiomyocytes ainsi que les parois vasculaires.

Le nombre de cardiomyocytes, la section transversale moyenne (MCSA : *mean cross-sectional area*) ainsi que la densité capillaire sont obtenus à partir des coupes de VG après un bain de 10 min à l'acétone et une réhydratation dans un bain de PBS (*phosphate-buffered saline*) pendant 10 min, suivi d'un blocage à la BSA 3% pendant 10 min. Les coupes ont ensuite été incubées avec l'anticorps primaire rat anti-mouse CD31 (BD 553371, 1/100) pendant 1h. Le CD31 (*platelet endothelial cell adhesion molecule-1*, PECAM-1) est exprimé de façon ubiquitaire dans le compartiment vasculaire et est localisé principalement aux jonctions entre les cellules adjacentes. Les coupes sont ensuite rincées 3x5min avec du PBS-2X et incubées pendant 30 min dans l'obscurité avec l'anticorps secondaire (donkey anti-rat couplé à Cy3, Jackson-Immunoresearch 712-166-153, 1/400). Les sections sont ensuite rincées 3x5min avec du PBS 1X et incubées avec du FITC-WGA (*Fluorescein Isothiocyanate - Wheat Germ Agglutinin*) (1/100) pendant 30 min. Le WGA permet la coloration de la matrice extracellulaire et les membranes des cardiomyocytes et est couplé au fluorochrome vert FITC. Les coupes sont rincées deux fois au PBS 1X (2x5 min) puis marquées par la coloration de Hoescht (1/10

000, 2 min) permettant le marquage des noyaux. Les coupes ont été rincées 3x5 min avec du PBS 1X, puis avec de l'H₂O and montées sur les lames Vectashield (Abcys, cat : H1000).

Les lames ont été observées sur microscope à fluorescence (Imager-Z1, ZEISS) au grossissement x 40. L'analyse d'image a été réalisée en utilisant le logiciel Image J. Par champ, chaque cardiomyocyte et chaque vaisseau est compté, et la surface des cardiomyocytes est marquée point par point, puis calculée. La densité capillaire est exprimée comme le rapport du nombre de vaisseaux sur le nombre de cardiomyocytes par champ.

2.3.6.4. Inflammation cardiaque : mesure des macrophages M1 et non-M1

L'insuffisance cardiaque est associée avec une infiltration macrophagique dans le cœur. De plus, le rôle du RM dans les macrophages semble impliqué dans la mise en place de la fibrose cardiaque. C'est pourquoi nous avons souhaité mesurer les macrophages M1 et non-M1.

Les sections ont été lavées, rincées dans de l'eau ultrapure, et montées dans du Vectashield. Pour la détection des macrophages totaux CD68⁺ et des sous-populations de macrophages CD206⁺ (type non-M1) et iNOS⁺ (type M1), les sections ont été incubées pendant 1 heure à température ambiante (TA) avec les anticorps primaires rabbit anti-mouse CD206 (Abcam, Ab64693) à la dilution x1/2500 et rat anti-mouse iNOS (Biolegend, 696802) à la dilution x1/500, dans le tampon BSA-PBS à 1% avec 0,3% de saponine. Les sections ont été lavées 3x5 min dans du PBS et incubées 30 min dans l'obscurité à TA avec des anticorps secondaires donkey antirabbit-Cy3 (Jackson ImmunoResearch, 711-605-152) à la dilution x1/400 et donkey antirat AF488 (Jackson ImmunoResearch, 712-546-153) à la dilution x1/400 dans le tampon BSA-PBS à 1% avec saponine. Les coupes ont été lavées 3x5 min dans du PBS. La biotine et l'avidine endogènes ont été bloquées (par exemple, kit de blocage de la biotine Dako, 10 min chacune). Les sections ont ensuite été incubées pendant 1h à TA avec des anticorps primaires biotinylés rat anti-mouse CD68 (Miltenyi, 130-102-025) à la dilution x1/200 dans du BSA-PBS à 1% avec saponine. Les sections ont été lavées 3x5 min dans du PBS et incubées 30 min dans l'obscurité à TA avec des réactifs secondaires SA-Cy5 (A647) (Interchim, FP-CA5640, FP-YE5081) à la dilution x1/1500 dans du tampon saponine BSA-PBS à 1%. Les sections ont été lavées 3x5 min dans du PBS et montées dans du Vectashield. Les analyses d'images ont été réalisées à l'aide d'ImageJ.

La mitochondrie est le centre énergétique cellulaire, mais également le foyer principal du stress oxydant ²⁸⁵. Impliqué dans l'insuffisance cardiaque, et potentiellement soutenu par l'activation du RM, ce stress oxydant a été caractérisé dans des mitochondries, mais également dans le VG entier.

2.3.7. Mesure du stress oxydatif des mitochondries du ventricule gauche

2.3.7.1. Isolation des mitochondries, synthèse d'ATP et production de ROS

Les mitochondries cardiaques subsarcolemmales (SSM) et interfibrillaires (IFM) ont été isolées selon le protocole établi par Palmer *et al.* afin d'évaluer la synthèse d'ATP et la production d'espèce réactives de l'oxygène (*Reactive Oxygen Species*, ROS) mitochondriales ²⁸⁶. Les échantillons de VG fraîchement prélevés ont été homogénéisés dans du tampon A (220 mM mannitol, 70 mM sucrose, 5 mM Mops, 2 mM EGTA (*ethylene glycol-bis(aminoethyl ether) tetraacetic acid*, 0.2% VSA, pH 7.4, 4°C) et centrifugés (500G, 10 min, 4°C). Les mitochondries subsarcolemmales (SSm) ont été obtenues en pipettant les supernageants et ont les centrifugeant (3000G, 10 min, 4°C). Les culots obtenus lors de l'isolation des SSM ont été resuspendus dans du tampon B (100 mM KCl, 52 mM Mops, 2 mM EGTA, 0.2% BSA, pH 7.4, 4°C) contenant du Nagarse (5 mg/g de tissu). Les culots ont ensuite été resuspendus dans du tampon B et lavés 2 fois.

Les mitochondries interfibrillaires (IFM) ont été obtenues en poolant les surnageants restants et en les centrifugeant (3000G, 10 min, 4°C). Les culots de SSM et d'IFM ont été resuspendus dans les tampons A et B respectivement (sans BSA et avec 0.5 EGTA). Ensuite, les mitochondries isolées ont été incubées dans du tampon de respiration (10 min, 25°C) avec 10 mM glutamate et 4mM malate sous agitation continue pour éliminer les résidus ADP (adénosine diphosphate) des échantillons. Ensuite, la production d'ATP a été commencée en ajoutant 2 mM ADP et les mitochondries isolées ont été échantillonnées toutes les 20s jusqu'à 180s pour extraire l'ATP avec 500µL d'acide perchlorique (1N). Les échantillons ont ensuite été centrifugés (10 000G, 5 min) et les surnageants ont été neutralisés par 5M de K₂CO₃. Le taux de production d'ATP dans les SSM et les IFM a été déterminé par un kit HSII de bioluminescence de l'ATP (Roche). Les culots obtenus après la 1^{ère} centrifugation ont été échantillonnés pour le dosage protéique et les résultats ont été exprimés en nmol d'ATP/mg de protéines.

La production de ROS a été évaluée dans les préparations mitochondriales par spectroscopie de Résonance Paramagnétique Electronique (RPE) en utilisant du glutamate (10 mM), du malate (4mM) et de l'ADP (2 mM) ²⁸⁷.

2.3.8. Activité enzymatique mitochondriale

2.3.8.1. Etude 2

Les échantillons de VG ont été homogénéisés dans un tampon de lyse (5mM Tris-HCl, NaCl, 0.9, 4°C) et centrifugés (600G, 10 min, 4°C). L'activité aconitase a été évaluée par spectrophométrie en mesurant la formation de cis-aconitate pour l'isocitrate à 240 nm dans une solution de réaction (50mM Tris-HCl, 30 mM isocitrate, 0.6 mM MnCl₂ (pH 7.4) à 37°C. L'activité fumarase a été évaluée en utilisant 50mM de L-malate, 50 mM de KH₂PO₄, pH 7.4 à 37°C d'après le protocole établi par Bradshaw *et al.* ²⁸⁸.

2.3.9. Evaluation de l'expression génique par RT-qPCR

La RT-qPCR permet de faire une PCR (réaction en chaîne par polymérase) quantitative à partir d'un échantillon d'ARN. En premier lieu, l'ARN est rétrotranscrit par l'enzyme transcriptase inverse (aussi appelée rétrotranscriptase, RT), permettant la synthèse de l'ADN complémentaire. Ce dernier est ensuite utilisé pour réaliser une PCR quantitative, basée sur la réaction en chaîne par polymérase permettant d'évaluer la quantité initiale d'ADN en mesurant le nombre d'amplicons (portion d'ADN définie par un couple d'amorces). La PCR est dite « en temps réel » car elle permet de suivre en continu le processus d'amplification PCR en détectant la fluorescence émise par les produits de PCR nouvellement formés. On peut décomposer la PCR quantitative en trois étapes :

- L'étape de bruit de fond : la quantité de fragment amplifié est insuffisante pour générer un signal fluorescent supérieur au bruit de fond,
- L'étape de phase exponentielle de croissance : la quantité de fragment amplifié induit un signal fluorescent détectable par l'appareil. Le nombre de produits amplifiés double à chaque cycle.
- L'étape de plateau : l'amplification n'est plus exponentielle car certains réactifs (particulièrement la sonde) deviennent limitants.

Les échantillons d'apex du VG ont été décongelés, placés dans des tubes à billes avec 1mL de trizol (invitrogen) et homogénéisés avec un Precellys 24. Les broyats obtenus ont

ensuite été incubés 5 min à TA, puis 0.1mL de chloroforme a été ajouté, suivi d'une nouvelle incubation de 2 min à TA.

Les surnageants sont ensuite prélevés après centrifugation (12000G, 15 min, 4°C) et incubés pendant 10 min avec de l'isopropanol (dont le volume est équivalent à celui du surnageant). Une 2^{ème} centrifugation (12 000G, 20 min, 4°C) permet l'obtention des culots d'ARN, qui ont ensuite été lavés avec 0.5 mL d'éthanol à 75%. Une dernière centrifugation est effectuée (7 500G, 5 min, 4°C), le surnageant est jeté et le culot d'ARN séché à l'air libre (5 à 10 min) avant d'être dissous dans 30 µL d'eau *RNase-free*.

La concentration et la qualité des ARN sont mesurées par spectrophotomètre ND1000 (Nanodrop Technologies Thermo Scientific, Etats-Unis) en déposant 2µL d'échantillon. Ensuite le volume correspondant à 2µg d'ARN est prélevé et les tubes sont complétés jusqu'à 16µL avec de l'eau *RNase-free*. Les échantillons sont ensuite traités pour éliminer l'ADN en utilisant un mix contenant 2µL de DNase I (1U/µL) et 2 µL de tampon DNase 10X pendant 15 min à température ambiante (TA). La DNase I est ensuite inactivée par 2µL d'EDTA (acide éthylène diamine tétra-acétique), suivi d'une incubation des tubes à 65°C pendant 10 min.

Enfin, les ARN sont à nouveau dosés par spectrophotométrie et le volume correspondant à 1µg est prélevé et placé dans un microtube. Dans chaque tube, le volume d'ARN est complété avec de l'eau *RNase-free* pour atteindre un volume à 16.75µL et un mix de *reverse transcription* (RT) contenant des dNTP, amorces aléatoires, *RNase out* et du tampon 5X est ajouté. Les échantillons sont ensuite incubés pendant 5min à 65°C. Enfin, 1µL de transcriptase inverse est ajouté (M-MLV Reverse transcriptase, invitrogen) (Tableau 10).

Ensuite, une nouvelle incubation d'une heure à 37°C est réalisée, puis l'enzyme est dénaturée en l'incubant 5 min à 95°C. Les ADN complémentaires ainsi obtenus sont congelés à -20°C.

Les échantillons sont dilués au 1/10^{ème} dans de l'eau extra-pure. Puis 2.5µL d'ADNc (ADN complémentaire, 1/10^{ème}) est mélangé avec 7.5µL d'un mix contenant 1.5µL d'eau ultra pure, 5µL du kit LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche), 0.5µL d'amorces sens et 0.5µL d'amorces anti-sens (10µM) pour chaque gène ciblé.

Les PCR sont effectuées sur un appareil de RT-CT (LightCycler 480 Roche) en plusieurs étapes : dénaturation de l'ADN (95°C, 10 min), amplification, élongation.

Les résultats de RT-qPCR sont calculés par la méthode des $\Delta\Delta^{CT}$. D'abord, la valeur des CT (Cycle Threshold) du gène d'intérêt est comparée au CT du gène de ménage. Ensuite, l'expression relative de ce Δ^{CT} est comparé au Δ^{CT} du gène de ménage. Enfin, l'expression relative de ces Δ^{CT} est comparée à la valeur obtenue pour le groupe contrôle.

Tableau 10. Séquences des amorces utilisées pour la PCR

Nom	Amorce sens	Tm amorce sens	Amorce anti-sens	Tm amorce antisens	Taille amplicon
HPRT1	TTCTCCTCCAGCACCTCGT	60.83	AAGGAGTGTACCCTAGCCT	59.88	120
CTGF	TGGCTTTTATACGCTCCGGG	60.18	GTGCCAGCTTTTTCAGACGG	60.04	167
LCN2	GTTTCTCCTCCCATCCGCTC	60.18	CCATAAAGAGGCCCCCTGAG	59.52	287
PAI-1	GCAGATCTTGGGTGGTCACA	59.96	CCCATCCTGTCCCCCTCTTA	60.03	163
Rgs-2	CTCTAGAGGGCGCGGATTG	60.01	CTCACTCCAGACCCTTCGG	59.75	98
Sgk-1	CACCAGAGGGCACACATACA	59.68	AAAACCTGTTCACGGTGGCG	59.90	292
TGF- β	TTGGTATCGGTCTGCTGCTG	60.11	GGAGGCATAGAGCGAAAGGT	59.53	439
NEPHRIN	TCCTCCAGCTCTCGGGAATC	60.76	TGGTTTGTAGGCACGTGGAC	60.53	74
PODOCIN	TTCACGAGTGGATCGTCTGC	60.11	ACCCATCGGTTGGGATTACG	59.82	421
Ki-67	GCACGGTCAAATTGGGGTTC	60.04	AAGCTGGGGTACAAGGCAAT	59.59	475
KIM 1	ACCACGGGTTTCCTTCAGAC	59.89	AGCACTGGGAATGTGGACTG	59.96	306
COL 1	AGGCTTTGGGATGTGTGAGG	59.96	TTGAAGTGCCTGCGAGTTTG	59.97	242
COL 3a1	GACATTGGCCCTGTTTGCTTT	59.93	TTGCAGATGGGCTAGACTTCAA	59.69	338
COL 4	TCTGCGAAGGTCCTGCAATG	60.64	CTATGCACTGCTGGGGAACA	60.04	361
Fibronectin	GGAAAAGTCCTGAGGTGGGG	59.96	GCATCTCTTTTGTTCGGGGC	59.83	335
F4/80	ATTCGGCTAAAGCTGGCGTA	59.82	GGACTGATGCAGTATGCCCA	59.82	155
TNF- α	AGGCTGTCGCTACATCACTG	59.83	TTTTGTTCCACGGGGTCTT	59.74	231
IL-1 β	TTCAGGGCAGGCATGCTAAC	60.68	TCCACTCAGCTGTTGCTTTCT	59.86	277
IL-6	ACATTGGGCCGTCATCACTT	59.96	GACTGGGGATGTCTGTAGCTC	59.59	481
MCP1	GGACATCACAAGATGGGACAC	58.64	TGGGGCTTTTATCGAGCATGT	60.06	183
RANTES	CAAGGTCAGCCCTCCGATT	60.04	AGCACCCCTGCAGATGATTC	60.11	413
ArGlu1	CTGGACCTGTGGTGTGTTGT	60.11	ACCACCCTTCGGATTTGACA	59.23	264

Nom	Amorce sens	Tm amorce sens	Amorce anti-sens	Tm amorce antisens	Taille amplicon
HPRT1	TTCTCCTCCAGCACCTCGT	60.83	AAGGAGTGTACCCTAGCCT	59.88	120
CTGF	TGGCTTTTATACGCTCCGGG	60.18	GTGCCAGCTTTTTCAGACGG	60.04	167
LCN2	GTTTCTCCTCCCATCCGCTC	60.18	CCATAAAGAGGCCCCCTGAG	59.52	287
PAI-1	GCAGATCTTGGGTGGTCACA	59.96	CCCATCCTGTCCCCCTCTTA	60.03	163
Rgs-2	CTCTAGAGGGCGCGGATTG	60.01	CTCACTCCAGACCCTTCGG	59.75	98
Sgk-1	CACCAGAGGGCACACATACA	59.68	AAAACCTGTTCACGGTGGCG	59.90	292
TGF- β	TTGGTATCGGTCTGCTGCTG	60.11	GGAGGCATAGAGCGAAAGGT	59.53	439
NEPHRIN	TCCTCCAGCTCTCGGGAATC	60.76	TGGTTTGTAGGCACGTGGAC	60.53	74
PODOCIN	TTCACGAGTGGATCGTCTGC	60.11	ACCCATCGGTTGGGATTACG	59.82	421
Ki-67	GCACGGTCAAATTGGGGTTC	60.04	AAGCTGGGGTACAAGGCAAT	59.59	475
KIM 1	ACCACGGGTTTCCTTCAGAC	59.89	AGCACTGGGAATGTGGACTG	59.96	306
COL 1	AGGCTTTGGGATGTGTGAGG	59.96	TTGAAGTGCCTGCGAGTTTG	59.97	242
COL 3a1	GACATTGGCCCTGTTTGCTTT	59.93	TTGCAGATGGGCTAGACTTCAA	59.69	338
COL 4	TCTGCGAAGGTCCTGCAATG	60.64	CTATGCACTGCTGGGGAACA	60.04	361
Fibronectin	GGAAAAGTCCTGAGGTGGGG	59.96	GCATCTCTTTTGTTCGGGGC	59.83	335

F4/80	ATTCGGCTAAAGCTGGCGTA	59.82	GGACTGATGCAGTATGCCCA	59.82	155
TNF- α	AGGCTGTCGCTACATCACTG	59.83	TTTTGTTCCACGGGGGTCTT	59.74	231
IL-1 β	TTCAGGGCAGGCATGCTAAC	60.68	TCCACTCAGCTGTTGCTTTCT	59.86	277
IL-6	ACATTGGGCCGTCACTT	59.96	GACTGGGGATGTCTGTAGCTC	59.59	481
MCP1	GGACATCACAAGATGGGACAC	58.64	TGGGGCTTTTATCGAGCATGT	60.06	183
RANTES	CAAGGTCAGCCCTCCGATTT	60.04	AGCACCCCTGCAGATGATTC	60.11	413
ArGlu1	CTGGACCTGTGGTGTGTTGT	60.11	ACCACCCTTCGGATTTGACA	59.23	264

2.3.10. Evaluation du stress oxydatif ventriculaire gauche par Résonance Paramagnétique Electronique

La RPE caractérise la propriété de certains électrons à absorber, puis réémettre l'énergie d'un rayonnement électromagnétique lorsqu'ils sont placés dans un champ magnétique. Seuls les électrons non appariés, présents dans les espèces chimiques radicalaires ainsi que dans les sels et complexes des métaux de transitions présentent cette propriété. Elle est utilisée afin d'évaluer les espèces réactives de l'oxygène dans différents tissus, et ici dans le VG.

L'électron possède un spin, qui est un moment angulaire de la particule en rotation sur elle-même ainsi qu'un moment magnétique, qui le fait se comporter comme une aiguille aimantée. Les électrons orientent leur moment magnétique parallèlement ou antiparallèlement au champ magnétique qui correspond aux niveaux d'énergie α ou β .

La spectrométrie par RPE permet de mettre en évidence la présence d'électrons non-appariés dans des solides, des liquides ou des gaz et de déterminer leur environnement. On peut connaître le type de noyaux atomiques à proximité de ces électrons non appariés et cela peut permettre de déduire la structure d'une molécule. Cette technique est particulièrement sensible du fait de l'importance du moment magnétique de spin de l'électron.

Pour les mesures, la fréquence de la source d'ondes est constante, et on fait varier le champ extérieur. Lorsque l'écart entre les niveaux α et β devient égal à l'énergie $h\nu$ des photons, ceux-ci sont absorbés par phénomène de résonance. On utilise des micro-ondes de fréquence d'environ 9.4 GHz.

Un spectre de RPE révèle uniquement la présence de centres paramagnétiques (c'est-à-dire possédant un moment magnétique permanent). Il s'observe donc uniquement avec une substance contenant des électrons à spins non couplés (électrons célibataires). On retrouve parmi celles-ci des atomes et molécules à nombre impair d'électrons, des molécules à nombre pair d'électrons dans des états de multiplicité supérieure (triplet), des ions à couches

électroniques internes incomplètes (ions de transition), des radicaux produits par des rayonnements ionisants (CO_2). Si l'on veut obtenir davantage de renseignements sur l'espèce paramagnétique individuelle, celle-ci doit être diluée dans une matrice diamagnétique afin d'éviter les interactions magnétiques avec les radicaux voisins.

Pour interpréter un spectre de RPE, on peut tout d'abord noter la position de la raie. Cette position est définie par la condition de résonance : $h\nu = g \cdot \beta \cdot B_0$, avec

- h : constante de Planck
- β : magnéton de Bohr
- B_0 : valeur du champ magnétique à laquelle il y a résonance, qui dépend de ν
- ν : fréquence des micro-ondes
- g : dépend de la structure électronique de l'espèce paramagnétique et de son environnement local.

Le signal obtenu est proportionnel au nombre d'électrons paramagnétiques présents.

Afin de mesurer le taux de radicaux libres de l'oxygène présent dans les tissus biologiques, on utilise une sonde capable de produire une réaction rapide avec les espèces radicalaires impliquées dans le stress oxydatif. Elle est appelée Spin Probe et peut traverser les membranes et se répandre dans l'environnement biologique sans qu'il y ait besoin d'altérer ou de détruire la compartimentation cellulaire. On utilise du CMH (spin probe) mis en excès.

Le signal du CM° observé est proportionnel à la quantité de CMH oxydé et radicalisé, donc à la quantité de radicaux libres.

2.3.10.1. Collecte et préparation des échantillons

Les cœurs sont prélevés, découpés en 3 parties et congelés à -80°C . Une partie du ventricule gauche est broyée dans 4 mL de tampon Krebs-HEPES (pH : 7.4), puis incubée à 37°C pendant 60 min dans du tampon Krebs-HEPES contenant un chélateur de cuivre (DETC) et de fer (déféroxamine, DFR) en excès, 30 μL d'homogénat de tissu et 10 μL de CMH (50mM). Le tampon Krebs-HEPES est dégazé à l'azote de manière à diminuer les taux d'oxygène et ainsi limiter l'oxydation du spin probe. Enfin, des contrôles sont réalisés en absence d'homogénat de tissu.

A l'issue de l'incubation, les homogénats sont récupérés dans des seringues et immédiatement congelés dans l'azote liquide, puis stockés à -80°C, jusqu'à la mesure.

2.3.10.2. Mesure par RPE

Les carottes d'homogénat obtenues sont placées dans le champ magnétique du spectromètre RPE tout en étant maintenues à la température de l'azote liquide. La mesure permet l'obtention d'un spectre. La différence entre la valeur maximale et la valeur minimale permet la quantification de l'échantillon et sera rapportée à la quantité de protéines dans l'échantillon.

2.3.10.3. Quantification protéique et des espèces réactives de l'oxygène

La quantification des protéines dans les échantillons est réalisée par dosage de Bradford. Une gamme de BSA est réalisée aux concentrations suivantes ($\mu\text{g/mL}$) : 0, 2.5, 3.75, 5.75, 10, 15, 20, 30, 40. Les dilutions sont réalisées dans du PBS 1x. Les broyats de ventricule gauche sont dilués au 1/40^{ème}. Le blanc est ensuite soustrait à la valeur obtenue lors de la mesure par RPE, puis cette valeur est divisée par la quantité de protéines précédemment calculée.

2.3.11. Identification des protéines cardiaque par Western Blot

Le Western Blotting (transfert de protéines ou immunoblotting) est un test rapide et sensible pour la détection et la caractérisation des protéines. Les protéines sont d'abord séparées en fonction de leur poids moléculaire spécifique, généralement par SDS-PAGE (électrophorèse sur gel de polyacrylamide au dodécyl-sulfate de sodium). Les protéines sont ensuite transférées ou électrotransférées sur une membrane de nitrocellulose. La liaison non spécifique des protéines est bloquée en utilisant une protéine générique non ciblée. Pour la détection de la protéine cible, la membrane est successivement incubée avec un anticorps primaire, un anticorps secondaire avec un conjugué (par exemple, la streptavidine), puis un kit de détection.

2.3.11.1. Extraction protéique

Tout d'abord, un inhibiteur de protéase (cOmplet tablet, Roche) et un inhibiteur de phosphatase (cOmplete tablet, Roche) sont ajoutés dans 10 mL de tampon de lyse Rippa (Lysis M Reagent, Roche). Les échantillons sont dilués au 1/1000 dans des tubes avec billes, puis

agités mécaniquement par Prescellys (Set : 6.5, Temps : 60 sec). Les échantillons sont directement placés dans la glace puis centrifugés. Ces étapes sont répétées jusqu'à lyse complète des échantillons. Ensuite, une 2^{ème} étape de lyse est effectuée avec du SDS 1% en agitation sur roue tournante à 4°C pendant 1h.

La concentration protéique des échantillons homogénéisés est ensuite évaluée par dosage de Bradford en utilisant le kit Pierce BCA Protein Assay Test (ThermoFisher). Après lecture, les échantillons sont tous dilués à la concentration de 5 µg/%µL, aliquotés puis stockés à -80°C.

2.3.11.2. Migration sur gel

Le bleu de charge est préparé (900µL de 4X Laemmli Sample Buffer (BioRAD) + 100µL de β-mercapto-éthanol). On ajoute ensuite 15µL d'échantillon + 5µL de bleu de charge. Les tubes sont ensuite centrifugés 30 sec à 1509 g puis vortexés. Ils sont ensuite incubés à une température et un temps dépendant de l'anticorps primaire utilisé. Les échantillons sont ensuite à nouveau centrifugés, puis 7.5µL d'échantillons sont déposés dans un gel 4-10%, 26 puits, Criterion, et 5µL de marqueur de taille (Precision Plus Protein Dual Color Standard, BioRAD). La migration est effectuée dans du tampon de migration Tris Glycine SDS 1X et a lieu à 110 V pendant 50min à 1h.

2.3.11.3. Transfert sur membrane

Le tampon de transfert utilisé est le Trans-Blot Turbo Transfer Buffer (BioRAD). Les membranes de papier de nitrocellulose et le papier Wattman sont imbibées et placés à 4°C en amont du transfert. Le gel est extrait et placé dans un bac d'eau milliQ. Le gel est ensuite activé par rayonnement ultraviolet (UV) pour permettre ensuite la quantification des protéines totales en *stain free*. On place ensuite dans la cassette de transfert 1 papier Wattman, 1 membrane de nitrocellulose, le gel et 1 papier Wattman, puis le transfert est effectué en choisissant le programme *mix molecule* (7 min). La membrane est ensuite rincée 3x au TBS-T (Tris-buffered saline-Tween) 1%, puis incubée pendant 1 heure sous agitation douce à TA avec du TBS-T/BSA 5% ou du TBS-T/Lait 5% si on cherche à détecter une protéine phosphorylée. Les membranes sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire, diluée selon les recommandations du fabricant en over night à 4°C sous agitation douce. Les membranes sont

ensuite rincées 3x au TBS-T 1% et 1x au TBS, puis incubées avec l'anticorps secondaire pendant 1h à TA, à des concentrations dépendantes de l'anticorps utilisé.

2.3.11.4. Révélation et quantification

La lecture des membranes est ensuite effectuée, et le traitement des images et la quantification sont réalisés sur Image Lab. Les protéines totales sont évaluées par *stain free*. Ensuite, la quantification de la bande protéique effectuée sur Image lab est divisée par la quantité de protéines totales. Enfin, les contrôles sont normalisés à 1.

2.4. Paramètres rénaux

2.4.1. Mesure de la protéinurie

L'apparition de protéinurie, marqueur d'une dysfonction rénale et conséquence d'une glomérulopathie, peut être favorisée par l'obésité. Elle peut être supportée par des comorbidités fréquemment associées au syndrome métabolique telles que l'hypertension et le diabète de type II. Dans ce contexte, nous avons mesuré les taux d'albumine et de créatinine urinaires dans notre modèle d'insuffisance cardiaque induite par l'obésité.

Les souris ont été placées en cage métabolique pendant 12h à 16 puis 24 semaines afin de collecter l'urine. Le volume d'urine est ensuite mesuré, puis les taux d'albumine et la créatinine sont mesurés en utilisant l'iDexx Catalyst Dx (Paris, France). Le fonctionnement des plaquettes est similaire à celui précédemment décrit. Les taux d'albumine et de créatinine obtenus sont ensuite rationalisés en fonction du volume d'urine et normalisés à 24h.

2.4.2. Evaluation de l'expression génique par RT q-PCR

L'évaluation de l'expression génique par RT q-PCR a été réalisée suivant le même protocole que décrit pour le ventricule gauche en section 2.3.9.

2.6. Analyses statistiques

Les données sont exprimées en tant que moyenne \pm erreur type à la moyenne (ETM, calculé comme : $ETM = \text{écart-type} / \text{racine}(\text{nombre})$) et analysées avec GraphPad Prism 7.04. Dans toutes les expériences, n représente le nombre de souris ou le nombre de mesures. Le test de Shapiro-Wilk a été utilisé pour vérifier la distribution normale et les variances ont été estimées. Avant le traitement à la finérénone et pour la comparaison des mêmes paramètres après le traitement, le test t de Student a été utilisé. Après le traitement à la finérénone, un

1-way ANOVA suivi du post-test de Tukey a été utilisé. Les différences entre les groupes expérimentaux ont été considérées comme statistiquement significatives à partir des valeurs de $P < 0,05$. Les données relatives à l'activité spontanée et à la dilatation médiée par le flux ont été évaluées par une analyse multivariée utilisant la modélisation linéaire généralisée avec le logiciel R 3.1.4 (The R Foundation for Statistical Computing, <http://www.r-project.org>). Les différences entre les groupes ont été évaluées à l'aide de tests de rapport de vraisemblance et du test de Wald. Les distributions des résidus ont été vérifiées comme suit :

- 1) Absence de valeurs aberrantes, les valeurs minimales et maximales du résidu normalisé étant comprises entre $[-3, +3]$,
- 2) Distribution normale avec une moyenne = 0 et une variance constante,
- 3) Graphiquement au moyen de Qplot.

La multi-colinéarité a été testée en utilisant les statistiques de colinéarité (facteur de variance).

Chapitre 3. Résultats

3.1. Etude 1

Il a été montré que l'incidence d'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée augmente chez les individus obèses ou atteints de syndrome métabolique. A ce jour, aucun traitement n'apporte de solution satisfaisante face à cette pathologie complexe, présentant de nombreuses comorbidités telles que l'hypertension ou le diabète de type II. C'est pourquoi l'objectif de cette étude est d'évaluer l'effet de la finérénone sur un modèle murin de dysfonction diastolique associée à l'obésité.

FINERENONE IMPROVES THE CARDIAC BENEFITS OF A RETURN TO STANDARD DIET IN THE MOUSE MODEL OF HIGH-FAT DIET-INDUCED OBESITY

INTRODUCTION

Patients with type-2 diabetes or obesity display a higher prevalence of cardiovascular morbidity and mortality^{261,289,290}. This augmentation is supported by left ventricular (LV) dysfunction and endothelium dysfunction, together with cardiovascular remodeling. Inappropriate mineralocorticoid receptor (MR) activation has been shown to promote cardiovascular remodeling in experimental models^{164,277,291}. Clinical trials such as RALES, EPHESUS and EMPHASIS-HF using MR antagonists showed the benefits of spironolactone and eplerenone in reducing the cardiovascular mortality among patients with heart failure with reduced ejection fraction^{142,252}. Moreover, a retrospective analysis of the TOPCAT clinical trial showed that spironolactone was beneficial in American patients with heart failure with preserved ejection fraction. However, the secondary effects associated with the use of steroidal MR antagonists and mainly hyperkalemia restrained their use¹³⁰.

Finerenone, a novel selective non-steroidal MR antagonist has been developed to limit the occurrence of these secondary effects and has shown benefits in experimental models. The aim of this study is to evaluate the effect of finerenone in a mouse model of diastolic dysfunction caused by obesity, followed by a normalization of the diet associated with the treatment.

METHODS

Animals

Experiments conformed to the 2010-63 European Union Directive, the national Institutional Ethics Committee and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the US National Institutes of Health (CENOMEXA C2EA-54). Wild-type mice on B6D2 background (Janvier, Le Genest-Saint-Isle, France) were housed five per cage on light–dark cycle 12–12 h at room temperature $22 \pm 2^\circ\text{C}$, with access to food and water ad libitum. Mice 9-week-old were separated in 2 groups and fed a standard diet (CTL, A3 SAFE, France) or a high-fat diet (HFD; 60%). The weight of the mice was monitored weekly, and the cardiac function was monitored by ultrasound at 3,6,9,12,16 weeks after the start of HFD. After 16 weeks, the mice in the HFD groups were separated into 3 groups:

- HFD mice staying on the same diet as previously (H)
- HFD-Stop mice, put back on standard diet (HS)
- HFD-Stop+Fine mice, put back on standard diet treated with finerenone (1mg/kg/d) (HSF)

The metabolism and cardiac function of the mice were monitored for 8 weeks to study the beneficial effect of the diet standardization, associated or not with the finerenone treatment.

Statistics

Data are expressed as mean \pm standard error of the mean and analyzed with GraphPad Prism 7.04. Shapiro-Wilk test was used to verify normal distribution. At 16-week, unpaired Student's t-test test was used to compare CTL and HFD. After 24-week, one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test was used. The differences between experimental groups were considered statistically significant from values of $P < 0.05$.

RESULTS

16 weeks of HFD induced heart failure with preserved ejection fraction

Male mice were given a high fat diet (HFD; 60% calories from fat) *ad libitum* for 16 weeks starting at the age of 9 weeks, resulting in constant weight gain (fig. 1A) with an increase in body fat and a reduction in lean body mass (Table 1). Overweight mice showed fasting increased glycaemia (Table 1) associated with decreased insulin sensitivity (fig.1B), as well as increased plasma total cholesterol (CTL 2.14 ± 0.04 , HFD 3.80 ± 0.29 mmol/L, $n=4/\text{group}$, $*p<0.05$). The cardiac function was determined by ultrasound between 6 and 16 weeks of HFD. The LV fractional shortening (FS; an index of the ejection fraction, calculated as the ratio of the end-diastolic over the end-systolic diameters), was not modified during this period (Table 1). In contrast, from 9 weeks of HFD, a reduction in the LV stroke volume was measured (Table 1).

Table 1. Global metabolism and cardiovascular function after 16 weeks of HFD

	C	H
<i>Metabolic parameters</i>		
Body weight, g	35.5±0.5	49.1±0.4***
Fat mass, %	19.3±0.9	35.5±0.3***
Lean mass, %	70.3±0.8	57.6±0.3***
Water, %	60.7±1.2	50.6±0.4***
Fasting glycemia, g/L	6.75±0.27	9.01±0.79**
<i>Echocardiography</i>		
LVEDD, mm	3,8±0,1	3,6±0,1
LVESD, mm	2,3±0,1	2,1±0,1*
FS, %	39±3	43±1
SV, mL/beat	0,083±0,003	0,075±0,003*
CO, mL/min	101,5±5,2	92,1±3,9
E/A	1.48±0.13	1.51±0.10
<i>Invasive Hemodynamic</i>		
SBP, mmHg	98.6±2.1	104.8±5.9
DBP, mmHg	58.5±2.4	66.5±5.5
dP/dt max	6972±863	7741±895
dP/dt min	6454±700	6211±688
Tau ½	4.3±0.2	4.9±0.3
Tau-e	5.8±0.4	6.6±0.4

The body composition and body weight were measured 16 weeks after the start of the protocol by echo MRI (body weight, fat mass, lean mass, free water); n=28, 50. A blood sample was collected from the tail vein in fasted mice 16 hours before testing, to measure fasting glycemia; n=10, 10. The cardiac function was measured by echocardiography, to get left ventricle end-diastolic diameter (LVEDD), left ventricle end-systolic diameter (LVESD), these measurements were used to calculate fractional shortening (FS). Doppler measurements were used to calculate the stroke volume (SV) and Cardiac output (CO); n=9, 4. Mice were catheterized in the left ventricle to measure cardiac hemodynamics such

as systolic blood pressure (SBP), diastolic blood pressure (DBP), dP/dT min, dP/dT max as well as constant of relaxation $\tau_{1/2}$ and τ_e . Data are shown as mean \pm SEM; * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001 vs CTL

Despite a preserved EF, the reduction in stroke volume suggested an impaired heart function. Providing greater precision, LV catheterization revealed diastolic dysfunction in overweight mice. Indeed, while there was no difference in peripheral arterial pressure (Table 1) nor in the LV end-systolic pressure (LVESP) (fig. 1C), the overweight induced an increase in LV end-diastolic pressure (LVEDP) i.e., LV filling pressure (fig. 1D). In addition, no change in LV systolic contractility (LV end-systolic pressure-volume relation, LVESPVR) was observed in HFD compared to CTL mice (fig. 1E), but the LV diastolic compliance (LV end-diastolic pressure-volume relation, LVEDPVR) was altered (fig. 1F).

MRI measurements of the LV basal perfusion (fig. 1G) and of the LV perfusion after intraperitoneal administration in the same mice of ATL313, an agonist of the A_{2a} adenosinergic receptor that induces vasodilatation, showed no difference between HFD and CTL mice, nor the calculation of the coronary reserve as the delta between the perfusion under ATL313 and the basal perfusion (fig. 1H). However, the exercise capacity during an exercise test on treadmill was reduced in HFD compared to CTL mice (fig. 1I).

In summary, 16 weeks of HFD induced LV diastolic dysfunction with preserved ejection fraction. Thereafter, in comparison with mice kept on a HFD, we investigated the improvement in heart function in mice returned on a standard diet (HFD-Stop), and the possibility of additional benefits by an eight-week concomitant treatment with finerenone (HFD-Stop+Fine, 1 mg/kg/day).

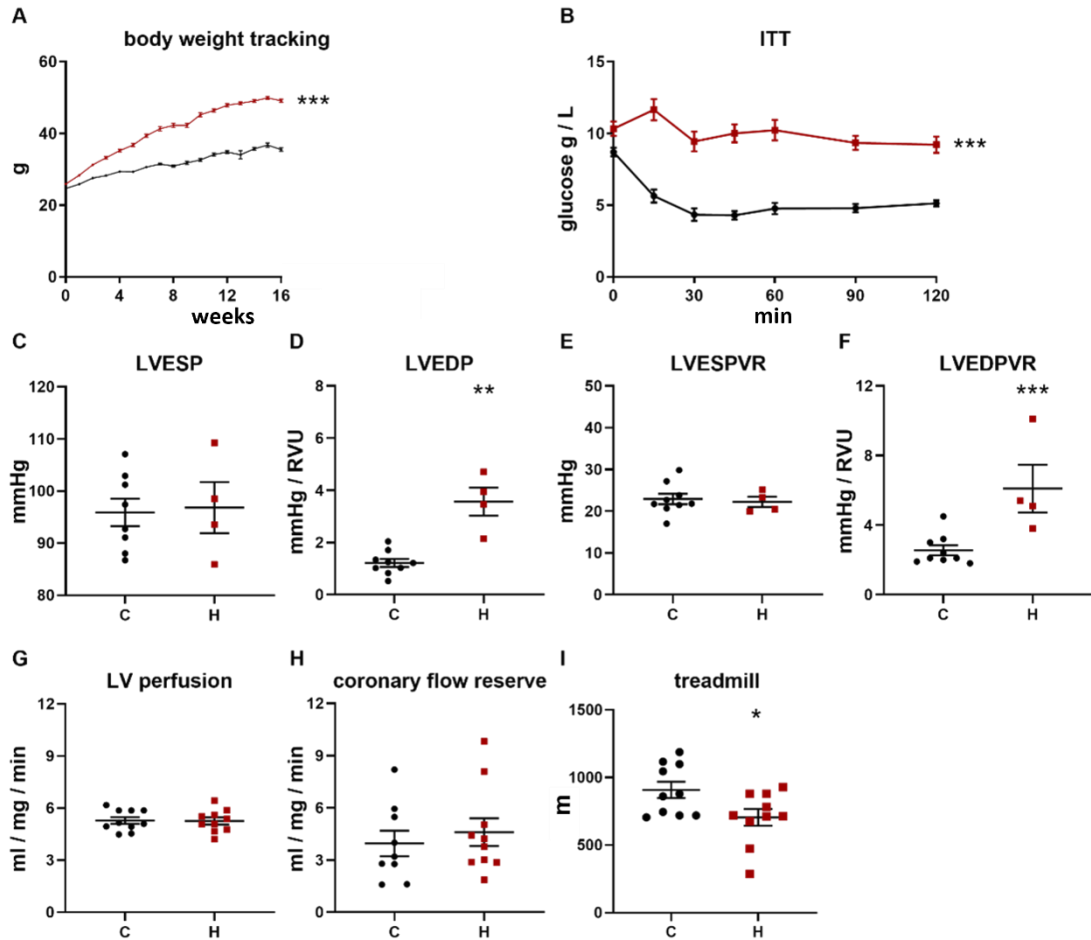


Figure 1. Global metabolism, heart function and exercise capacity after 16 weeks of HFD.

Panels A to I show mice in the CTL (dark, circle- C) and in the HFD (red, square- H) groups. A) 16 weeks weight tracking curves (n=15, 50). B) Insulin tolerance test (ITT) (n=10/group). (C-F) Invasive hemodynamic (n=9, 4) showing C) left-ventricular end-systolic pressure (LVESP), D) left-ventricular end-diastolic pressure (LVEDP) i.e., LV filling pressure, E) left-ventricular end-systolic pressure- volume relation (LVESPVR) i.e., LV contractility, and F) left-ventricular end-diastolic pressure- volume relation (LVEDPVR) i.e., LV compliance which is impaired in the HFD group. (G-H), MRI measurements (n=10/group) showing G) LV basal perfusion, and H) the coronary reserve as the delta between LV perfusion under ATL313 that induces vasodilatation and LV basal perfusion. I) Distance traveled during a treadmill test (n=10/group). Data are presented as scatter plot and/or mean \pm SEM. Statistics: ANOVA-repeated measures for panels A and B and Student's t-test for panel C to I with * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ vs CTL.

8 weeks of returning to standard diet improved heart function with additional benefits in the presence of concomitant finerenone treatment

After 3 weeks of interruption of the HFD in the HFD-Stop and in the HFD-Stop+Fine groups, mice showed a significant weight loss compared to the HFD group. Afterwards and until the end of the 24 weeks of the protocol, the evolution of their weight-tracking curve was identical to that of the CTL mice (fig. 2A). Returning to the standard diet versus maintaining the HFD induced a reduction in body fat and an increase in lean body mass (Table 2), which was confirmed by weighing the subcutaneous

fat at the time of the sacrifice (Table 2). Returning to the standard diet improved the fasting glycaemia in mice (Table 2), as well as their insulin sensitivity (fig. 2B), without additional benefit in response to finerenone treatment. In the same extent, after 24 weeks of HFD, mice had increased plasma total cholesterol and triglycerides levels, as well as increased plasma leptin levels, which were all improved after 8 weeks of returning to a standard diet (Table 2).

Table 2. Global metabolism and cardiovascular function at the end of the protocol

	C	H	HS	HSF
<i>Metabolic parameters</i>				
Body weight, g	40.4±1.3	52.3±1.0***	38.0±1.0+++	39.2±0.9+++
Subcutaneous fat, mg	610±65	2139±167***	381±52+++	454±71+++
Fat mass, %	26.2±1.2	42.0±0.8***	23.8±1.2+++	25.7±1.2+++
Lean mass, %	71.6±1.1	57.6±0.9***	74.3±0.9+++	72.2±1.1+++
Water, %	64.1±0.9	52.2±0.8***	66.4±0.8+++	64.8±1.1+++
Fasting glycemia, g/L	7.23±0.32	10.32±0.41***	8.62±0.28†	9.20±0.31
Plasma cholesterol, mmol/L	1.91±0.07	3.75±0.11***	1.87±0.96+++	1.88±0.10+++
Plasma triglycerides, mmol/L	1.17±0.10	1.66±0.13**	0.96±0.14++	1.10±0.13†
Leptinemia, pg/mL	80±19	272±31***	7±2+++	24±8+++
<i>Echocardiography</i>				
LVEDD, mm	4.2±0.1	4.2±0.1	4.2±0.1	4.1±0.1
LVESD, mm	2.5±0.1	2.6±0.1	2.5±0.1	2.3±0.1
FS, %	42±1	38±1	41±2	45±1 ††
SV, mL/beat	0.089±0.0	0.080±0.002	0.095±0.004	0.094±0.004†
CO, mL/min	48.7±2.3	40.4±1.2 *	46.1±1.8	47.9±2.3†
E/A	1.45±0.10	1.58±0.09	1.43±0.12	1.35±0.07
<i>Invasive Hemodynamic</i>				
SBP, mmHg	98.5±5.5	95.0±3.7	92.2±3.1	95.0±4.5
DBP, mmHg	63.1±4.3	60.9±2.9	56.9±2.1	62.3±4.1
dP/dt max	7277±320	7617±311	7619±411	7575±351
dP/dt min	6562±290	6396±283	6302±299	6922±507
Tau ½	4.28±0.24	4.31±0.28	4.17±0.32	3.76±0.19
Tau-e	5.93±0.31	6.03±0.36	5.78±0.44	5.16±0.23

The body composition and body weight were measured 24 weeks after the start of the protocol by echo MRI (body weight, fat mass, lean mass, free water). Cholesterol, triglycerides and leptinemia were measured in plasma. The cardiac function was assessed by echocardiography to measure left ventricle end-diastolic diameter (LVEDD), left ventricle end-systolic diameter (LVESD), these measurements were used to calculate fractional shortening (FS). Doppler measurements were used to calculate the stroke volume (SV) and Cardiac output (CO). Before sacrifice, mice were catheterized in the left ventricle to measure cardiac hemodynamics, systolic blood pressure (SBP), diastolic blood pressure (DBP), dP/dT min, dP/dT max as well as constant of relaxation Tau ½ and Tau-e; n=14, 10, 15, 13 for the respective CTL, HFD, HS and HSF groups. Data are shown as mean±SEM; **P<0.01, ***P<0.001 vs CTL; †P<0.05, ††P<0.05, †††P<0.001 vs HFD.

After 24 weeks of continuous HFD, echocardiography revealed a decrease in LV fractional shortening, LV stroke volume and cardiac output (Table 2). Returning to a standard diet for 8 weeks, after 16 weeks of HFD, improved these parameters only with concomitant finerenone treatment (Table 2). LV catheterization showed no difference in systolic parameters between groups (fig. 2C and 2E). On the other hand, the hemodynamic invasive data highlighted that only finerenone treatment reduced the increased LV filling pressure (fig. 2D) of HFD mice. Moreover, finerenone treatment induced a more marked improvement in LV diastolic compliance (fig. 2F) than solely interrupting the enriched diet.

The MRI measurement of the basal perfusion (Fig. 2G) showed no difference between the groups after the 24 weeks of the protocol. The measurement of the maximal perfusion allowed calculating a decrease in the coronary reserve in HFD mice and in HFD-Stop mice put back for 8 weeks on a standard diet (fig. 2H), which only finerenone treatment made it possible to improve (fig. 2H). The exercise capacity on treadmill was reduced in HFD compared to CTL mice (fig. 2I), and significantly improved after returning to the standard diet with concomitant finerenone treatment (fig. 2I).

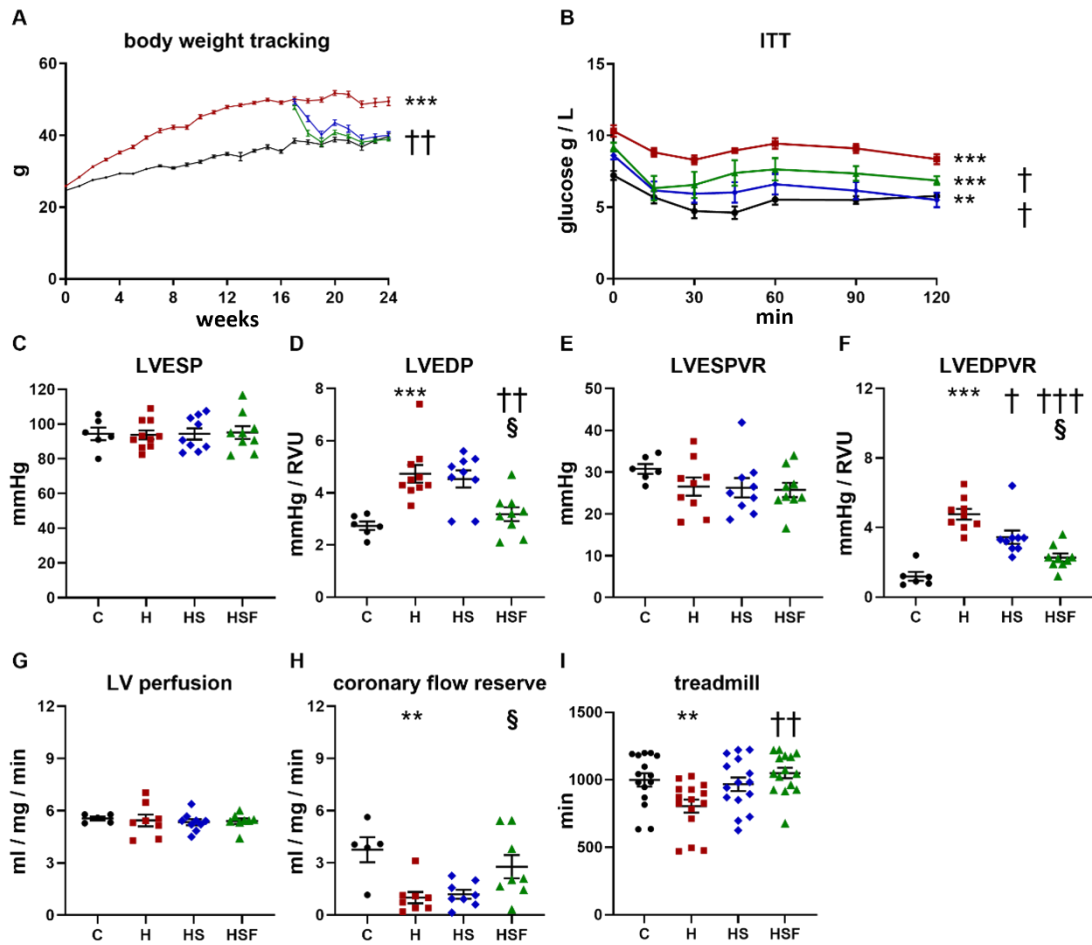


Figure 2. Global metabolism, heart function and exercise capacity after 16 weeks of HFD followed by a return to standard diet with or without concomitant finerenone treatment.

Panels A to I show mice in the CTL (dark, circle- C), HFD (red, square- H), HFD-Stop (diamond, blue- HS) and HFD-Stop+Fine (triangle, green- HSF) groups. A) 24 weeks weight tracking curves (n=15, 15, 17, 18). B) Insulin tolerance test (ITT) (n=10/group). (C-F) Invasive hemodynamic (n=6 to 10/group) showing C) left-ventricular end-systolic pressure (LVESP), D) left-ventricular end-diastolic pressure (LVESP) i.e. LV filling pressure, E) left-ventricular end-systolic pressure- volume relation (LVESPVR) i.e. LV contractility, and F) left-ventricular end-diastolic pressure- volume relation (LVESP) i.e. LV compliance which is impaired in the HFD group. (G-H) MRI measurements (n=5 to 9/group) showing G) LV basal perfusion, and H) the coronary reserve as the delta between LV perfusion under ATL313 that induces vasodilatation and LV basal perfusion. I) Distance traveled during a treadmill test (n=15 / group). Data presented as scatter plot and/or mean \pm SEM. Statistics: ANOVA-repeated measures for panels A and B; Student's t-test for panel C to I, **P<0.01 and ***P<0.001 vs CTL; one-way ANOVA + Tukey's post-hoc for panel C to I, †P<0.05, ††P<0.01 and †††P<0.001 vs HFD and § P<0.05 vs HFD-Stop.

Adverse interstitial collagen remodeling was improved upon return to standard with additional improvement upon concomitant finerenone treatment

Mean heart weight over tibia length ratios was slightly increased in mice from the HFD group compared to CTL mice (Table 3). Measurement of LV cardiomyocytes mean cross sectional area did not show difference between the groups (Table 3), but the capillary density was increased in mice on HFD in comparison with CTL mice, as well as in comparison with mice returned on standard diet with

or without finerenone treatment (Table 3). Interestingly, transmitted light microscopy analysis of Sirius red staining of LV sections showed that interstitial fibrosis was increased after 24 weeks of HFD (Fig. 3A), with comparatively lower collagen density in the LV of mice returned on standard diet (Fig. 3A). With more astringency, polarized light microscopy analysis showed a more pronounced beneficial effect for the decrease in LV interstitial collagen in mice concomitantly treated with finerenone (Fig. 3B).

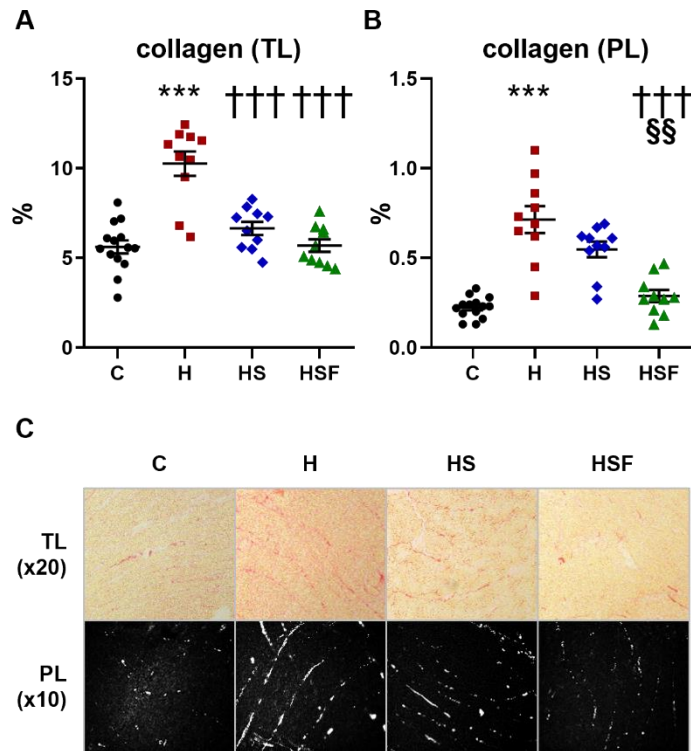


Figure 3. Interstitial collagen density after 16 weeks of HFD followed by a return to standard diet with or without concomitant finerenone treatment.

Panels A and B show microscopic analysis after Sirius red staining of LV section from mice in the CTL (dark, circle- C), HFD (red, square- H), HFD-Stop (diamond, blue- HS) and HFD-Stop+Fine (triangle, green- HSF) groups (n=14, 10, 10, 10) in A) transmitted light (TL) (magnification x20) and B) polarized light (PL) (magnification x10) (Panel C). Data presented as scatter plot and mean \pm SEM. Statistics: Student's t-test ***P<0.001 vs CTL; one-way ANOVA + Tukey's post-hoc, †††P<0.001 vs HFD and \$\$ P<0.01 vs HFD-Stop.

Table 3. Cardiac morphometry

	C	H	HS	HSF
<i>Heart weight and ratio</i>				
Heart, mg	188±3	201±5*	211±5	202±3
LV, mg	141±2	152±5*	159±4	153±3
RV, mg	39±2	40±1	41±1	39±1
Tibia length, mm	18.8±0.1	18.9±0.0	18.9± 0.1	18.9± 0.1
Heart / tibia length	10.0±0.2	10.7±0.3*	11.1±0.2	10.7±0.2
LV / tibia length	7.5±0.1	8.1±0.3	8.4±0.2	8.1±0.1
RV / tibia length	2.1±0.1	2.1±0.1	2.2±0.1	2.1±0.0
<i>Histology</i>				
MCSA	38663±1695	38355±1646	39105±971	37814±1226
Capillary density	1.21±0.05	1.39±0.04*	1.21±0.05†	1.23±0.05†

The weight of the heart, VG and VD were weighed and compared to the size of the tibia; n=18, 15, 17, 15. Histology of frozen section were used to measure myocyte cross-sectional area (MCSA) n= 10, 10, 10, 9 and Capillary density n= 11, 11, 11, 11. Data are shown as mean±SEM *P<0.05, vs CTL; †P<0.05, vs HFD.

Increased phospholamban phosphorylation in mice fed a HFD and PTP1B expression and Akt phosphorylation are modulated in mice treated with finerenone

The expressions of proteins involved in calcium handling in the cardiomyocyte were measured. There was no difference between groups in the expression of the RYR2 channel (ryanodine receptor 2) (fig. 4A) involved in calcium release from the sarcoplasmic reticulum, which is necessary for the contraction. The expression of the SERCA2A pump (sarco-endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 2A), involved in the return of calcium to the reticulum during relaxation in diastole, was not modified (fig. 4B). The expression of the CamKII kinase (Ca²⁺-calmodulin kinase type-2), involved in enhancing the activity of SERCA2a, was not modified either (fig. 4C). On the other hand, increased phosphorylation of the phospholamban was demonstrated in the LV of mice fed a HFD (fig. 4D, 4E, 4F), likely to allow a better activity of the SERCA2a pump with which it is associated in order to support the diastolic function in overweight mice.

We then measured the expression of the phosphatase PTP1B (protein tyrosine phosphatase 1B) reported as a transcriptional MR target ²⁹². PTP1B expression was increased in obese mice compared to mice under finerenone treatment and compared to CTL mice (Fig. 4G). The phosphorylation on Tyr₄₇₄ residue of the Akt kinase (protein kinase B) was then evaluated, and the ratio of phosphorylated-Akt/Akt was shown to be increased in mice back to a standard diet with concomitant finerenone treatment (fig. 4H, 4I, 4J).

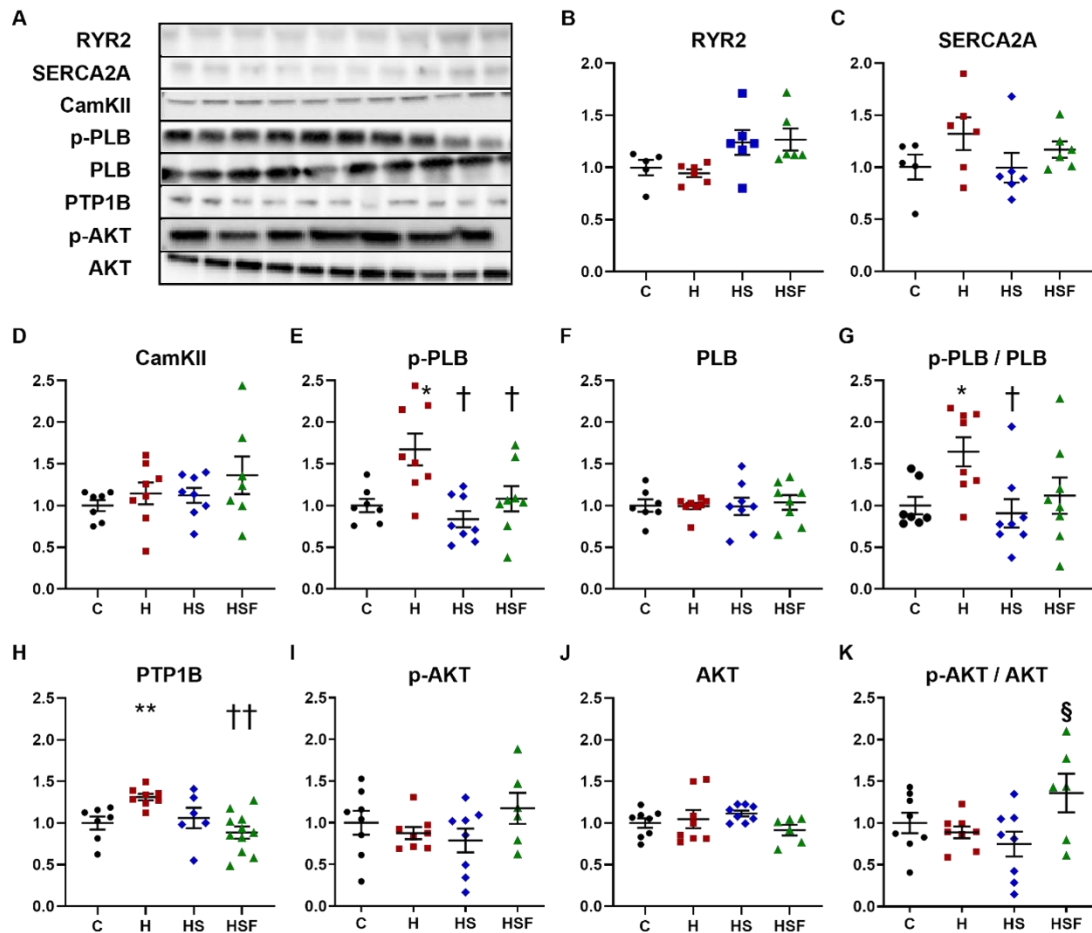


Figure 4. Western blots from LV extracts after 16 weeks of HFD followed by a return to standard diet with or without concomitant finerenone treatment.

Panels A to F show proteins involved in Ca^{2+} fluxes in the LV of mice from the CTL (dark, circle- C), HFD (red, square- H), HFD-Stop (diamond, blue- HS) and HFD-Stop+Fine (triangle, green- HSF) groups. A) Sacroplasmic ryanodin receptor 2 (RYR2), B) sarco-endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase 2A (SERCA2A), C) Ca^{2+} -calmodulin kinase type-2 (CamKII), D) phosphorylated phospholamban (p-PLB), E) total phospholamban (PLB), and F) the p-PLB/PLB ratio. Panel G to J show the expression of G) the protein tyrosine phosphatase-1B (PTP1B) and of H) its phosphorylated AKT-kinase target (p-AKT), I) total AKT-kinase (AKT), and J) the p-AKT/AKT ratio. Data expressed as fold of CTL are presented as scatter plot and mean \pm SEM. Statistics: Student's t-test, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs CTL; one-way ANOVA + Tukey's post-hoc, † $P < 0.05$, †† $P < 0.01$ vs HFD and § $P < 0.05$ vs HFD-Stop.

DISCUSSION

To date, no pharmacological treatment has shown clear benefits in the management of patients with heart failure with preserved ejection fraction associated with obesity or metabolic syndrome. In this model of high-fat diet-induced diastolic dysfunction, we have shown the benefits of the mineralocorticoid receptor antagonist finerenone on cardiac dysfunction.

Sixteen weeks of HFD leads to an increase in body weight, which results in an increase in the percentage of fat mass, and a decrease in the percentage of lean mass. This weight gain is accompanied by an increase in cholesterol concentration and a tendency to increase triglyceride concentration. In addition, there is an increase in fasting hyperglycemia and a decrease in insulin sensitivity. Bostick *et*

al. showed an increase in the weight of mice associated with an increase in visceral fat after 16 weeks of fatty diet ²⁹¹. In addition, Roche *et al.* showed an increase in weight associated with fasting hyperglycemia, hyperinsulinemia, and an increase in free fatty acids and low-density lipoproteins ²⁸¹. Altogether, these results suggest the development of a metabolic syndrome associated with diastolic dysfunction after 16 weeks of HFD.

This metabolic syndrome is associated with signs of diastolic dysfunction. Bostick *et al.* show similar results, using 3-week-old female C57Bl6 mice fed a high-fat, high-sucrose and high-fructose diet for 16 weeks. The mice displayed diastolic dysfunction, supported by an increased myocardial performance index, heart rate, and altered diastolic septal ring wall displacement (E'/A'), with no change in arterial pressure or E/A ratio ²⁹¹. In addition, Roche *et al.* showed, for 6- to 8-week-old male FVB/N mice fed a HFD (60%) for 16 weeks an increase cardiac rigidity (Roche et al 2015), also without change in blood pressure ²⁸¹.

At the end of the 24-week protocol, we observed for the HFD group an increase in total weight, a decrease in insulin sensitivity accompanied by an increase in fasting glycemia, as well as an increase in plasma cholesterol concentration. In addition, an increase in plasma leptin concentration was observed in the HFD group. Concerning cardiac function, we observed a deleterious increase in filling pressure and cardiac compliance. In addition, echocardiographic analyses showed a decrease in cardiac output, supporting the decrease in coronary reserve assessed by MRI. Finally, exercise capacity for the HFD group remained decreased compared with the CTL group. All together these highlight the deterioration of cardiac function.

Moreover, normalization of the diet leads to a maintenance of the significant increase in left ventricular pressure at tele-diastole compared with the CTL group, as well as a maintenance of the significant increase in the pressure-volume relation in telediastole compared with the CTL group. The latter parameter, however, showed lower values than those observed for the HFD group, showing that discontinuation of the fatty diet has a relative beneficial effect on diastolic dysfunction and that a reverse effect of deleterious effects is still possible at this point. The addition of finerenone treatment to diet normalization shows supplemental beneficial effects such as decrease in LV pressure in telediastole and improved filling pressure than diet normalization alone. Moreover, the addition of finerenone treatment lead recovery of coronary function and increase in exercise capacity. these results reinforce the hypothesis that finerenone treatment provides better improvement in cardiac function.

Finally, the presence of cardiac hypertrophy that is not found for the HS+Fine group, suggest that discontinuation of the HFD diet alone, in the context of chronic heart failure, leads to adverse pathophysiological adaptations, which are partially ameliorated by treatment with finerenone. The cardioprotective effect of finerenone has also been demonstrated in the laboratory for Zucker *fa/fa* rats or study by Youcef *et al.* showing that eplerenone is associated with improved metabolic parameters and preservation of systolic and diastolic function mainly in obese rats ^{164,293}. In addition, eplerenone delayed cardiac remodeling and the development of heart failure in both obese and non-obese rats ²⁹³.

Jia *et al.* conducted a study in female mice fed a high-fat, high-carbohydrate diet for 16 weeks, leading to the development of diastolic heart dysfunction with prolonged relaxation time and increased left ventricular filling pressure. These findings were associated with cardiomyocyte hypertrophy and increased interstitial fibrosis. Interestingly, the same diet fed to endothelial cell MR KO mice prevented diastolic dysfunction and resulted in improvement of the previously discussed parameters suggesting the deleterious effects of MR overactivation on cardiac function ²⁹⁴.

Furthermore, these results were associated with a decrease in cardiac oxidative stress and macrophagic infiltration as well as an improvement in insulin signaling²⁹⁴. Thus, it can be hypothesized that the improvement in cardiovascular function observed in our study might be mediated by the blockade of endothelial cell MR by finerenone. Moreover, these results are consistent with those observed in our study in ovariectomized mice where the study of coronary function showed an improvement by finerenone treatment, mediated in part by the reduction of oxidative stress²⁰⁴. This decrease of oxidative stress and the decreased of inflammation could play a beneficial role in cardiovascular function by an increasing •NO biodisponibility. This hypothesis is supported by the improved coronary reserve observed only on finerenone treated mice

In HFD mice, an increase in left ventricular interstitial fibrosis is observed compared with the CTL group, and only the HS+Fine group shows a decrease in this parameter. These results suggest that the improvement in cardiovascular function observed only in the treated group would be, in part, mediated by the anti-fibrotic effect of finerenone. Because the RT-qPCR results in the left ventricle did not show a significant difference in TGF- β expression as described²⁹⁵, it can be assumed that the pro-fibrotic effect observed in our model is mostly mediated by overactivation of the renin-angiotensin-aldosterone system.

Regarding the improvement of metabolic parameters, the decrease in insulin sensitivity that we observe in our model could be mediated by the increased expression of PTP1B, which is a negative regulator of the insulin signaling pathway. This increase in PTP1B expression could be mediated in part by an increase in reactive oxygen species. In addition, the improvement in insulin sensitivity after treatment with finerenone suggests a potential beneficial effect of finerenone on the regulation of PTP1B expression. Furthermore, Marzolla *et al.* previously showed in mice with high-fat diet-induced obesity and decreased insulin sensitivity that treatment with finerenone improved metabolism through activation of AMP-activated protein kinase, which stimulates activation of adipose triglyceride lipase, with a consequent increase in UCP-1 expression in brown adipocytes²⁹⁶. Furthermore, it was shown by Le Billan *et al.* that aldosterone infusion into a human kidney cell line expressing MR-associated Green Fluorescent Protein (GFP) leads to an increase in the expression of PTPN1, the gene behind PTP1B²⁹⁷.

Finally, regarding calcium homeostasis, the increase in phospholamban phosphorylation for HFD mice, which is decreased by diet normalization, associated or not with finerenone treatment, suggests a potential beneficial effect of fat diet cessation on calcium reuptake. However, the strong tendency to decrease the expression of CAMKII in the treated group, which can phosphorylate phospholamban and lead to inhibition of the SERCA pump, thus allowing better calcium reuptake, could suggest a possible impact of mineralocorticoid receptor antagonism on this molecular pathway. However, these results need to be further investigated before a conclusion can be reached.

Study limitations

Although the anti-fibrotic effect of finerenone is found in our mouse model, it would be interesting to develop a more severe model of heart failure with preserved ejection fraction to observe the effects of finerenone in more detail. Indeed, the mouse model presented in this study causes moderate heart failure, not leading to an increase in inflammation, nor to hypertension, contrary to other models from the scientific literature previously discussed

Nonetheless, the total time required to establish chronic heart failure and these associated comorbidities is difficult because of the time required. In addition, a more severe model would allow a more accurate assessment of the effects on renal function but also on metabolism. Indeed, Martinez-

Martínez *et al.* showed an improvement in metabolic parameters by MR antagonist treatment, which we did not find in this study ^{164,298}.

Regarding the study design, it would have been relevant to have an HFD+Finerenone group. Indeed, this would have allowed a comparison, not only with previously conducted studies (Lachaux *et al.*, Bostick *et al.*) but also for the comparison between HS, HS+Fine and HFD groups. In fact, the study only allows the comparison of the HS+Fine group with the HS group, both groups having undergone a normalization of the diet. Finally, it might be interesting to couple weight loss with exercise to more accurately assess the impact of diet normalization combined with increased activity on cardiovascular and renal function. Finally, although elevation of aldosterone levels and overactivation of the renin-angiotensin-aldosterone system has been widely described in the context of heart failure ²⁹⁹, it would be relevant to assay MR expression levels in targeted tissues (kidney, heart), as well as plasma aldosterone concentration.

CONCLUSION

Our results show that our model of high fat diet leads to metabolic syndrome. This metabolic syndrome results in a diastolic dysfunction after 16 weeks of treatment. The normalization of diet allows an improvement of cardiac function with a decrease of cardiac fibrosis. All these beneficial effects are even more improved by finerenone treatment especially an increase exercise capacity and coronary reserve.

Données supplémentaires

Evaluation des concentrations de cholestérol et de triglycérides plasmatiques après 16 semaines de régime HFD

Tableau 11. Cholestérol et triglycérides plasmatiques après 16 semaines de régime HFD vs CTL

Paramètre		CTL (n=3)	HFD (n=4)
Cholestérol (mmol/L)	plasmatique	2.1±0.0	3.8±0.3**
Triglycéride (mmol/L)	plasmatique	1.4±0.2	2.0±0.2

Les résultats sont exprimés en moyenne±ETM, **P<0.01 vs CTL. Test de Student.

Le dosage de la concentration plasmatique de cholestérol montre une augmentation dans le groupe HFD (Tableau 11). Le nombre faible de souris inclus ne permet pas d'émettre de conclusions fiables mais suggère une augmentation de la cholestérolémie et de la triglycéridémie. Ensemble, ces résultats suggèrent l'apparition de désordres métaboliques clés du syndrome métabolique.

Strain rate après 16 semaines de régime HFD

Pour mettre en évidence des modifications précoces de la fonction cardiaque du ventricule gauche une analyse du *strain* a été réalisé en échocardiographie.

Tableau 12. Paramètres de strain après 21 semaines de protocole

Les résultats sont exprimés en moyenne±ETM, 1-way ANOVA + post-hoc de Tukey. *P<0.05 vs HFD.

Semaines de régime gras	21			
	CTL (n=7)	HFD (n=8)	HS (n=7)	HS+Fine (n=8)
Strain rate longitudinal (temps jusqu'au pic, ms)	41.2±1.3	49.0±2.6	40.6±4.6	48.8±3.4
Strain rate longitudinal (pk, 1/s)	-7.5±1.3	-4.3±0.2 (P=0.0808)	-5.3±1.0	-4.6±0.6
Déplacement radial (pk, mm)	0.5±0.1	0.3±0.0 *	0.4±0.0	0.4±0.0
Déplacement radial (temps jusqu'au pic, ms)	73.8±1.7	78.4±1.8	76.6±4.5	77.5±3.6
Déplacement longitudinal (pk, mm)	0.3±0.0	0.2±0.1	0.2±0.0	0.2±0.0
Déplacement longitudinal (temps jusqu'au pic, ms)	77.0±4.4	74.7±6.7	74.6±6.4	80.1±4.4
Vélocité radiale (pk, cm/s)	1.3±0.2	0.9±0.1 (P=0.0984)	1.0±0.1	1.0±0.1
Vélocité radiale (temps jusqu'au pic, ms)	37.5±2.0	40.5±2.7	38.9±3.5	38.5±2.2
Vélocité longitudinale (pk, cm/s)	0.8±0.1	0.7±0.1	0.7±0.1	0.8±0.0
Vélocité longitudinale (temps jusqu'au pic, ms)	37.5±1.9	58.3±11.0.	41.9±4.7	46.0±4.3

L'analyse du *strain* par le logiciel Vevo Strain montre une diminution du déplacement radial pour le groupe HFD comparé au groupe contrôle (P<0.05). On observe également une

tendance à la diminution de la vélocité radiale dans ce même groupe ($P=0.0984$) ainsi qu'une augmentation du strain rate longitudinal ($P=0.0808$) (Tableau 12).

Infiltration macrophagique et lymphocytaire du ventricule gauche après 24 semaines de protocole

Tableau 13. Paramètres inflammatoires évalués à partir de coupes de ventricule gauche congelées à -80°C puis immunomarquées pour permettre le comptage des cellules de type M1, non-M1, et des lymphocytes T

<i>Semaines de régime gras</i>	24			
Paramètre	CTL (n=12)	HFD (n=12)	HS (n=14)	HS+Fine (n=13)
Nombre de M1	17.0±1.2	22.4±1.6	25.1±2.0 **	22.5±1.3
Nombre de non-M1	4.1±1.2	3.6±0.6	4.0±0.8	3.8±0.8
M1/non-M1	9.0±2.5	8.4±1.5	17.1±5.9	9.5±1.8
Lymphocytes T (CD4+/CD8+)	1.9±0.8	1.7±0.5	/	/

Les résultats sont exprimés en moyenne±ETM. 1-way ANOVA + post-test Tukey. ** $P<0.01$ versus CTL.

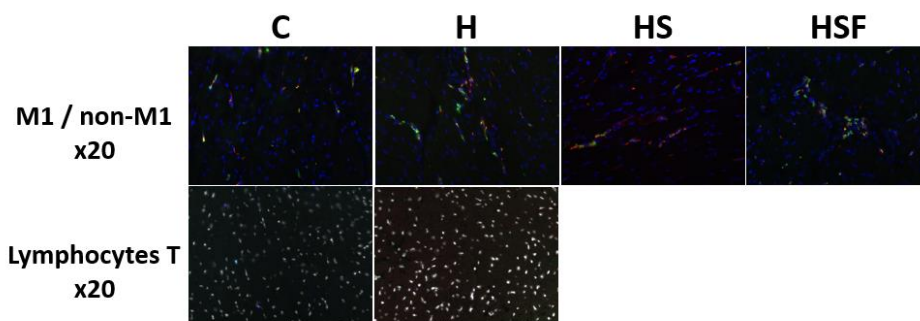


Figure 23. Images de coupes de ventricule gauche marquées pour les macrophages de types M1 et non-M1 (haut du panel) et pour les lymphocytes T (bas du panel).

Le comptage des macrophages de type M1 (pro-inflammatoires) et de type non-M1 (impliqués dans la résolution de l'inflammation) à partir de coupes de VG n'a pas permis de mettre en évidence de différence entre les groupes concernant le ratio M1/non-M1. On peut toutefois noter une augmentation significative des macrophages de type 1 dans le groupe HS comparé au groupe contrôle ($P<0.01$). De plus, le marquage CD4+/CD8+ des lymphocytes T sur des coupes de VG ne montre pas de différence entre le groupe contrôle et le groupe HFD (Tableau 13). Ces résultats ne permettent pas de mettre en évidence des modifications de l'état inflammatoire cardiaque.

Taille et nombre des cardiomyocytes du ventricule gauche après 24 semaines de protocole

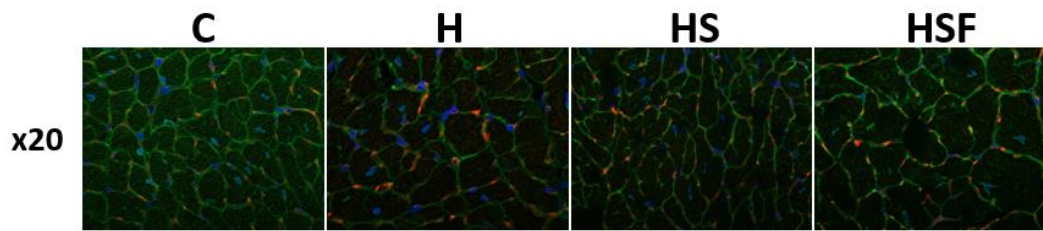


Figure 24. Image de coupe du ventricule gauche (marquage CD31, FITC-WGA et coloration de Hoescht) montrant les membranes des cardiomyocytes, leurs noyaux et les vaisseaux

RT-qPCR de l'expression génique de cibles moléculaires d'intérêt dans le ventricule gauche

Table 14. RT-q-PCR permettant la quantification de l'expression de diverses cibles moléculaires d'intérêt dans le ventricule gauche après 24 semaines de protocole

Paramètre	Fonction	CTL (n=10)	HFD (n=10)	HS (n=12)	HS+Fine (n=12)
Pai-1/Hprt 1	Inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1	1.0±0.1	1.2±0.1	0.6±0.1 *	0.8±0.1 \$
TGFβ/Hprt 1	Cytokine pro-inflammatoire	1.0±0.0	1.0±0.0	1.2±0.0 *, \$	1.2±0.0 **, \$ \$
Rgs2/Hprt 1	Régulateur de la signalisation des protéines G	1.0±0.1	1.3±0.1 *	1.0±0.1 \$	1.0±0.1 \$
Sgk1/Hprt 1	Régulation de l'équilibre hydro-sodé	1.0±0.1	1.3±0.1	1.1±0.1	1.0±0.1
Arglu1/Hprt 1	Signalisation des hormones de stress et développement	1.0±0.1	0.9±0.0	0.8±0.0 *	0.8±0.0 **
Lcn2/Hprt 1	Pro-fibrotique et pro-inflammatoire	1.0±0.1	1.3±0.1	1.5±0.2	1.2±0.3
PTP1B/Hprt 1	Régulateur négatif des voies de la leptine et de l'insuline	1.0±0.0	1.0±0.0	1.0±0.0	0.9±0.0

Pai-1 : inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1, *TGFβ* : Facteur de croissance transformant, *Rgs2* : Régulateur de la signalisation des protéines G 2, *Sgk1* : Kinase 1 sérique et régulée par les glucocorticoïdes, *Arglu1* : Protein 1 riche en en arginine et glutamate, *Lcn2* : lipocaline 2, *Hprt1* : Hypoxanthine phosphoribosyltransférase 1 (gène de ménage). Les résultats sont exprimés en moyenne±ETM. 1-way ANOVA + post-test de Tukey. Résultats normalisés par rapport au contrôle. 1-way ANOVA + post-test de Tukey. *P<0.05 versus CTL, **P<0.01 versus CTL, \$P<0.05 versus HFD, \$\$P<0.01 versus HFD.

On observe une augmentation de l'expression génique de *TGFβ* pour les groupes HS et HS+Fine. De plus, l'expression génique de *Rgs2* est augmentée pour le groupe HFD et diminuée par la normalisation du régime alimentaire associée ou non au traitement par la finérone. Enfin, il apparaît que l'expression d'*Arglu1* est diminuée pour les groupes HS et

HS+Fine. Néanmoins, cette variation est minime et ne doit pas traduire de modification physiologique (Tableau 14).

La fonction cardiaque et la fonction rénale sont fortement liées, et la dysfonction de l'un peut entraîner la dysfonction de l'autre, c'est pourquoi nous avons étudié la fonction rénale dans notre modèle.

Pour évaluer la fonction rénale, nous avons fait un screening de l'expression génique de protéines rénales pouvant être impliquées dans la dysfonction rénale.

RT-Q-PCR de cibles d'intérêt moléculaire rénale

Tableau 15. RT-q-PCR à partir de tissu rénal permettant de quantifier l'expression de gènes d'intérêt après 24 semaines de protocole

Semaines de régime gras		24			
Paramètre	Fonction	CTL (n=14-18)	HFD (n=12-13)	HS (n=16-17)	HS+Fine (n=14-16)
Dysfonction rénale					
NEPHRIN	Filtration glomérulaire	1.0±0.0	0.7±0.1 **	0.7±0.1 ***	0.6±0.0 ***
PODOCIN	Filtration glomérulaire	1.0±0.1	0.9±0.1	0.8±0.1	0.9±0.1
Ki-67	Marqueur de prolifération	1.0±0.0	0.9±0.1	0.8±0.1	1.1±0.1
KIM 1	Marqueur de l'altération du tubule rénal proximal	1.0±0.1	2.6±0.4	1.4±0.3	1.5±0.3
Fibrose					
COL 1	Précurseur du collagène	1.0±0.1	0.8±0.1	1.0±0.2	1.2±0.1
COL 3	Précurseur du collagène	1.0±0.1	0.7±0.1	0.9±0.1	0.9±0.1
COL 4	Précurseur du collagène	1.0±0.1	0.8±0.1	0.7±0.1 **	0.7±0.0 ***
PAI-1	Inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1	1.0±0.1	1.2±0.3	0.7±0.1	1.1±0.2
Fibronectin	Glycoprotéine de la matrice extracellulaire	1.0±0.1	0.8±0.1	0.8±0.1	0.8±0.1
CTGF	Protéine de la matrice extracellulaire	1.0±0.1	0.7±0.0 **	0.6±0.1 ***	0.5±0.1 ***
Inflammation					
F4/80	Marqueur de macrophage	1.0±0.1	0.8±0.1	0.8±0.1	0.8±0.1
TNF-α	Cytokine pro-inflammatoire	1.0±0.1	1.0±0.1	0.8±0.1	0.9±0.1
IL-1β	Cytokine pro-inflammatoire	1.0±0.1	1.6±0.7	1.2±0.1	1.2±0.2
IL-6	Cytokine pro-inflammatoire	1.0±0.1	1.3±0.2	1.2±0.2	1.2±0.3
TGFβ	Cytokine pro-inflammatoire	1.0±0.1	0.7±0.1 *	0.6±0.1 ***	0.9±0.1
MCP1	Chimiokine pro-inflammatoire	1.0±0.1	1.5±0.1 *	0.9±0.1 \$\$	1.1±0.1
RANTES	Chimiokine pro-inflammatoire	1.0±0.1	0.9±0.1	0.6±0.1 ***,\$	0.7±0.1 *

KIM-1 : Kidney Injury Molecule-1, Col 1, 3, 4 : Collagène 1, 3, 4, Pai-1 : inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1, CTGF : Connective Tissue Growth Factor, TNF-α : Facteur de nécrose tumorale α, IL : Interleukine, TGF : Facteur de croissance transformant. Les résultats sont exprimés en moyenne±ETM. 1-way ANOVA + post-test de Tukey. Résultats normalisés par rapport au contrôle. HRPT1 : gène de ménage.

Concernant la dysfonction rénale, la diminution de l'expression génique de la néphrine, protéine impliquée dans la filtration glomérulaire, pour les groupes HFD, HS et HS+Fine suggère une atteinte de la fonction rénale induite par l'obésité sans modification par la normalisation du régime alimentaire ou le traitement.

Il a été suggéré que le CTGF, associé au TGF- β , est impliqué dans la fibrose. Or, nos résultats montrent que l'expression génique de ces deux marqueurs est diminuée pour les groupes HFD et HS, ce qui va à l'encontre des résultats obtenus par Rouge Sirius. Néanmoins, la fibrose étant le résultat d'un ensemble de facteurs, il est probable que l'augmentation de la fibrose pour le groupe HFD, puis sa diminution pour le groupe HS+Fine soit médiée par d'autres voies que les protéines pro-fibrotiques investiguées dans ce screening.

Enfin, les marqueurs d'inflammation semblent diminués pour le groupe HS, suggérant une diminution de l'inflammation permise par la normalisation du régime alimentaire. Cette diminution n'est pas retrouvée dans le groupe traité (Tableau 15).

En conclusion, ces résultats ne montrent pas de tendance franche car les variations de l'expression génique ne sont pas supérieures à un facteur 2. De plus, la régulation des protéines pouvant être modifiée post-transcriptionnellement, il serait pertinent d'évaluer l'expression protéique en plus de l'expression génique, et de mesurer également la fibrose rénale et l'état inflammation par immunomarquage.

Conclusion

En conclusion, l'administration d'un régime gras conduit au développement d'une dysfonction diastolique, qui est partiellement améliorée par la normalisation du régime alimentaire, et davantage améliorée par le traitement par la finérénone. En parallèle de ces résultats on constate une diminution de la réserve coronaire chez les souris sous régime gras ayant ou non eu une normalisation du régime alimentaire. Cette diminution de la réserve coronaire tend à être améliorée par le traitement à la finérénone. Ces résultats peuvent expliquer l'amélioration de la résistance à l'effort obtenue chez les souris traitées à la finérénone, amélioration qui pourrait être en partie expliquée par l'action anti-fibrotique de la finérénone.

De plus, les variations métaboliques observées semblent être partiellement réversibles, sans différence apportée par le traitement.

3.2. Etude 2 : Modèle murin d'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée liée à la ménopause

Il a été montré que l'incidence d'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée augmente chez les femmes après la ménopause. Les modifications hormonales associées à la ménopause peuvent conduire à un pré-syndrome métabolique, marqué notamment par l'augmentation du taux circulant de leptine. L'objectif de cette étude est d'évaluer l'effet de la finérénone sur un modèle murin de ménopause induite par ovariectomie.

Mineralocorticoid receptor blockade with finerenone improves heart function and exercise capacity in ovariectomized mice

Marie Pieronne-Deperrois^{1†} , Alexandre Guéret^{1†}, Zoubir Djerada², Clément Crochemore³, Najah Harouki¹, Jean-Paul Henry¹, Anaïs Dumesnil¹, Marine Larchevêque¹, Jean-Claude do Rego⁴, Jean-Luc do Rego⁴, Lionel Nicol¹, Vincent Richard¹, Frédéric Jaisser⁵, Peter Kolkhof⁶, Paul Mulder¹, Christelle Monteil³ and Antoine Ouvrard-Pascaud^{1*}

¹Inserm U1096 ENVI, Rouen Medical School, UNIROUEN, Normandy University, Rouen, France; ²Pharmacology Department, Reims University Hospital, Reims, France; ³EA4651 Toxemac-ABTE, Rouen Medical School, UNIROUEN, Normandy University, Rouen, France; ⁴SCAC Behavioral Analysis Platform, Rouen Medical School, UNIROUEN, Normandy University, Rouen, France; ⁵Inserm U1138, Cordeliers Institute, Paris-VI University, Paris, France; ⁶Bayer AG, Wuppertal, Germany

Abstract

Aims In post-menopausal women, incidence of heart failure with preserved ejection fraction is higher than in men. Hormonal replacement therapies did not demonstrate benefits. We tested whether the non-steroidal mineralocorticoid receptor antagonist finerenone limits the progression of heart failure in ovariectomized (OVX) mice with metabolic disorders.

Methods and results Ovariectomy was performed in 4-month-old mice, treated or not at 7 months old for 1 month with finerenone (Fine) 1 mg/kg/day. Left ventricular (LV) cardiac and coronary endothelial functions were assessed by echocardiography, catheterization, and myography. Blood pressure was measured by plethysmography. Insulin and glucose tolerance tests were performed. Exercise capacity and spontaneous activity were measured on treadmill and in combined indirect calorimetric cages equipped with voluntary running wheel. OVX mice presented LV diastolic dysfunction without modification of ejection fraction compared with controls (CTL), whereas finerenone improved LV filling pressure (LV end-diastolic pressure, mmHg: CTL 3.48 ± 0.41, OVX 6.17 ± 0.30**, OVX + Fine 3.65 ± 0.55[†], ***P* < 0.01 vs. CTL, [†]*P* < 0.05 vs. OVX) and compliance (LV end-diastolic pressure–volume relation, mmHg/RVU: CTL 1.65 ± 0.42, OVX 4.77 ± 0.37***, OVX + Fine 2.87 ± 0.26^{††}, ****P* < 0.001 vs. CTL, ^{††}*P* < 0.01 vs. OVX). Acetylcholine-induced endothelial-dependent relaxation of coronary arteries was impaired in ovariectomized mice and improved by finerenone (relaxation, %: CTL 86 ± 8, OVX 38 ± 3**, OVX + Fine 83 ± 7^{††}, ***P* < 0.01 vs. CTL, ^{††}*P* < 0.01 vs. OVX). Finerenone improved decreased ATP production by subsarcolemmal mitochondria after ovariectomy. Weight gain, increased blood pressure, and decreased insulin and glucose tolerance in OVX mice were improved by finerenone. The exercise capacity at race was diminished in untreated OVX mice only. Spontaneous activity measurements in ovariectomized mice showed decreased horizontal movements, reduced time spent in a running wheel, and reduced VO₂ and VCO₂, all parameters improved by finerenone.

Conclusions Finerenone improved cardiovascular dysfunction and exercise capacity after ovariectomy-induced LV diastolic dysfunction with preserved ejection fraction.

Keywords Mineralocorticoid receptor; Aldosterone; Diastolic dysfunction; Exercise; Ovariectomy; Menopause; Metabolic syndrome

Received: 23 July 2020; Revised: 27 November 2020; Accepted: 6 January 2021

*Correspondence to: Antoine Ouvrard-Pascaud, Inserm U1096 ENVI, Rouen Medical School, UNIROUEN, Normandy University, Rouen, France. Tel: +33662024315.

Email: antoine.ouvrard-pascaud@univ-rouen.fr

[†]These authors have equally contributed to this work.

Introduction

Mineralocorticoid receptor (MR) antagonists (MRAs) have been shown to reduce mortality in heart failure (HF) with reduced ejection fraction (EF) at advanced stages of the disease^{1,2} and to slow the progression of mild symptomatic HF.³ Concerning HF with preserved EF (HFpEF), a sub-study from the TOPCAT (Treatment of Preserved Cardiac Function Heart Failure With an Aldosterone Antagonist) trial performed in the Americas, Georgia, and Russia showed efficacy of the MRA spironolactone in American patients only,⁴ most likely because patients from Georgia and Russia were not appropriately treated.⁵

In clinical practice, the steroidal MRAs spironolactone and eplerenone remain underused because of their common risk of hyperkalemia and because of the risks of gynaecomastia, erectile dysfunction and menstrual irregularities of spironolactone that also binds to androgen and progesterone receptors.⁶ The novel non-steroidal MRA finerenone has an over 500-fold higher selectivity vs. the androgen, progesterone, or glucocorticoid receptors.⁶ When compared with spironolactone treatment in patients with chronic HF with reduced EF and mild to moderate chronic kidney disease, finerenone led to a smaller mean increase in serum potassium concentration and to a lower number of patients with hyperkalaemia or renal failure or impairment.⁷ Moreover, finerenone was also shown to reduce the composite clinical endpoint of death from any cause, cardiovascular hospitalizations, or emergency presentation for worsening HF in comparison with eplerenone in patients with worsened HF and type 2 diabetes mellitus and/or chronic kidney disease.⁸

Several epidemiological studies agreed to assert that women represent the majority of patients with HFpEF. Among proposed mechanisms, clinical and basic research has implicated an activation of the renin–angiotensin–aldosterone system (RAAS) in the pathogenesis of diastolic dysfunction after menopause.⁹ After ovariectomy-induced post-menopausal conditions, increased expression of cardiac local RAAS components has been reported in rodents, including angiotensin II¹⁰ in rats and MR in rats¹¹ and mice,¹² with an increase in plasma aldosterone that was evidenced in rats.^{10,13} In obese mice, endothelial MR has been proposed as a player driving sex differences in the dysfunction of resistance arteries. Indeed, in female mice with obesity, MR deletion in endothelial cells limits endothelial dysfunction by increasing nitric oxide (NO) bioavailability, a mechanism that was not evidenced in men.¹⁴

Ageing women tend to have more coronary microvascular endothelial dysfunction than men.¹⁵ Endothelial dysfunction *per se* leads to hypertension that increases the risk of HF three-fold in women compared with two-fold in men.¹⁶ Moreover, hypertension is a primary risk factor for diastolic

dysfunction, and after menopause, more women than men become hypertensive.¹⁷ The risk of HF increases with obesity and with diabetes mellitus by five-fold in women compared with 2.4-fold in men.¹⁸ Interestingly, MR blockade with spironolactone prevents diet-induced diastolic dysfunction and arterial stiffening¹⁹ in female mice fed with a high-fat/high-sucrose diet that induces obesity and insulin resistance. The metabolic syndrome (MetS) whose frequency increases by 60% after menopause,²⁰ with central obesity as the main cause, hypertension as a criteria, and diabetes as co-morbidity, is associated with a three-fold increase in cardiovascular mortality.²¹

To date, there is no approved treatment for HFpEF, the most frequent type of HF in women. Interestingly, it has been previously reported that MRAs are more efficacious as a cardiovascular therapy in women compared with men.²² Emphasizing RAAS as a major target in HFpEF, a recent trial concluded that sacubitril–valsartan (combination of neprilysin inhibitor with angiotensin II receptor antagonist) compared with valsartan alone seemed to reduce the risk of HF hospitalization more in old women (aged 74 ± 8) than in old men (aged 72 ± 9).²³ Recently, a *post hoc* analysis of the TOPCAT trial suggested a reduction in the secondary outcome of all-cause mortality in women, with significant interaction between sex and MRA treatment.²⁴ These trials highlight the need for more preclinical evaluations for the treatment of HFpEF in women. Therefore, we tested whether finerenone can improve left ventricular (LV) diastolic dysfunction with preserved EF in mice with ovariectomy and global metabolism disorders.

Methods

Detailed methods are available in the Supporting Information.

Animals

Experiments conformed to the 2010-63 European Union Directive, the national Institutional Ethics Committee (No. 0335402), and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the US National Institutes of Health (No. 85-23). Wild-type (Janvier, Le Genest-Saint-Isle, France) mice on B6D2 background were housed five per cage on light–dark cycle 12–12 h at room temperature 22 ± 2°C, with access to food (A3 SAFE, France) and water *ad libitum*. Mice aged 4 months were ovariectomized (OVX), treated or not when aged 7 months for 1 month with finerenone (1 mg/kg/day) (OVX + Fine) mixed in food, and compared with age-matched controls (CTL).

Statistics

Data are expressed as mean \pm standard error of the mean and analysed with GraphPad Prism 7.04. D'Agostino–Pearson test was used to verify normal distribution. Before finerenone treatment and for comparison of the same parameters after treatment, unpaired Student's *t*-test test was used. After finerenone treatment, one-way ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test was used, and repeated measures ANOVA was used for kinetic and dose–response curves. The differences between experimental groups were considered to be statistically significant from values of $P < 0.05$. Spontaneous activity and flow-mediated dilatation data were assessed by multivariate analysis using generalized linear modelling with R 3.1.4 using R 3.1.4 software package (The R Foundation for Statistical Computing, <http://www.r-project.org>). Differences between groups were assessed using likelihood ratio tests and Wald test. Distributions of residuals were checked as follows: (i) no outliers with the minimum and maximum values of

standardized residual within $[-3, +3]$ values, (ii) normal distribution with mean = 0 and a constant variance, and (iii) graphically by mean of QQplot. Multi-collinearity was tested using collinearity statistics (variance inflation factor).

Results

Finerenone improves diastolic function in mice with ovariectomy

We tested the efficacy of 1 month finerenone treatment (1 mg/kg/day) after 3 months of ovariectomy in wild-type OVX mice aged 8 months. At the cardiac level, ultrasound in OVX mice without or with finerenone treatment (OVX + Fine) compared with age-matched controls (CTL) showed no difference in LV diameter at both end-systole and end-diastole nor in the resulting fractional shortening (FS) (Table 1), that is, the ultrasound index of LVEF.

Table 1 Cardiac parameters and arterial pressure

	CTL	OVX	OVX + Fine
<i>Echocardiography</i>			
LVEDD (mm)	3.3 \pm 0.1 ($n = 8$)	3.5 \pm 0.1 ($n = 9$)	3.5 \pm 0.1 ($n = 10$)
LVESD (mm)	1.7 \pm 0.1 ($n = 8$)	1.9 \pm 0.1 ($n = 9$)	1.8 \pm 0.1 ($n = 10$)
FS (%)	49 \pm 2 ($n = 8$)	47 \pm 3 ($n = 9$)	49 \pm 2 ($n = 10$)
SV (mL per beat)	0.063 \pm 0.002 ($n = 8$)	0.065 \pm 0.002 ($n = 9$)	0.063 \pm 0.003 ($n = 10$)
CO (mL/min)	35.8 \pm 1.8 ($n = 8$)	37.2 \pm 1.6 ($n = 9$)	35.4 \pm 1.8 ($n = 10$)
<i>LV haemodynamics</i>			
dP/dt _{min}	8486 \pm 1464 ($n = 4$)	5813 \pm 723 ($n = 7$)	5121 \pm 735 ($n = 6$)
Tau	6.89 \pm 0.54 ($n = 4$)	9.13 \pm 0.65 ($n = 7$)	9.68 \pm 1.46 ($n = 6$)
<i>Organ weights</i>			
HW (mg)	119 \pm 7 ($n = 8$)	121 \pm 5 ($n = 11$)	114 \pm 3 ($n = 15$)
HW/TL (mg/mm)	6.4 \pm 0.4 ($n = 8$)	6.6 \pm 0.3 ($n = 11$)	6.2 \pm 0.2 ($n = 15$)
LVW (mg)	90 \pm 5 ($n = 8$)	90 \pm 2 ($n = 11$)	88 \pm 2 ($n = 15$)
LVW/TL (mg/mm)	4.9 \pm 0.3 ($n = 8$)	4.9 \pm 0.1 ($n = 11$)	4.74 \pm 0.1 ($n = 15$)
<i>Histology and immunolabelling</i>			
MCSA (μm^2)	294 \pm 12 ($n = 8$)	342 \pm 8 ($n = 8$)*	321 \pm 11 ($n = 11$)
Capillary density	1.20 \pm 0.03 ($n = 8$)	1.15 \pm 0.03 ($n = 10$)	1.13 \pm 0.02 ($n = 10$)
PECAM-1 ⁺ vessels (nb per field)	86 \pm 4 ($n = 8$)	86 \pm 4 ($n = 10$)	90 \pm 4 ($n = 10$)
Coll-I (% per field)	15.3 \pm 1.0 ($n = 7$)	13.8 \pm 1.1 ($n = 9$)	14.8 \pm 0.8 ($n = 10$)
Coll-III (% per field)	2.9 \pm 0.3 ($n = 7$)	2.2 \pm 0.4 ($n = 9$)	2.6 \pm 0.3 ($n = 10$)
<i>Plethysmography</i>			
SBP (mmHg)	135 \pm 6 ($n = 9$)	158 \pm 5 ($n = 7$)*	137 \pm 5 ($n = 8$) [†]
DBP (mmHg)	96 \pm 7 ($n = 9$)	120 \pm 5 ($n = 7$)*	97 \pm 7 ($n = 8$)
<i>Oxidative stress</i>			
LV ROS	370.7 \pm 15.8 ($n = 15$)	336.5 \pm 9.7 ($n = 11$)	356.0 \pm 18.6 ($n = 9$)
IFM ROS	5650 \pm 697 ($n = 10$)	6158 \pm 1467 ($n = 7$)	6027 \pm 645 ($n = 10$)
SSM ROS	7047 \pm 1123 ($n = 10$)	7644 \pm 1312 ($n = 7$)	7581 \pm 1052 ($n = 10$)
A/F ratio	0.369 \pm 0.038 ($n = 10$)	0.358 \pm 0.016 ($n = 8$)	0.369 \pm 0.016 ($n = 6$)

Echocardiography: left ventricular (LV) end-diastolic diameter (LVEDD); LV end-systolic diameter (LVESD); fractional shortening (FS); stroke volume (SV); cardiac output (CO). *LV haemodynamics*: dP/dt_{min} rate of LV pressure decrease and relaxation constant Tau (Weiss method). *Organ weights*: heart and LV weights (HW and LVW) and ratios on tibia length (HW/TL and LVW/TL). *Histology and immunolabelling*: cardiomyocytes mean cross-sectional area (MCSA) after wheat germ agglutinin (WGA) staining for contouring cardiomyocytes; capillary density as the ratio of the number of capillaries [platelet and endothelial cellular adhesion molecule-1 (PECAM-1) immunolabelled endothelial cells] to the number of cardiomyocytes (WGA) ($\times 20$); percentage per field of immunolabelled collagen type I and III (Coll-I and Coll-III) ($\times 20$). *Plethysmography*: systolic and diastolic blood pressure (SBP and DBP). *Oxidative stress*: electron paramagnetic resonance for the measurement of reactive oxygen species (ROS) (AU/mg of protein) in all left ventricles and in interfibrillar or subsarcolemmal mitochondria (IFM and SSM); ratio of aconitase/fumarase activities (A/F).

* $P < 0.05$ vs. CTL.
[†] $P < 0.05$ vs. OVX.

Furthermore, ovariectomy did not lead to alterations in LV stroke volume or cardiac output (Table 1). Concerning heart remodelling and infiltration, 3 months of ovariectomy did not induce increased LV weight (Table 1) despite a significant increase in cardiomyocytes mean cross-sectional area in untreated OVX mice only (Table 1) and did not increase significantly the number of macrophages infiltrated in the myocardium (Supporting Information, Table S1). Furthermore, ovariectomy did not affect the amount of immunolabelled platelet and endothelial cellular adhesion molecule-1 (PECAM-1) and the related LV capillary density nor the amount of immunolabelled interstitial collagen types I and III (Table 1 and Supporting Information, Figure S1).

Providing greater precision, the recordings of pressure-volume curves after LV catheterization allowed revealing diastolic dysfunction in OVX mice. Indeed, if ovariectomy did not alter the LV ejection pressure in systole (LV end-systolic pressure) (Figure 1A), it increased the LV filling pressure in diastole (LV end-diastolic pressure), which was reduced by finerenone to the average value of CTL (Figure 1B). The load-independent assessment of LV systolic contractility (LV end-systolic pressure–volume relation) indicated that it

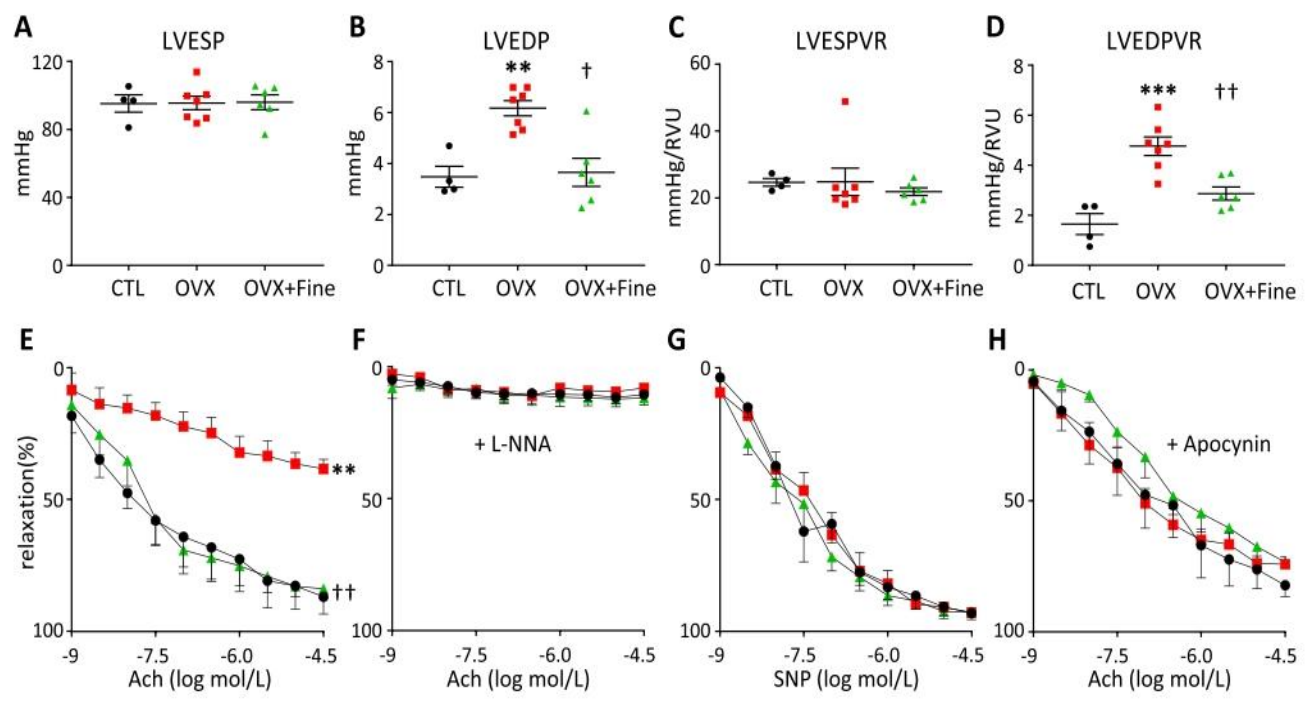
remained unchanged in OVX compared with CTL mice (Figure 1C). However, the assessment of LV diastolic compliance (LV end-diastolic pressure–volume relation) indicated that the LV relaxation was altered in OVX compared with CTL mice and again improved by finerenone treatment (Figure 1D).

In summary, finerenone treatment improved LV filling pressure and LV compliance in the context of ovariectomy-induced LV diastolic dysfunction with preserved FS/EF.

Finerenone improves peripheral and coronary arterial function in mice with ovariectomy

Compared with age-matched CTL, only untreated OVX mice had increased blood pressure (Table 1). Moreover, ultrasound assessments of temperature-induced vasodilation, and multivariate analyses adjusted to wall shear stress, indicated that the increases in blood flow induced smaller increases in diameter of peripheral femoral artery in OVX mice compared with both CTL and OVX + Fine mice (Supporting Information, Figure S2).

Figure 1 Finerenone treatment improved ovariectomy-induced left ventricular (LV) diastolic dysfunction and improved oxidative stress-related impairment of endothelium-dependent relaxation of coronary arteries. (A–D) LV invasive haemodynamics in control mice (CTL, black circles, $n = 4$) and in mice after 4 months of ovariectomy (OVX, red squares, $n = 7$) without or with 1 month finerenone treatment (OVX + Fine, green triangles, $n = 6$). (A) LV end-systolic pressure (LVESP). (B) LV end-diastolic pressure (LVEDP), that is, LV filling pressure. (C) LV end-systolic pressure–volume relation (LVESPVR), that is, LV contractility. (D) LV end-diastolic pressure–volume relation (LVEDPVR), that is, LV compliance. (E–H) Relaxation of isolated coronary arteries from control mice (CTL, black circles, $n = 5$) and from mice after 4 months of ovariectomy (OVX, red squares, $n = 6$) without or with 1 month finerenone treatment (OVX + Fine, green triangles, $n = 5$). Relaxation induced (E) by acetylcholine (Ach), (F) by Ach in the presence of the NO synthase inhibitor L-NG-nitro-arginine (L-NNA) 10^{-4} mol/L, (G) by the NO donor sodium nitroprusside (SNP), and (H) by Ach after addition of apocynin 10^{-4} mol/L. Data are mean \pm standard error of the mean. Statistics: one-way ANOVA plus Tukey, $**P < 0.01$ and $***P < 0.001$ vs. CTL; $^{\dagger}P < 0.05$ and $^{\dagger\dagger}P < 0.01$ vs. OVX.



Focusing on coronary arteries, the acetylcholine (Ach)-induced endothelium-dependent relaxation was impaired in arteries isolated from OVX but not in those isolated from OVX + Fine mice, when compared with arteries from CTL mice (Figure 1E). All the observed vasodilator responses relied on NO production by the endothelium, because pre-incubation with the NO synthase inhibitor L-NG-nitro-arginine abolished the Ach-induced relaxation in all groups (Figure 1F). The NO is known to be responsible for the relaxation of vascular smooth muscle cells, which responded similarly in all groups after pre-incubation of isolated arteries with the NO donor sodium nitroprusside allowing bypassing its endothelial production (Figure 1G).

To assess the hypothesis that impaired coronary function in OVX mice was at least partly related to an excess of superoxide generation, which would be responsible for an endothelial dysfunction by reducing the NO bioavailability, arteries from all groups were pre-incubated with the NADPH oxidase inhibitor apocynin prior to Ach. Apocynin allowed improving the Ach-induced relaxation of coronary arteries from OVX mice, which was no longer different of that of arteries from CTL mice or from OVX + Fine mice (Figure 1H), indicating that finerenone was efficient to reduce superoxide-mediated endothelial dysfunction. Suggesting that the oxidative stress was mostly limited to the vasculature, quantification by electron paramagnetic

resonance of reactive oxygen species (ROS) in the entire LV (Table 1) or in isolated myocardial mitochondria (Table 1) did not show any difference between groups nor the evaluation of mitochondrial oxidative stress via the ratio of fumarase over aconitase enzymatic activities (Table 1). Thus, in this post-menopausal ovariectomized mouse model, finerenone treatment repealed superoxide-mediated endothelial dysfunction at the level of coronary arteries (Table 1 and Figure 1H).

Metabolic improvements by finerenone treatment of mice with ovariectomy

Before starting treatment with finerenone, OVX mice had increased body weight compared with age-matched CTL, encompassing increased fat and reduced lean mass as measured by echo-magnetic resonance imaging (Table 2). Consistent with weight gain, plasma leptin was increased in OVX mice (Table 2). A 1 month finerenone treatment allowed reducing body weight of OVX mice (Table 2). There was no increase in total triglycerides or total cholesterol in OVX mice (Table 2). Nevertheless, compared with CTL mice, fasting glycaemia was increased in OVX mice before finerenone treatment and not different after treatment (Table 2). Furthermore, OVX mice had decreased tolerance to oral glucose

Table 2 Global metabolism

	CTL	OVX	OVX + Fine
Before finerenone treatment			
Body weight (g)	30.2 ± 1.2 (n = 15)	36.1 ± 0.8 (n = 21)***	
Fasting glycaemia (mmol/L)	6.5 ± 0.3 (n = 13)	7.6 ± 0.3 (n = 19)*	
<i>Echo-MRI before finerenone</i>			
Body weight (g)	28.2 ± 1.3 (n = 9)	36.5 ± 0.8 (n = 18)***	
Fat mass (%)	15.5 ± 1.8 (n = 9)	39.2 ± 1.0 (n = 18)***	
Lean mass (%)	81.7 ± 1.7 (n = 9)	59.2 ± 0.9 (n = 18)***	
Water in lean tissue (%)	75.1 ± 1.6 (n = 9)	53.2 ± 0.7 (n = 18)***	
After finerenone treatment			
Body weight (g)	28.4 ± 0.8 (n = 15)	33.4 ± 0.8 (n = 12)***	30.2 ± 1.1 (n = 9) [†]
Food consumption (g per 48 h)	3.47 ± 0.66 (n = 8)	2.94 ± 0.53 (n = 8)	3.94 ± 0.53 (n = 8)
Water consumption (mL per 48 h)	3.30 ± 0.94 (n = 8)	3.43 ± 0.33 (n = 8)	3.81 ± 0.52 (n = 8)
Leptinaemia (pg/mL)	3.6 ± 1.1 (n = 7)	48.5 ± 6.6 (n = 11)***	36.0 ± 7.6 (n = 11)
Plasma triglycerides (mmol/L)	1.23 ± 0.14 (n = 6)	1.12 ± 0.12 (n = 9)	0.96 ± 0.13 (n = 7)
Plasma cholesterol (mmol/L)	1.33 ± 0.28 (n = 6)	1.54 ± 0.08 (n = 9)	1.48 ± 0.18 (n = 8)
Fasting glycaemia (mmol/L)	6.5 ± 0.5 (n = 15)	7.7 ± 0.1 (n = 12) ¹	6.5 ± 0.4 (n = 9) ^{††}
<i>Echo-MRI after finerenone</i>			
Body weight (g)	28.4 ± 0.8 (n = 14)	33.4 ± 0.8 (n = 12)***	30.2 ± 1.1 (n = 9) [†]
Fat mass (%)	18.6 ± 2.3 (n = 14)	31.4 ± 1.4 (n = 12)***	26.3 ± 1.7 (n = 9) [†]
Lean mass (%)	79.6 ± 2.0 (n = 14)	66.2 ± 1.3 (n = 12)***	71.1 ± 1.6 (n = 9) [†]
Water in lean tissue (%)	72.6 ± 1.9 (n = 14)	60.4 ± 1.2 (n = 12)***	64.6 ± 1.5 (n = 9) [†]

MRI, magnetic resonance imaging.

¹P = 0.0520.

*P < 0.05.

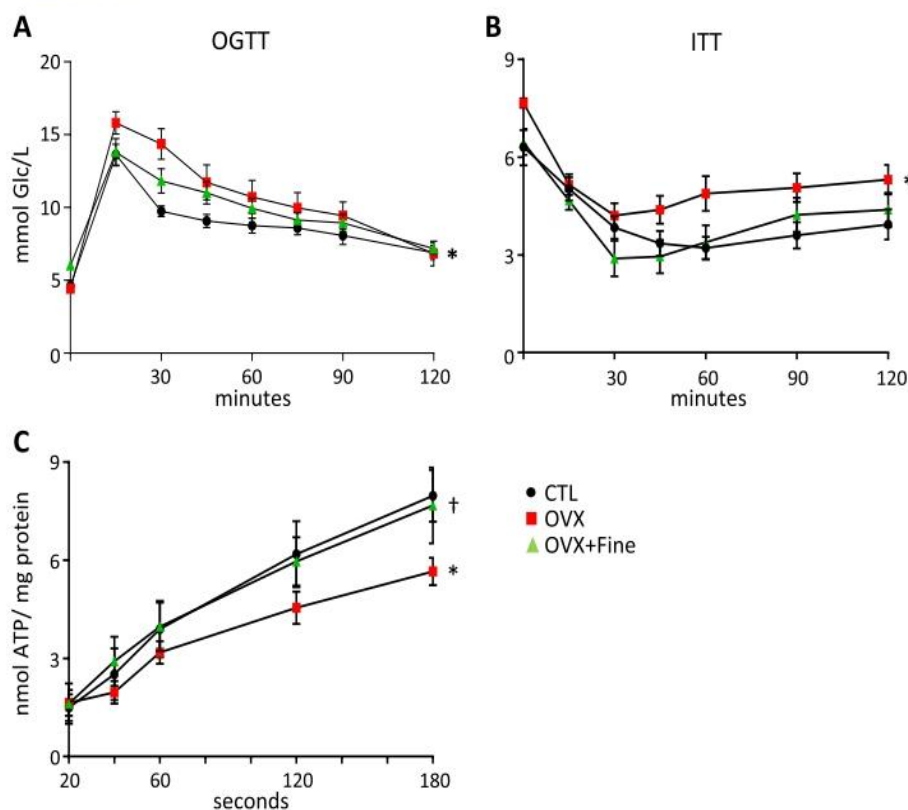
**P < 0.01.

***P < 0.001 vs. CTL.

[†]P < 0.05.

^{††}P < 0.05 vs. OVX.

Figure 2 Finerenone treatment allowed improving ovariectomy-induced reduction in glucose and insulin tolerance and reduction in myocardial ATP production. Assessments in control mice (CTL, black circles) and in mice after 4 months of ovariectomy (OVX, red squares) without or with 1 month finerenone treatment (OVX + Fine, green triangles). (A) Oral glucose tolerance test (OGTT) ($n = 11, 9, 9$). (B) Insulin tolerance test (ITT) ($n = 13, 12, 9$). (C) ATP production of subsarcolemmal mitochondria ($n = 9, 9, 10$). Data are mean \pm standard error of the mean. Statistics: one-way ANOVA plus Tukey, * $P < 0.05$ vs. CTL; † $P < 0.05$ vs. OVX.



compared with CTL mice (Figure 2A), which was not the case of OVX + Fine mice (Figure 2A). Moreover, OVX mice had decreased insulin sensitivity compared with both CTL and OVX + Fine mice (Figure 2B). Finally, in isolated cardiac subsarcolemmal mitochondria known to be impacted by type 2 diabetes²⁵ and ovariectomy,²⁶ a decrease in ATP production was evidenced in those isolated from OVX but not from OVX + Fine mice (Figure 2C).

Taken together, these data suggest that finerenone treatment of OVX mice improved ovariectomy-induced weight gain, impaired insulin sensitivity and impaired glucose tolerance, and LV mitochondrial dysfunction.

Finerenone improves the exercise capacity of mice with ovariectomy

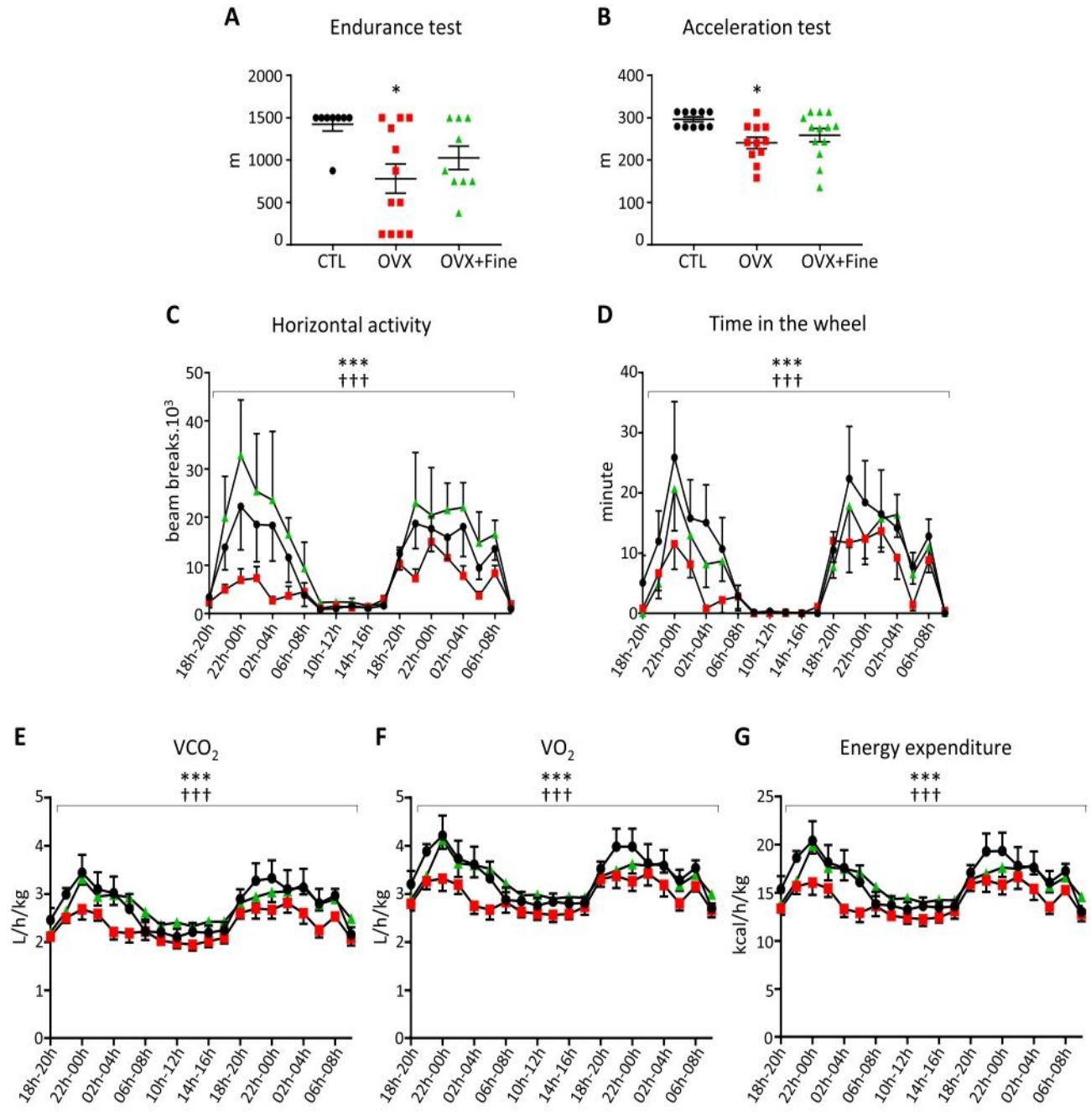
Because cardiovascular function was improved by MR blockade under post-menopausal conditions, we tested the ability of mice to perform forced or spontaneous exercise. On two distinct protocols on treadmill, (i) a 1 h endurance running and (ii) an acceleration test at race, the mean total distance (Figure 3A and 3B) was significantly diminished in the OVX group only but not in OVX + Fine mice compared with CTL

mice. Furthermore, none of the OVX mice were able to complete the acceleration test in contrast to 50% of CTL and 21.4% of OVX + Fine mice. To refine the assessment of exercise capacity, mice were placed for 2 days in a combined indirect calorimetry system equipped with a voluntary running wheel and locomotor activity sensor frames. In OVX vs. CTL mice, data showed decreased spontaneous horizontal activity (Figure 3C) and reduced time spent in the wheel (Figure 3D), associated with reduced VO_2 (Figure 3E), VCO_2 (Figure 3F), and energy expenditure (Figure 3G). In OVX + Fine vs. OVX mice, all the previously mentioned parameters were improved (Figure 3C–3G), demonstrating beneficial effect of finerenone treatment.

Discussion

Invasive haemodynamics indicated that OVX mice had diastolic dysfunction, as revealed by increased LV filling pressure and decreased LV compliance, which were both improved after finerenone treatment. OVX mice were considered to have isolated diastolic dysfunction because there was no reduction in LV FS as shown by echocardiography. Diastolic dysfunction

Figure 3 Finerenone treatment improved ovariectomy-induced decreased ability to exercise. Assessments in control mice (CTL, black circles) and in mice after 4 months of ovariectomy (OVX, red squares) without or with 1 month finerenone treatment (OVX + Fine, green triangles). (A) Run distance during an endurance ($n = 8, 12, 9$) or (B) an acceleration ($n = 10, 11, 13$) test at race. (C–G) Spontaneous activity ($n = 8, 8, 8$), each x -axis point being the integration per 2 h interval according to a 24 h clock, in cages with free access to an exercise wheel and indirect calorimetry measurements: (C) spontaneous horizontal activity, (D) time spent in the wheel, (E) VO_2 , (F) VCO_2 , and (G) energy expenditure. Data are mean \pm standard error of the mean. Statistics: (A, B) one-way ANOVA plus Tukey and (C–G) multivariate analysis, $*P < 0.05$ and $**P < 0.01$ vs. CTL; $^{++}P < 0.01$ and $^{+++}P < 0.001$ vs. OVX.



in 8-month-old OVX mice occurred without increase in LV interstitial collagen type I and III deposits, suggesting that it mainly depended on cardiomyocyte and on coronary functions, rather than in extracellular matrix stiffening at this age. We previously showed that in mice with subtotal nephrectomy-induced chronic kidney disease, finerenone treatment increased the phosphorylation of Ca^{2+} -calmodulin-dependent kinase-II (p-CaMKII), with subsequent increase

in the phosphorylation of the phospholamban at Thr₁₇, which allows diminishing its inhibitory effect on the sarcoendoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) pump, responsible for Ca^{2+} recapture in the sarcoplasm in diastole.²⁷ In cardiomyocytes isolated from ovariectomized rats, Bupha-Intr *et al.* measured reduced Ca^{2+} reuptake, due to reduced SERCA activity and expression, together with an increase in the supra-inhibitory monomeric form of the

SERCA-associated protein phospholamban.²⁸ In mice, Rouet-Benzineb *et al.* showed that preserved FS after 2 months of ovariectomy concealed increased expressions of proteins involved in Ca²⁺ reuptake, that is, phosphorylated Thr₁₇ phospholamban (p-CaMKII) and the phosphatase calcineurin.¹² Moreover, regarding myocardial stiffness, Farré *et al.* proposed that a reduction measured in LV strips after 6 months of ovariectomy in mice aged 9 months was due to cardiomyocytes rather than extracellular matrix, because the difference between OVX and controls disappeared in decellularized strips.²⁹ These publications argue in favour of the importance of the intracellular component in ovariectomy-induced diastolic dysfunction that we showed to be ameliorated in OVX mice treated with finerenone.

Finerenone prevented the coronary endothelial dysfunction evidenced in OVX mice. Recently, a 4 week finerenone treatment has been shown to improve NO bioavailability in aortic rings and in mesenteric arteries from the Munich Wistar Frömter (MWF) rat model of chronic kidney disease.^{30,31} Borgo *et al.* reported that in isolated hearts of ovariectomized spontaneously hypertensive rats, the endothelium-dependent vasodilation in response to bradykinin was altered while it was improved in animals treated with estradiol and further improved by co-treatment with drospirenone, a progestogen with anti-aldosterone properties. Moreover, dihydroethidium fluorescence indicated that both treatments reduced the ovariectomy-associated increase in oxidative stress in the coronary wall.³² We previously reported that in chronic HF after myocardial infarction, impaired Ach-induced endothelium-dependent vasodilatation of isolated coronary arteries was improved in mice treated with finerenone, and we demonstrated that such improvement depended on a reduction of oxidative stress at the specific level of the arteries.³³ In the present study, ovariectomy-induced impaired endothelium-dependent vasodilatation was improved by finerenone, also including oxidative stress reduction in the coronary wall, because *ex vivo* NADPH oxidase inhibition ameliorated dilatation to the same extent in the arteries of OVX and OVX + Fine mice. These data highlight again the ability of finerenone to protect coronary function.

Several studies indicated that ovariectomy induces an increase in arterial pressure in rats and mice,^{12,34} including in spontaneously hypertensive rats, in which the pressure delta was not reduced by oestrogen therapy but only by combining estradiol and drospirenone.³² In our study, MR blockade with finerenone reduced the increase in blood pressure of OVX mice. Regarding vascular distensibility, DeMarco *et al.* reported a decrease in femoral arteries of female mice fed with a high-fat/high-sucrose diet while it was preserved in case of MR blockade with preventive spironolactone treatment.¹⁹ In our hands, although under anaesthesia with a non-evaluable degree of vasoplegia, ultrasound assessment suggested that finerenone allowed improving stiffness of femoral arteries in OVX mice.

Ovariectomy induces weight gain in which aldosterone–MR has been previously implicated. Indeed, Mook *et al.* showed that in ovariectomized rats, adrenalectomy attenuates weight increase³⁵ likely due to a decrease in aldosterone–MR interaction, because in non-adrenalectomized ovariectomized rats, Dagnault *et al.* reported that 3 weeks of treatment with the MRA RU-28318 limits fat gain unlike treatment with the glucocorticoid receptor antagonist RU-38486.³⁶ In our study, a 1 month finerenone treatment limited weight gain of OVX mice. This increase in body weight of OVX mice was accompanied by increased plasma leptin. Huby *et al.* showed that leptin induces an increase in adrenal secretion of aldosterone³⁷ and participates in increased blood pressure and endothelial dysfunction of obese hyperleptinaemic female mice via aldosterone-dependent mechanisms,³⁸ thus supporting the idea that MR blockade is as an interesting strategy in the context of obesity-associated cardiovascular disease in women.

In OVX mice, the increases in body weight, blood pressure, and fasted glycaemia suggested a pre-MetS state that was associated with decreased insulin sensitivity and decreased glucose tolerance, although we found no increase in plasmatic levels of triglycerides or total cholesterol in these animals fed with a standard diet. Ovariectomy in rats and mice has been used to evaluate many features associated with the MetS.³⁹ In another study, in ovariectomized rats fed with a standard diet, Olatunji *et al.* reported increases in plasmatic triglycerides and total cholesterol (CHO), encompassing increased low-density and decreased high-density lipoprotein-CHO (LDL-CHO and HDL-CHO), which were improved, except HDL-CHO, by a preventive spironolactone treatment.¹³ Recently, in mice with high-fat diet-induced obesity and decreased insulin sensitivity, Marzolla *et al.* showed that a preventive finerenone treatment improved metabolism through the activation of AMP-activated protein kinase, which, in turn, stimulated adipose triglyceride lipase activation, with subsequent increased expression of uncoupling protein-1 in brown adipocyte.⁴⁰ Our data show that a 1 month finerenone treatment, given 3 months after the ovariectomy, allowed improving previously established parameters of the MetS.

Ovariectomy in rodents and type 2 diabetes in human and rodents have been associated with myocardial mitochondrial dysfunction.^{25,26} In a study after 2.5 months of ovariectomy in rats, Rattanosopa *et al.* evidenced a decrease in complex I-driven ATP synthesis of isolated mitochondria, while basal mitochondrial ROS production was not affected.⁴¹ In the same extent, in the present study, no change was evidenced concerning mitochondrial ROS production, but subsarcolemmal mitochondria of OVX mice showed a decrease in ATP production that was improved after finerenone treatment.

Concerning the ability to exercise in post-menopausal condition, Machi *et al.* reported a reduction of the maximal speed during a running test, 2 months after ovariectomy in rats aged 24 months, which had diastolic dysfunction without

EF reduction.³⁴ Moreover, Mook *et al.* reported a rapid reduction of daily spontaneous activity of ovariectomized rats in a running wheel, during a study period of 5 to 33 post-operative days, with an enhancement of this phenomenon during the same consecutive period.³⁵ In the same extent, after 2 months of ovariectomy in mice, Do-Carmo *et al.* reported decreases in VO_2 and energy expenditure, with clear tendency for reduced spontaneous activity.⁴² In the present study, OVX mice showed reduced exercise capacity during an endurance or an acceleration test at race and reduced spontaneous activity. Unfortunately, we were unable to perform telemetry assessments, as it would be interesting to record treadmill heart rate and post-run heart rate recovery, because HFpEF is associated with chronotropic incompetence.⁴³ Nevertheless, when receiving finerenone treatment, the proportion of OVX mice able to complete the acceleration test on exertion increased. Furthermore, data evidenced improvement of spontaneous activity in OVX mice with finerenone treatment, likely to participate in the improvements of global metabolism and cardiovascular function.

Our data show that MR is a relevant target in models of ovariectomy-induced altered metabolic profile and cardiovascular dysfunction. In the same extent, Olatunji *et al.* reported an increase in plasma aldosterone level in OVX rats.¹³ After ovariectomy in a model of MetS derived from a cross between Dahl salt-sensitive and Zucker rats with an inactivating mutation in the leptin receptor (OVX-DS/obese), Murase *et al.* measured increased LV mRNA expressions of MR and its transcriptional target Sgk-1 (serum and glucocorticoid-activated kinase-1).¹¹ Estradiol treatment in these OVX-DS/obese rats attenuated hypertension and obesity but did not improve heart function because of exacerbated LV fibrosis and diastolic dysfunction, probably mediated by MR activation.¹¹ On the other hand, in mice with ovariectomy, Rouet-Benzineb *et al.* measured reduced LV protein expression of oestrogen receptor ER- α and ER- β while showing augmented protein expression of cardiac MR.¹²

Although a theoretical enhancement of ER activity could be hypothesized at least via indirect mechanisms, for example, counter-regulation of endogenous steroid hormone release by an unselective receptor profile as demonstrated for spironolactone⁴⁴ or recruitment of the transcriptional co-activator steroid receptor coregulatory-1 (Src-1), which is shared by most steroid hormone receptors, we have no reason to believe that such indirect mechanisms apply to the benefits of finerenone in the current study. Indeed, (i) finerenone does not have any detectable affinity for both ER α and ER β ,⁴⁵ and (ii) finerenone has been demonstrated to act as an inverse agonist for Src-1 recruitment (i.e. blocking Src-1 recruitment even in the absence of aldosterone) in a chromatin immunoprecipitation assay in a human kidney cell line as well as in rat cardiomyocytes.^{46,47}

In summary, MR was identified as an important pharmacological target for the potential treatment of diastolic dysfunction in post-menopausal women, and it would be prudent to investigate the novel non-steroidal MRA finerenone in HFpEF.

Conflict of interest

P.K. is a full-time employee of Bayer AG. The other authors report no conflicts of interest.

Funding

This work was supported by grants from the action 'Danièle Hermann—Women Heart' of the 'Fondation Recherche Cardio-Vasculaire' of the 'Institut de France' and from the European COST ADMIRE Network BM1301, by Bayer Pharma AG, and by the French Inserm (Institut national pour la santé et la recherche médicale).

Supporting information

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

Data S1. Supporting Information

Figure S1. Left Ventricular histology. (A) Representative photographs of PECAM-1 immunolabeled endothelial cells (lower photographs) and of Wheat-Germ-Agglutinin (WGA) staining for contouring cardiomyocytes (upper photographs), allowing determining: *i*) the cardiomyocytes mean-crossed sectional area (MCSA) (data for $n = 8$ CTL, $n = 8$ OVX and $n = 11$ OVX + Fine mice in Table 1 of the article), and *ii*) the ratio of the number of capillaries to the number of cardiomyocytes (data for $n = 9$ CTL, $n = 9$ OVX and $n = 11$ OVX + Fine mice in Table 1 of the article). (B) Representative photographs of collagen type-I (Coll-I) (lower photographs) and collagen type-III (coll-III) (upper-photographs) after co-immunolabeling, allowing calculating the mean percentage on interstitial collagen content in each group (data for $n = 7$ CTL, $n = 9$ OVX, and $n = 10$ OVX + Fine mice in Table 1 of the article).

Figure S2. Finerenone treatment improved ovariectomy-induced peripheral dysfunction. (A) Echography assessment of femoral artery diameter in function of the increase in blood flow (confident interval 95%) related to temperature-induced vasodilatation during stepwise progressive heating of the paw (CTL, solid line, $n = 10$; OVX, dotted line, $n = 5$; OVX + Fine, dashed line, $n = 12$). Statistics: multivariate analysis.

Table S1. Macrophages density in the myocardium. iNOS⁺+CD68⁺ cells, M₂ as CD206⁺+CD68⁺ double positive cells, Macrophages immuno-labeling: number per field of immuno-labeled macrophages (M_{total} as CD68⁺ cells, M₁ as

and M₀ as M_{total} - (M₁ + M₂) cells) (x20). NS.

References

- Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A, Palensky J, Wittes J, Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. *N Engl J Med* 1999; **341**: 709–717.
- Pitt B, Remme W, Zannad F, Neaton J, Martinez F, Roniker B, Bittman R, Hurley S, Kleiman J, Gatlin M, Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study Investigators. 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 JJV, Krum H, van Veldhuisen DJ, Swedberg K, Shi H, Vincent J, Pocock SJ, Pitt B, EMPHASIS-HF Study Group. Eplerenone in patients with systolic heart failure and mild symptoms. *N Engl J Med* 2011; **364**: 11–21.
- Pfeffer MA, Claggett B, Assmann SF, Boineau R, Anand IS, Clausell N, Desai AS, Diaz R, Fleg JL, Gordeev I, Heitner JF, Lewis EF, O'Meara E, Rouleau J-L, Probstfield JL, Shaburishvili T, Shah SJ, Solomon SD, Sweitzer NK, McKinlay SM, Pitt B. Regional variation in patients and outcomes in the Treatment of Preserved Cardiac Function Heart Failure With an Aldosterone Antagonist (TOPCAT) trial. *Circulation* 2015; **131**: 34–42.
- de Denus S, O'Meara E, Desai AS, Claggett B, Lewis EF, Leclair G, Jutras M, Lavoie J, Solomon SD, Pitt B, Pfeffer MA, Rouleau JL. Spironolactone metabolites in TOPCAT—new insights into regional variation. *N Engl J Med* 2017; **376**: 1690–1692.
- Bärfacker L, Kuhl A, Hillisch A, Grosser R, Figueroa-Pérez S, Heckroth H, Nitsche A, Ergüden J-K, Gielen-Haertwig H, Schlemmer K-H, Mittendorf J, Paulsen H, Platzeck J, Kolkhof P. Discovery of BAY 94-8862: a nonsteroidal antagonist of the mineralocorticoid receptor for the treatment of cardiorenal diseases. *ChemMedChem* 2012; **7**: 1385–1403.
- Pitt B, Kober L, Ponikowski P, Gheorghiadu M, Filippatos G, Krum H, Nowack C, Kolkhof P, Kim S-Y, Zannad F. 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* 2013; **34**: 2453–2463.
- Filippatos G, Anker SD, Böhm M, Gheorghiadu M, Køber L, Krum H, Maggioni AP, Ponikowski P, Voors AA, Zannad F, Kim S-Y, Nowack C, Palombo G, Kolkhof P, Kimmekamp-Kirschbaum N, Pieper A, Pitt B. A randomized controlled study of finerenone vs. eplerenone in patients with worsening chronic heart failure and diabetes mellitus and/or chronic kidney disease. *Eur Heart J* 2016; **37**: 2105–2114.
- Yanes LL, Romero DG, Iliescu R, Zhang H, Davis D, Reckelhoff JF. Postmenopausal hypertension: role of the renin-angiotensin system. *Hypertension* 2010; **56**: 359–363.
- Wang H, Jessup JA, Zhao Z, da Silva J, Lin M, MacNamara LM, Ahmad S, Chappell MC, Ferrario CM, Groban L. Characterization of the cardiac renin angiotensin system in oophorectomized and estrogen-replete mRen2.Lewis rats. *PLoS ONE* 2013; **8**: e76992.
- Murase T, Hattori T, Ohtake M, Nakashima C, Takatsu M, Murohara T, Nagata K. Effects of estrogen on cardiovascular injury in ovariectomized female DahlS.Z-Lepr (fa)/Lepr (fa) rats as a new animal model of metabolic syndrome. *Hypertension* 2012; **59**: 694–704.
- Rouet-Benzineb P, Merval R, Polidano E. Effects of hypoestrogenism and/or hyperaldosteronism on myocardial remodeling in female mice. *Physiol Rep* 2018; **6**: e13912.
- Olatunji LA, Adeyanju OA, Michael OS, Usman TO, Tostes RC, Soladoye AO. Ameliorative effect of low-dose spironolactone on obesity and insulin resistance is through replenishment of estrogen in ovariectomized rats. *Can J Physiol Pharmacol* 2019; **97**: 65–74.
- Davel AP, Lu Q, Moss ME, Rao S, Anwar IJ, DuPont JJ, Jaffe IZ. Sex-specific mechanisms of resistance vessel endothelial dysfunction induced by cardiometabolic risk factors. *J Am Heart Assoc* 2018; **7**: e007675.
- Merz AA, Cheng S. Sex differences in cardiovascular ageing. *Heart Br Card Soc* 2016; **102**: 825–831.
- Levy D, Larson MG, Vasan RS, Kannel WB, Ho KK. The progression from hypertension to congestive heart failure. *JAMA* 1996; **275**: 1557–1562.
- Sullivan JC. Sex and the renin-angiotensin system: inequality between the sexes in response to RAS stimulation and inhibition. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008; **294**: R1220–R1226.
- Kannel WB, Hjortland M, Castelli WP. Role of diabetes in congestive heart failure: the Framingham study. *Am J Cardiol* 1974; **34**: 29–34.
- DeMarco VG, Habibi J, Jia G, Aroor AR, Ramirez-Perez FI, Martinez-Lemus LA, Bender SB, Garro M, Hayden MR, Sun Z, Meininger GA, Manrique C, Whaley-Connell A, Sowers JR. Low-dose mineralocorticoid receptor blockade prevents Western diet-induced arterial stiffening in female mice. *Hypertension* 2015; **66**: 99–107.
- Gami AS, Witt BJ, Howard DE, Erwin PJ, Gami LA, Somers VK, Montori VM. Metabolic syndrome and risk of incident cardiovascular events and death: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *J Am Coll Cardiol* 2007; **49**: 403–414.
- Barrett-Connor E. Sex differences in coronary heart disease. why are women so superior? The 1995 Ancel Keys Lecture. *Circulation* 1997; **95**: 252–264.
- Khosla N, Kalaitzidis R, Bakris GL. Predictors of hyperkalemia risk following hypertension control with aldosterone blockade. *Am J Nephrol* 2009; **30**: 418–424.
- McMurray JJV, Jackson AM, Lam CSP, Redfield MM, Anand IS, Ge J, Lefkowitz MP, Maggioni AP, Martinez F, Packer M, Pfeffer MA, Pieske B, Rizkala AR, Sabarwal SV, Shah AM, Shah SJ, Shi VC, van Veldhuisen DJ, Zannad F, Zile MR, Cikes M, Goncalvesova E, Katova T, Kosztin A, Lelonek M, Sweitzer N, Vardeny O, Claggett B, Jhund PS, Solomon SD. Effects of sacubitril-valsartan versus valsartan in women compared with men with heart failure and preserved ejection fraction: insights from PARAGON-HF. *Circulation* 2020; **141**: 338–351.
- Merrill M, Sweitzer NK, Lindenfeld J, Kao DP. Sex differences in outcomes and responses to spironolactone in heart failure with preserved ejection fraction: a secondary analysis of TOPCAT trial. *JACC Heart Fail* 2019; **7**: 228–238.
- Bugger H, Abel ED. Molecular mechanisms for myocardial mitochondrial dysfunction in the metabolic syndrome. *Clin Sci (Lond)* 2008; **114**: 195–210.
- Ribeiro Junior RF, Rodrigues PL, Morra EA, Ronconi KS, do Val Lima PR, Porto ML, Simões MR, Vassallo DV, Figueiredo SG, Stefanon I. Estrogen regulates spatially distinct cardiac mitochondrial subpopulations. *Mitochondrion* 2017; **35**: 87–96.
- Bonnard B, Pieronne-Deperrois M, Djerada Z, Elmoghrabi S, Kolkhof P, Ouvrard-Pascaud A, Mulder P, Jaisser F, Messaoudi S. Mineralocorticoid receptor

- antagonism improves diastolic dysfunction in chronic kidney disease in mice. *J Mol Cell Cardiol* 2018; **121**: 124–133.
28. Bupha-Intr T, Wattanapermpool J. Regulatory role of ovarian sex hormones in calcium uptake activity of cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; **291**: H1101–H1108.
 29. Farré N, Jorba I, Torres M, Falcones B, Martí-Almor J, Farré R, Almendros I, Navajas D. Passive stiffness of left ventricular myocardial tissue is reduced by ovariectomy in a post-menopause mouse model. *Front Physiol* 2018; **9**: 1545.
 30. González-Blázquez R, Somoza B, Gil-Ortega M, Martín Ramos M, Ramiro-Cortijo D, Vega-Martín E, Schulz A, Ruilope LM, Kolkhof P, Kreutz R, Fernández-Alfonso MS. Finerenone attenuates endothelial dysfunction and albuminuria in a chronic kidney disease model by a reduction in oxidative stress. *Front Pharmacol* 2018; **9**: 1131.
 31. Gil-Ortega M, Vega-Martín E, Martín-Ramos M, González-Blázquez R, Pulido-Olmo H, Ruiz-Hurtado G, Schulz A, Ruilope LM, Kolkhof P, Somoza B, Kreutz R, Fernández-Alfonso MS. Finerenone reduces intrinsic arterial stiffness in Munich Wistar Frömter rats, a genetic model of chronic kidney disease. *Am J Nephrol* 2020; **51**: 294–303.
 32. Borgo MV, Claudio ERG, Silva FB, Romero WG, Gouvea SA, Moyses MR, Santos RL, Almeida SA, Podratz PL, Graceli JB, Abreu GR. Hormonal therapy with estradiol and drospirenone improves endothelium-dependent vasodilation in the coronary bed of ovariectomized spontaneously hypertensive rats. *Braz J Med Biol Res Rev Bras Pesqui Medicas E Biol* 2016; **49**: e4655.
 33. Gueret A, Harouki N, Favre J, Galmiche G, Nicol L, Henry J-P, Besnier M, Thuille C, Richard V, Kolkhof P, Mulder P, Jaisser F, Ouvrard-Pascaud A. Vascular smooth muscle mineralocorticoid receptor contributes to coronary and left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *Hypertension* 2016; **67**: 717–723.
 34. Machi JF, da Silva Dias D, Freitas SC, de Moraes OA, da Silva MB, Cruz PL, Mostarda C, Salemi VM, Morris M, De Angelis K, Irigoyen MC. Impact of aging on cardiac function in a female rat model of menopause: role of autonomic control, inflammation, and oxidative stress. *Clin Interv Aging* 2016; **11**: 341–350.
 35. Mook DG, Kenney NJ, Roberts S, Nussbaum AI, Rodier WI. Ovarian-adrenal interactions in regulation of body weight by female rats. *J Comp Physiol Psychol* 1972; **81**: 198–211.
 36. Dagnault A, Deshaies Y, Richard D. The effects of RU 38486 and RU 28318 on energy balance of ovariectomized rats. *Ann N Y Acad Sci* 1994; **746**: 418–420.
 37. Huby A-C, Antonova G, Groenendyk J, Gomez-Sanchez CE, Bollag WB, Filosa JA, Belin de Chantemèle EJ. Adipocyte-derived hormone leptin is a direct regulator of aldosterone secretion, which promotes endothelial dysfunction and cardiac fibrosis. *Circulation* 2015; **132**: 2134–2145.
 38. Huby AC, Otvos L Jr, de Belin Chantemèle EJ. Leptin induces hypertension and endothelial dysfunction via aldosterone-dependent mechanisms in obese female mice. *Hypertension* 2016; **67**: 1020–1028.
 39. Medina-Contreras J, Villalobos-Molina R, Zarain-Herzberg A, Balderas-Villalobos J. Ovariectomized rodents as a menopausal metabolic syndrome model. *A minireview Mol Cell Biochem* 2020; **475**: 261–276.
 40. Marzolla V, Feraco A, Gorini S, Mammi C, Marrese C, Mularoni V, Boitani C, Lombès M, Kolkhof P, Ciriolo MR, Armani A, Caprio M. The novel non-steroidal MR antagonist finerenone improves metabolic parameters in high-fat diet-fed mice and activates brown adipose tissue via AMPK-ATGL pathway. *FASEB J* 2020; **34**: 12450–12465.
 41. Rattanasopa C, Phungphong S, Wattanapermpool J, Bupha-Intr T. Significant role of estrogen in maintaining cardiac mitochondrial functions. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2015; **147**: 1–9.
 42. Do Carmo JM, da Silva AA, Moak SP, Browning JR, Dai X, Hall JE. Increased sleep time and reduced energy expenditure contribute to obesity after ovariectomy and a high fat diet. *Life Sci* 2018; **212**: 119–128.
 43. Phan TT, Shivu GN, Abozguia K, Davies C, Nassimizadeh M, Jimenez D, Weaver R, Ahmed I, Frenneaux M. Impaired heart rate recovery and chronotropic incompetence in patients with heart failure with preserved ejection fraction. *Circ Heart Fail* 2010; **3**: 29–34.
 44. Levy J, Burshell A, Marbach M, Aflalo L, Glick SM. Interaction of spironolactone with oestradiol receptors in cytosol. *J Endocrinol* 1980; **84**: 371–379.
 45. Pitt B, Filippatos G, Gheorghiadu M, Kober L, Krum H, Ponikowski P, Nowack C, Kolkhof P, Kim S-Y, Zannad F. Rationale and design of ARTS: a randomized, double-blind study of BAY 94-8862 in patients with chronic heart failure and mild or moderate chronic kidney disease. *Eur J Heart Fail* 2012; **14**: 668–675.
 46. Amazit L, Le Billan F, Kolkhof P, Lamribet K, Viengchareun S, Fay MR, Khan JA, Hillisch A, Lombès M, Rafestin-Oblin M-E, Fagart J. 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.
 47. Grune J, Beyhoff N, Smeir E, Chudek R, Blumrich A, Ban Z, Brix S, Betz IR, Schupp M, Foryst-Ludwig A, Klopffleisch R, Stawowy P, Houtman R, Kolkhof P, Kintscher U. Selective mineralocorticoid receptor cofactor modulation as molecular basis for finerenone's antifibrotic activity. *Hypertension* 2018; **71**: 599–608.

9-APPENDICES

9.1- Supplemental methods

Ovariectomy

Mice were anesthetized by intraperitoneal injection (0.01mL/g) of xylazine/ketamine (0.2mL xylazine Rompun 2%, Bayer + 1mL ketamine, Imalgene + 8.8mL physiological serum). Anesthesia was maintained by isoflurane inhalation (1-2%). After double dorsolateral incision and separation of the musculature, the ovarian fat pad was put out, the region below the ovaries was clamped, knotted above and below and removed. The ovarian artery was knotted above and below and sectioned. Musculature and skin were sewed. Buprenorphine (117.66 g.mL⁻¹, Axience) was administered at reawakening and 6h later. After sacrifice of mice, the success of the ovariectomy was confirmed by the weighing of atrophied uteri.

Echography

Measurements were done using Vivid7 ultrasound (GE-Healthcare, France) with a linear 14 MHz probe on mice anesthetized with isoflurane inhalation (1.5%). Mice were applied a depilatory agent and put on a heated examination table equipped with electrocardiogram electrodes. Acquisitions in Time-Movement mode were done in parasternal short axis view at the LV papillary level. LV wall thicknesses, systolic and diastolic diameters were measured and FS (%) was calculated as: (diastolic diameter – systolic diameter / diastolic diameter x 100). Velocity Time Integral (VTI, cm) was measured in pulse-Doppler mode at the pulmonary artery, enabling to calculate both stroke volume (SV, mL.beat⁻¹, [VTI_{aortic} x Pi x (D_{aortic}²/4)]) and cardiac output (CO, mL.min⁻¹, SV x HR). Temperature-mediated flow dilation was measured on the left superficial femoral artery. A tube connected to a water-bath was attached to the paw with a temperature probe and measurements assessed at 34, 37, 40 and 43°C. Artery diameter was acquired in B-mode and blood flow and HR in Doppler mode. Data were analyzed using VevoLab3100 software. Femoral stroke volume (mL.beat⁻¹) was calculated as $SV_{fem} = VTI \text{ (mm)} \times \pi \times (\text{diameter (mm)}^2/4)/100$ and Femoral Artery Output (FAO, mL.min⁻¹) as $FAO = 60 \times SV_{fem} \times HR$. Shear

Stress (dynes.cm⁻²) was calculated as Shear stress = $(4\mu \times \text{FAO}/60) / (\pi \times (\text{Diameter (cm)}/2)^3)$ with viscosity $\mu=0.0021$.

Plethysmography

Systolic blood pressure (SBP) was measured in conscious mice by the tail-cuffed method as previously described (CODA, Kent Scientific Corporation, USA)³⁰⁰.

PV-Loop

LV hemodynamic was assessed in anesthetized mice (Inactine, 10 mg.kg⁻¹, IP). The carotid artery was cannulated with a pressure-volume catheter (SPR839, Millar Instruments, USA) to record arterial pressure and heart rate, after which the catheter was advanced into the LV. Pressure-volume loops were obtained at baseline and during loading by gently occluding the abdominal aorta with a cotton swab. LV end-systolic and end-diastolic pressures were measured, and LV end-systolic and end-diastolic pressure-volume relations were calculated with LabChart software (AD-Instruments, New-Zealand).

Isolated coronary function

Endothelial function was assessed in isolated coronary artery removed from heart placed in cold oxygenated Krebs buffer. A 1.5-2mm segment of interseptal coronary artery (internal diameter<120 μ m) was mounted on a myograph (DMT, Aarhus, Denmark). After normalization response to acetylcholine (10^{-9} to 3.10^{-5} mol.L⁻¹) and endothelium-independent relaxation to sodium nitroprusside (SNP) (10^{-9} to 3.10^{-5} mol.L⁻¹) were obtained in segments pre-contracted with serotonin 10^{-5} mol.L⁻¹). In some experiments, response to acetylcholine was assessed after 35 min incubation with the NO synthase inhibitor L-NG-nitro-arginine (L-NNA, 10^{-4} mol.L⁻¹) or with nicotinamide-adenine-dinucleotide-phosphatase (NADPH)-oxidase inhibitor (apocynin, 10^{-4} mol.L⁻¹).

Myocardial oxidative stress

LV reactive oxygen species (ROS) production was determined by electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy, as previously described³⁰¹. Snap frozen LV were homogenized and incubated at

37°C for 15min in 50mmol.L⁻¹ phosphate buffer containing 25µmol.L⁻¹ deferioxamine, 5µmol.L⁻¹, and 500 diethyldithiocarbamate µmol/L 1-hydroxy-3-methocarbonyl-2,2,5,5-tetramethyl pyrrolidine hydrochloride (CMH, Noxygen, Hamburg, Germany). The oxidation of CMH into the paramagnetic nitroxyde CM•, driven mainly by superoxide and peroxyxynitrite reactions, was measured by EPR. Tissues were introduced into an insulin syringe and frozen in liquid nitrogen. Spectra were recorded at 77K in a liquid nitrogen cooled dewar using an MS200 spectrometer (Magnetech, Berlin, Germany) with the following acquisition parameters : microwave power : 20 mW, microwave frequency : 9.54GHz, modulation amplitude : 5G, modulation frequency : 100KHz, gain 2x10², sweep time 120s 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.

Mitochondrial isolation, ATP synthesis and ROS production

In order to evaluate ATP synthesis and mitochondrial ROS production, cardiac subsarcolemmal (SSM) and interfibrillar (IFM) mitochondria were isolated according to Palmer *et al.*²⁸⁶. Freshly dissected LV samples were homogenized in buffer-A (220mM mannitol, 70mM sucrose, 5mM Mops, 2mM EGTA (ethylene glycol-bis(aminoethyl ether) tetraacetic acid), 0.2% bovine serum albumin (BSA), pH7.4, 4°C) and centrifuged (500g, 10min, 4°C). Subsarcolemmal mitochondria (SSM) were obtained by pipetting supernatants and centrifuging them (3000g, 10min, 4°C). Pellets obtained during SSM isolation were resuspended in buffer-B (100mM KCl, 52mM Mops, 2mM EGTA, 0.2% BSA, pH7.4, 4°C) containing Nagarse (5mg.g⁻¹ tissue) and immediately homogenized with a dounce-type homogenizer and centrifuged (500g, 5min, 4°C). Pellets were resuspended with Buffer-B and washed twice. Interfibrillar mitochondria (IFM) were obtained by pooling resulting supernatants and centrifuging them (3000g, 10min, 4°C). SSM and IFM pellets were resuspended in buffers-A and -B respectively (without BSA and with 0.5 EGTA). Then, isolated mitochondria were incubated in the respiration buffer (10min, 25°C) with 10mM glutamate and 4mM malate under continuous stirring to eliminate sample residual ADP. Subsequently, ATP production was initiated by adding 2mM ADP and isolated mitochondria were sampled every 20s to 180s to extract ATP by 500µL perchloric acid (1N). Sample were centrifuged (10,000 g, 5min) and supernatants were neutralized by an adapted volume of

5M K₂CO₃. The rate of ATP production in either SSM or IFM was determined using the ATP bioluminescence HSII kit (Roche). Pellets obtained after the first centrifugation were sampled for the protein assay and the results were expressed as nmol ATP/mg proteins. ROS production was evaluated as previously described²⁸⁷, in mitochondrial preparations by EPR spectroscopy using glutamate (10 mM), malate (4 mM) and ADP (2mM).

Mitochondrial enzymatic activities

LV samples were homogenized in a lysis buffer (5mM Tris-HCl, NaCl, 0.9, 4°C) and centrifuged (600g, 10min, 4°C). Aconitase activity was assessed by spectrophotometry in measuring the formation of cis-aconitate for isocitrate at 240nm in a reaction mixture (50mM Tris-HCL, 30mM isocitrate, 0.6mM MnCl₂ (pH7.4) at 37°C³⁰². Fumarase activity was assessed using 50mM L-malate, 50mM KH₂PO₄, pH7.4 at 37°C according to Bradshaw *et al.*²⁸⁸.

Histology

Hearts were removed, LV were separated, weighted, and snap frozen in liquid nitrogen. LV Collagen I and III density was determined on 6µm slices after BSA blockade followed by 1h incubation with primary antibodies (Collagen-I Abcam ab34710 (Rabbit) at dilution x1/1000 and collagen-III α1 NovusBio NPB126547 (Goat) at dilution x1/500). Slices were then washed 3x5 min in PBS-1X and incubated 30min with secondary antibodies (Donkey anti-rabbit coupled to FITC, Jackson-ImmunoResearch 711-095-152, at dilution x1/400 and Donkey anti-Goat Dylight-550, Interchim A50-201D3 at dilution x1/400). Cardiomyocytes count and mean cross-sectional area (MCSA) and capillary density were obtained from LV sections after acetone bath 10min and rehydration in PBS-1X 10min before blockage 10min with BSA 3%. Sections were then incubated for 1h with a primary rat anti-mouse CD31 (BD 553371 at dilution x1/100) for the labeling of endothelial cells. Sections were washed 3x5 min with PBS-1X and incubated 30min in the dark with the secondary antibody (donkey anti-rat coupled to Cy3, Jackson-ImmunoResearch 712-166-153 at dilution x1/400). Sections were washed again 3x5min with PBS-1X and incubated with FITC-WGA for 30min (at dilution x1/100). Sections were washed as previously, rinsed in H₂O, and mounted in Vectashiel. For detection of CD68⁺ total macrophages and

CD206⁺ (M₂ like) and iNOS⁺ (M₁ type) macrophage subpopulations, sections were incubated 1h at room temperature with primary antibodies rabbit antimouse CD206 (Abcam, Ab64693) at dilution x1/2500 and rat antimouse iNOS (Biolegend, 696802) at dilution x1/500, in the 1% BSA-PBS buffer with 0.3% saponin. Sections were washed 3x5 min in PBS and incubated 30 min in the dark at room temperature with secondary antibodies donkey antirabbit-Cy3 (Jackson ImmunoResearch, 711-605-152) at dilution x1/400 and donkey antirat AF488 (Jackson ImmunoResearch, 712-546-153) at dilution x1/400 in the 1% BSA-PBS buffer with saponin. Sections were washed 3x5 min in PBS. Endogenous biotin and avidin were blocked (e.g., Dako biotin blocking kit, 10 min each). Sections were then incubated 1h at room temperature with primary antibodies biotinylated rat antimouse CD68 (Miltenyi, 130-102-025) at dilution x1/200 in 1% BSA-PBS with saponin. Sections were washed 3x5 min in PBS and incubated 30 min in the dark at room temperature with secondary reagents SA-Cy5 (A647) (Interchim, FP-CA5640, FP-YE5081) at dilution x1/1500 in 1% BSA-PBS saponin buffer. Sections were washed 3x5 min in PBS and mounted in Vectashield. Image analysis were done using ImageJ.

Treadmill tests and energy metabolism

Mice were accustomed to forced running on treadmill (slope 5%, electric shock 6mA, 3Hz) (3/6 Treadmill, Columbus Instruments, Ohio, USA) for 2 consecutive days until they reach a speed of 15m.min⁻¹ during 10min. Mice were submitted to an endurance test (speed increment: every 30sec for 2.5min until reaching 25m.min⁻¹, maintained for the next 57min) or to a stress test (stepwise speed increment: 2m.min⁻¹ every 2min from 13 to 35m.min⁻¹), with an exclusion criterion of ≥ 20 shocks.min⁻¹. Energy metabolism was performed using combined indirect calorimetry system equipped with running wheel to assess continuous monitoring of VO₂, VCO₂, energy expenditure, and locomotor activity. Mice were individually housed and acclimated to the air-tight cages equipped with running wheel (PhenoMaster, TSE Systems GmbH, Bad Homburg, Germany) 8 hours before experimental measurements, with free access to food and water ad libitum. Subsequently, volumes of oxygen consumption and volumes of CO₂ production were measured every 10 minutes for a total of two consecutive periods of 24 h to determine VO₂ and VCO₂, and energy expenditure (EE = VO₂ x

$(3.815 + (1.232 \times (VCO_2/VO_2))) \times 4.1868$). Home-cage locomotor activity (horizontal and vertical) was evaluated by a multidimensional infrared light beam system.

Body composition

Body composition, providing fat and lean mass was assessed in vigil mice by echo-MRI (EMR-185, Echo-MRI, USA). Calibration is done with canola oil; whose chemical composition is similar to rodents. Parameters were normalized to mice weight (%).

Insulin Tolerance Test (ITT) and Oral Glucose Tolerance Test (OGTT)

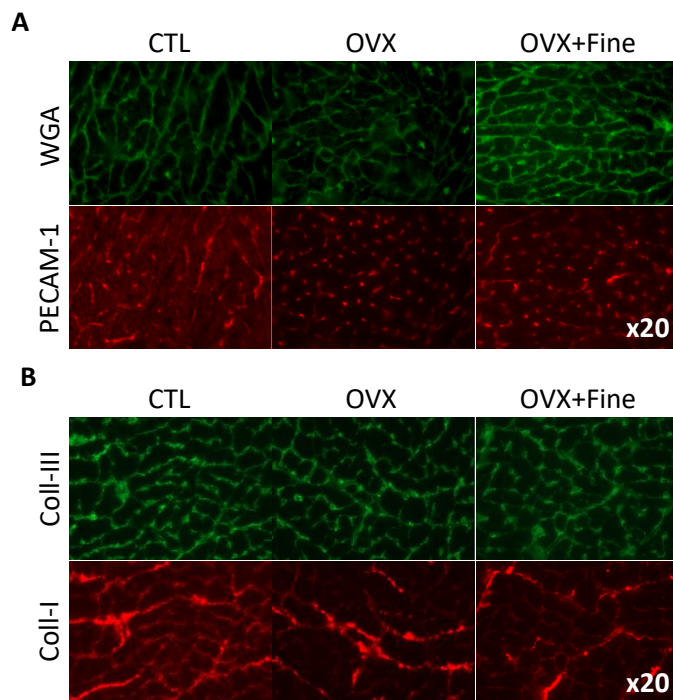
Mice were fasted overnight and then administered human insulin (Actrapid, Novo Nordisk, France) by intraperitoneal injection (0.75 u.kg^{-1}) or glucose by oral gavage at dose (2.0 u.kg^{-1}). Glycaemia is measured before injection, and then after 15, 30, 45, 60, 90 and 120 minutes). A blood drop collected after tail incision is put on reactive strips (Glu-Test Strips, Nova Biomedicals, UK) and read by glucometer (Stat Strip Xpress-I, Nova Biomedicals, UK).

	CTL	OVX	OVX+Fine
<i>Histology, immuno-labeling</i>			
M ₀ cells, nb/field	2.3 ± 1.1 (n=6)	1.9 ± 0.4 (n=7)	1.1 ± 0.4 (n=7)
M ₁ cells, nb/field	0.3 ± 0.2 (n=6)	0.2 ± 0.1 (n=7)	0.2 ± 0.1 (n=7)
M ₂ cells, nb/field	10.3 ± 0.8 (n=6)	13.3 ± 1.4 (n=7)	11.2 ± 1.5 (n=7)
M _{total} cells, nb/field	12.8 ± 0.9 (n=6)	15.4 ± 1.5 (n=7)	12.5 ± 1.6 (n=7)

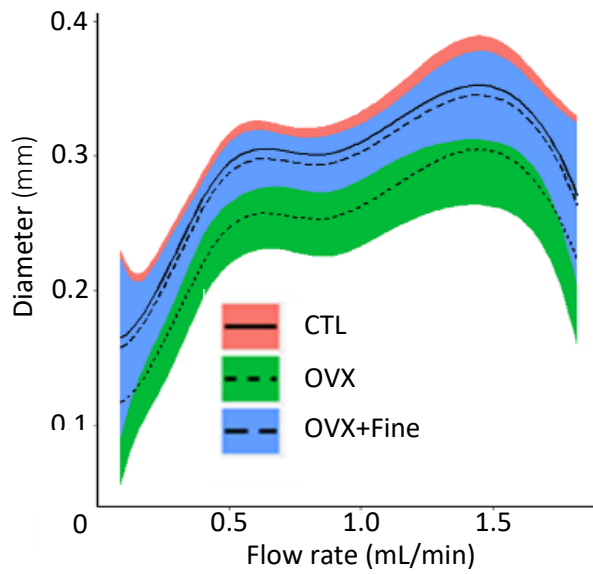
Supplemental Table 1: macrophages density in the myocardium. *Macrophages immuno-*

labeling: number per field of immuno-labeled macrophages (M_{total} as CD68⁺ cells, M₁ as iNOS⁺+CD68⁺ cells, M₂ as CD206⁺+CD68⁺ double positive cells, and M₀ as M_{total} - (M₁+M₂) cells) (x20). NS.

Supplemental figure 1



Supplemental figure 2



Conclusion

En conclusion, cette étude met en évidence l'intérêt thérapeutique potentiel de la finérénone dans un contexte d'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée associée à la postménopause.

Chapitre 4. Discussion générale

A ce jour, aucun traitement pharmacologique n'a montré de bénéfices nets pour la prise en charge des patients atteints d'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée associée à l'obésité ou au syndrome métabolique. A travers ces deux études pré-cliniques, l'une portant sur un modèle de souris présentant une dysfonction diastolique induite par un régime riche en gras et l'autre portant sur un modèle de souris présentant une dysfonction diastolique induite par l'ovariectomie, nous avons montré l'efficacité d'un traitement par la finérénone, un antagoniste sélectif du récepteur minéralocorticoïde, sur la dysfonction diastolique.

Ces deux modèles d'insuffisance cardiaque ont mis en évidence l'effet bénéfique de la finérénone sur les fonctions cardiovasculaires et rénales, dans un contexte d'obésité ou de postménopause. Ces travaux contribuent à montrer le rôle de la suractivation du SRAA dans la mise en place et la progression de l'insuffisance cardiaque.

La première étude a permis de montrer que le traitement par la finérénone, associé à une normalisation du régime alimentaire, permet une amélioration de la fonction cardiaque, et particulièrement de la fonction diastolique, ainsi que la fonction coronaire. Elle montre également que ces effets sont médiés par l'effet de la finérénone sur la voie de signalisation de l'insuline via l'action de la leptine et de la PTP1B et d'autre part par l'effet anti-fibrotique du traitement.

L'augmentation de la leptine observée pour les souris HFD dans notre étude est diminuée par la normalisation du régime alimentaire. De manière intéressante, Faulkner *et al.* ont montré dans des modèles *in vivo* que la leptine induit une production d'aldostérone. Ainsi, l'amélioration de la fonction cardiovasculaire dans notre modèle pourrait être médiée par la normalisation du régime alimentaire, induisant une perte d'adipocytes et donc une diminution observée de la concentration en leptine plasmatique, qui pourrait contribuer à diminuer la production d'aldostérone et ainsi l'activation du RM. De plus, la leptine agissant sur l'axe insuline-glucose, la diminution de la concentration en leptine plasmatique observée pour les souris HS et HS+Fine contribue à expliquer l'amélioration de la résistance à l'insuline. Ces résultats tendent à montrer que les améliorations métaboliques et cardiaques observées dans

notre modèle pourraient en partie être liée à la diminution de la production de leptine (Figure 23).

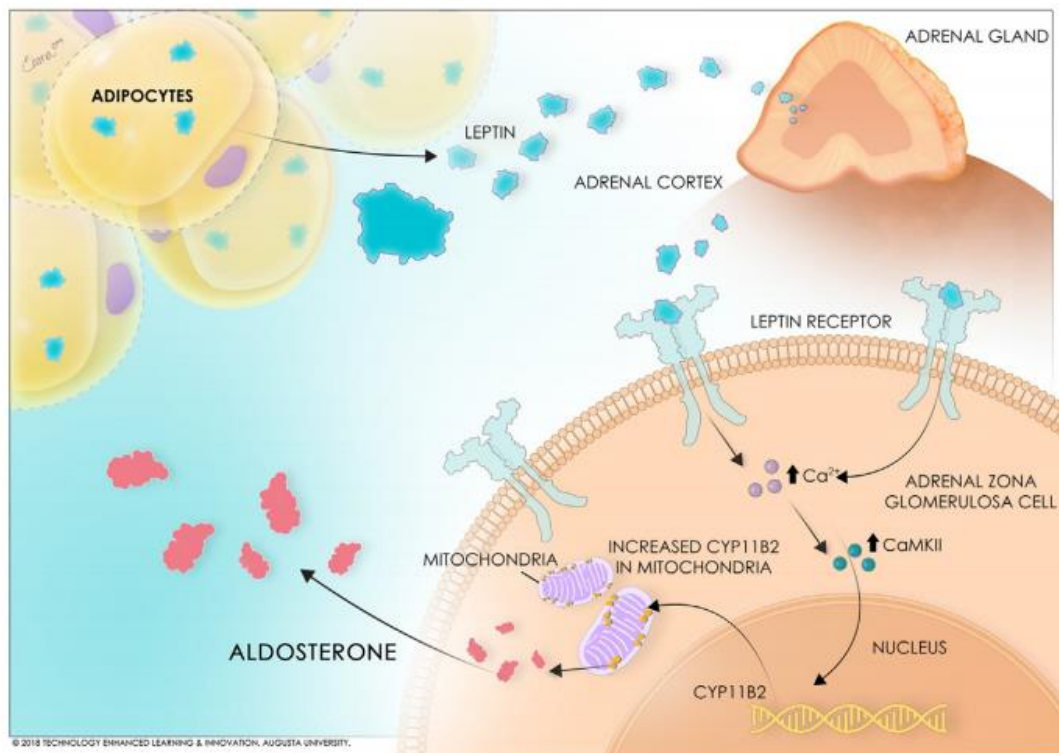


Figure 25. Représentation schématique de la stimulation par la leptine de la production d'aldostérone par les glandes surrénales

La seconde étude a permis de montrer que le traitement par la finérénone dans un contexte d'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée induite par l'ovariectomie permet une amélioration de la fonction cardiaque, et particulièrement de la fonction diastolique, médiée par une amélioration de la fonction coronaire.

Ensemble, ces deux études soulignent l'importance dans ces deux modèles de l'antagonisme du récepteur minéralocorticoïde dans un contexte d'insuffisance cardiaque associée à des altérations du métabolisme. La finérénone ayant une meilleure sélectivité pour le RM que la spironolactone ou l'eplerénone, son utilisation permet une diminution des effets secondaires, principalement médiés par la fixation de ces antagonistes sur les récepteurs stéroïdiens. De plus, cette meilleure sélectivité permet l'obtention d'une efficacité cardiovasculaire à une posologie plus faible, ce qui permet de traiter les patients sans diminuer la pression artérielle systémique. De surcroît, les effets bénéfiques sur l'insuffisance rénale chronique montrés par la finérénone (FIDELIO-DKD ; 2020) ont mené à l'essai clinique FIGARO-DKD, dont l'objectif était d'évaluer l'intérêt de la finérénone sur les événements

cardiovasculaires et rénaux chez les patients ayant une insuffisance rénale chronique modérée à moyenne et un diabète de type 2. Au regard de nos résultats concernant la voie de signalisation de l'insuline, il serait intéressant d'approfondir l'étude de ces voies métaboliques pour caractériser plus finement l'effet de la finérénone.

Par ailleurs, l'échappement de l'aldostérone au traitement par inhibiteur de l'enzyme de conversion reste un problème majeur. En effet, si ce traitement permet une diminution dans un premier temps du taux d'aldostérone circulant, celui-ci remonte après quelques mois de traitement, voire peut dépasser sa valeur initiale dans un contexte de traitement antihypertensif¹⁵⁸. Ces données suggèrent que l'échappement de l'aldostérone au traitement par inhibiteur de l'enzyme de conversion est lié au fait qu'elle ne dépend pas seulement du SRAA, mais que sa sécrétion est aussi médiée par le taux d'hormone adrénocorticotrope, par la kaliémie et par le facteur natriurétique auriculaire. Dans ce contexte, il serait intéressant d'évaluer si l'antagonisme du RM par la finérénone permettrait d'obtenir des résultats plus prolongés qu'avec l'utilisation de la spironolactone.

Enfin, il serait intéressant d'étendre ce champ de recherche à un modèle d'insuffisance cardiaque plus sévère afin d'investiguer davantage les mécanismes d'action de la finérénone. Une comparaison avec des souris *ob/ob* traitées à la finérénone permettrait également de fournir un point de comparaison intéressant avec nos résultats. Pour terminer, il serait intéressant d'étudier davantage le stress oxydatif et son rôle dans la dysfonction vasculaire et endothéliale en partie médiée par la diminution de la biodisponibilité en •NO pour mieux comprendre le potentiel effet de la finérénone à ce niveau.

Pour terminer, l'essai clinique EMPEROR, incluant 3 730 patients avec une insuffisance cardiaque NYHA de classe II, III ou IV et avec une fraction d'éjection $\leq 40\%$ traités par de l'empagliflozin, un inhibiteur sélectif du cotransporteur sodium-glucose, ou un placebo, a montré une diminution de la mortalité cardiovasculaire et de l'hospitalisation pour insuffisance cardiaque, ouvrant ainsi de nouvelles perspectives dans le traitement de l'insuffisance cardiaque³⁰³.

Conclusion

Nos travaux ont mis en évidence l'effet bénéfique de la finérénone sur la dysfonction diastolique associée au syndrome métabolique ou à la ménopause. Nos résultats suggérant l'implication des voies de la PTP1B et du phospholamban ouvrent des perspectives pour mieux comprendre le mécanisme d'action de la finérénone.

Revue bibliographique

1. McMurray, J. J. V. *et al.* ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur. Heart J.* **33**, 1787–1847 (2012).
2. Fan, Y. S. *et al.* The human mineralocorticoid receptor gene (MLR) is located on chromosome 4 at q31.2. *Cytogenet. Cell Genet.* **52**, 83–84 (1989).
3. Morrison, N., Harrap, S. B., Arriza, J. L., Boyd, E. & Connor, J. M. Regional chromosomal assignment of the human mineralocorticoid receptor gene to 4q31.1. *Hum. Genet.* **85**, 130–132 (1990).
4. Pascual-Le Tallec, L. & Lombès, M. The mineralocorticoid receptor: a journey exploring its diversity and specificity of action. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* **19**, 2211–2221 (2005).
5. Faresse, N., Ruffieux-Daidie, D., Salamin, M., Gomez-Sanchez, C. E. & Staub, O. Mineralocorticoid receptor degradation is promoted by Hsp90 inhibition and the ubiquitin-protein ligase CHIP. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **299**, F1462-1472 (2010).
6. Binart, N., Lombès, M. & Baulieu, E. E. Distinct functions of the 90 kDa heat-shock protein (hsp90) in oestrogen and mineralocorticosteroid receptor activity: effects of hsp90 deletion mutants. *Biochem. J.* **311 (Pt 3)**, 797–804 (1995).
7. Pratt, W. B. & Toft, D. O. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr. Rev.* **18**, 306–360 (1997).
8. Viengchareun, S. *et al.* The mineralocorticoid receptor: insights into its molecular and (patho)physiological biology. *Nucl. Recept. Signal.* **5**, e012 (2007).
9. Faulkner, J. L. & Belin de Chantemèle, E. J. Leptin and Aldosterone. *Vitam. Horm.* **109**, 265–284 (2019).

10. Patel, S., Rauf, A., Khan, H. & Abu-Izneid, T. Renin-angiotensin-aldosterone (RAAS): The ubiquitous system for homeostasis and pathologies. *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* **94**, 317–325 (2017).
11. Galigniana, M. D., Erlejman, A. G., Monte, M., Gomez-Sanchez, C. & Piwien-Pilipuk, G. The hsp90-FKBP52 complex links the mineralocorticoid receptor to motor proteins and persists bound to the receptor in early nuclear events. *Mol. Cell. Biol.* **30**, 1285–1298 (2010).
12. Hultman, M. L. *et al.* The ligand-dependent interaction of mineralocorticoid receptor with coactivator and corepressor peptides suggests multiple activation mechanisms. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* **19**, 1460–1473 (2005).
13. Meijer, O. C. *et al.* Steroid receptor coactivator-1 splice variants differentially affect corticosteroid receptor signaling. *Endocrinology* **146**, 1438–1448 (2005).
14. Yang, J. & Fuller, P. J. Interactions of the mineralocorticoid receptor--within and without. *Mol. Cell. Endocrinol.* **350**, 196–205 (2012).
15. Bertocchio, J.-P. & Jaisser, F. [Aldosterone and kidney diseases: an emergent paradigm with important clinical implications]. *Nephrol. Ther.* **7**, 139–147 (2011).
16. Fuller, P. J. & Young, M. J. Mechanisms of mineralocorticoid action. *Hypertens. Dallas Tex 1979* **46**, 1227–1235 (2005).
17. Rogerson, F. M. & Fuller, P. J. Mineralocorticoid action. *Steroids* **65**, 61–73 (2000).
18. Bianchi, S., Batini, V. & Bigazzi, R. The renal effects of mineralocorticoid receptor antagonists. *Int. J. Cardiol.* **200**, 20–24 (2015).
19. 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).
20. Schwenk, M. H., Hirsch, J. S. & Bomback, A. S. Aldosterone blockade in CKD: emphasis on pharmacology. *Adv. Chronic Kidney Dis.* **22**, 123–132 (2015).

21. Shibata, S. *et al.* Modification of mineralocorticoid receptor function by Rac1 GTPase: implication in proteinuric kidney disease. *Nat. Med.* **14**, 1370–1376 (2008).
22. Shibata, S. *et al.* Rac1 GTPase in rodent kidneys is essential for salt-sensitive hypertension via a mineralocorticoid receptor-dependent pathway. *J. Clin. Invest.* **121**, 3233–3243 (2011).
23. 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).
24. Bocchi, B. *et al.* Glucocorticoid metabolism by 11-beta hydroxysteroid dehydrogenase type 2 modulates human mineralocorticoid receptor transactivation activity. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **84**, 239–244 (2003).
25. Lombes, M., Kenouch, S., Souque, A., Farman, N. & Rafestin-Oblin, M. E. The mineralocorticoid receptor discriminates aldosterone from glucocorticoids independently of the 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Endocrinology* **135**, 834–840 (1994).
26. Rogerson, F. M. & Fuller, P. J. Interdomain interactions in the mineralocorticoid receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.* **200**, 45–55 (2003).
27. Arriza, J. L. *et al.* Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. *Science* **237**, 268–275 (1987).
28. Jaisser, F. & Farman, N. Emerging Roles of the Mineralocorticoid Receptor in Pathology: Toward New Paradigms in Clinical Pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **68**, 49–75 (2016).
29. Heering, P. J. *et al.* Aldosterone resistance in kidney transplantation is in part induced by a down-regulation of mineralocorticoid receptor expression. *Clin. Transplant.* **18**, 186–192 (2004).
30. Kolkhof, P. & Borden, S. A. Molecular pharmacology of the mineralocorticoid receptor: prospects for novel therapeutics. *Mol. Cell. Endocrinol.* **350**, 310–317 (2012).
31. Couette, B., Lombes, M., Baulieu, E. E. & Rafestin-Oblin, M. E. Aldosterone antagonists destabilize the mineralocorticosteroid receptor. *Biochem. J.* **282 (Pt 3)**, 697–702 (1992).

32. Greenblatt, D. J. & Koch-Weser, J. Adverse reactions to spironolactone. A report from the Boston Collaborative Drug Surveillance Program. *JAMA* **225**, 40–43 (1973).
33. Rogerson, F. M., Yao, Y., Smith, B. J. & Fuller, P. J. Differences in the determinants of eplerenone, spironolactone and aldosterone binding to the mineralocorticoid receptor. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **31**, 704–709 (2004).
34. Cook, C. S. *et al.* Pharmacokinetics and metabolism of [14C]eplerenone after oral administration to humans. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* **31**, 1448–1455 (2003).
35. Rossignol, P. *et al.* Incidence, determinants, and prognostic significance of hyperkalemia and worsening renal function in patients with heart failure receiving the mineralocorticoid receptor antagonist eplerenone or placebo in addition to optimal medical therapy: results from the Eplerenone in Mild Patients Hospitalization and Survival Study in Heart Failure (EMPHASIS-HF). *Circ. Heart Fail.* **7**, 51–58 (2014).
36. Vardeny, O. *et al.* Incidence, predictors, and outcomes related to hypo- and hyperkalemia in patients with severe heart failure treated with a mineralocorticoid receptor antagonist. *Circ. Heart Fail.* **7**, 573–579 (2014).
37. Kolkhof, P. & Bärffacker, L. 30 YEARS OF THE MINERALOCORTICOID RECEPTOR: Mineralocorticoid receptor antagonists: 60 years of research and development. *J. Endocrinol.* **234**, T125–T140 (2017).
38. Bärffacker, L. *et al.* Discovery of BAY 94-8862: a nonsteroidal antagonist of the mineralocorticoid receptor for the treatment of cardiorenal diseases. *ChemMedChem* **7**, 1385–1403 (2012).
39. Geller, D. S. *et al.* Activating mineralocorticoid receptor mutation in hypertension exacerbated by pregnancy. *Science* **289**, 119–123 (2000).
40. Amazit, L. *et al.* Finerenone Impedes Aldosterone-dependent Nuclear Import of the Mineralocorticoid Receptor and Prevents Genomic Recruitment of Steroid Receptor Coactivator-1. *J. Biol. Chem.* **290**, 21876–21889 (2015).

41. Kolkhof, P. *et al.* Finerenone, a novel selective nonsteroidal mineralocorticoid receptor antagonist protects from rat cardiorenal injury. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **64**, 69–78 (2014).
42. Savarese, G. & Lund, L. H. Global Public Health Burden of Heart Failure. *Card. Fail. Rev.* **3**, 7–11 (2017).
43. Stretti, L. *et al.* A year in heart failure: an update of recent findings. *ESC Heart Fail.* **8**, 4370–4393 (2021).
44. Ceia, F. *et al.* Prevalence of chronic heart failure in Southwestern Europe: the EPICA study. *Eur. J. Heart Fail.* **4**, 531–539 (2002).
45. McMurray, J. J., Petrie, M. C., Murdoch, D. R. & Davie, A. P. Clinical epidemiology of heart failure: public and private health burden. *Eur. Heart J.* **19 Suppl P**, P9-16 (1998).
46. Benjamin, E. J. *et al.* Heart Disease and Stroke Statistics-2017 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* **135**, e146–e603 (2017).
47. Ziaean, B. & Fonarow, G. C. Epidemiology and aetiology of heart failure. *Nat. Rev. Cardiol.* **13**, 368–378 (2016).
48. Roger, V. L. *et al.* Trends in heart failure incidence and survival in a community-based population. *JAMA* **292**, 344–350 (2004).
49. Najafi, F., Jamrozik, K. & Dobson, A. J. Understanding the ‘epidemic of heart failure’: a systematic review of trends in determinants of heart failure. *Eur. J. Heart Fail.* **11**, 472–479 (2009).
50. Heidenreich, P. A. *et al.* Forecasting the impact of heart failure in the United States: a policy statement from the American Heart Association. *Circ. Heart Fail.* **6**, 606–619 (2013).
51. Journath, G. *et al.* Time Trends in Incidence and Mortality of Acute Myocardial Infarction, and All-Cause Mortality following a Cardiovascular Prevention Program in Sweden. *PloS One* **10**, e0140201 (2015).
52. Owan, T. E. *et al.* Trends in prevalence and outcome of heart failure with preserved ejection fraction. *N. Engl. J. Med.* **355**, 251–259 (2006).

53. Wang, Y. & Hill, J. A. Electrophysiological remodeling in heart failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **48**, 619–632 (2010).
54. 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).
55. Lenzen, M. J. *et al.* Differences between patients with a preserved and a depressed left ventricular function: a report from the EuroHeart Failure Survey. *Eur. Heart J.* **25**, 1214–1220 (2004).
56. Nieminen, M. S. *et al.* EuroHeart Failure Survey II (EHFS II): a survey on hospitalized acute heart failure patients: description of population. *Eur. Heart J.* **27**, 2725–2736 (2006).
57. Ma, C., Luo, H., Fan, L., Liu, X. & Gao, C. Heart failure with preserved ejection fraction: an update on pathophysiology, diagnosis, treatment, and prognosis. *Braz. J. Med. Biol. Res. Rev. Bras. Pesqui. Medicas E Biol.* **53**, e9646 (2020).
58. Appleton, C. P., Hatle, L. K. & Popp, R. L. Relation of transmitral flow velocity patterns to left ventricular diastolic function: new insights from a combined hemodynamic and Doppler echocardiographic study. *J. Am. Coll. Cardiol.* **12**, 426–440 (1988).
59. Satpathy, C., Mishra, T. K., Satpathy, R., Satpathy, H. K. & Barone, E. Diagnosis and management of diastolic dysfunction and heart failure. *Am. Fam. Physician* **73**, 841–846 (2006).
60. Nagueh, S. F. *et al.* Recommendations for the Evaluation of Left Ventricular Diastolic Function by Echocardiography: An Update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *J. Am. Soc. Echocardiogr. Off. Publ. Am. Soc. Echocardiogr.* **29**, 277–314 (2016).
61. Huis In 't Veld, A. E., de Man, F. S., van Rossum, A. C. & Handoko, M. L. How to diagnose heart failure with preserved ejection fraction: the value of invasive stress testing. *Neth. Heart J. Mon. J. Neth. Soc. Cardiol. Neth. Heart Found.* **24**, 244–251 (2016).

62. Kagiya, N. *et al.* Prognostic Value of BNP Reduction During Hospitalization in Patients With Acute Heart Failure. *J. Card. Fail.* **25**, 712–721 (2019).
63. Flachskampf, F. A. *et al.* Cardiac Imaging to Evaluate Left Ventricular Diastolic Function. *JACC Cardiovasc. Imaging* **8**, 1071–1093 (2015).
64. Borlaug, B. A. The pathophysiology of heart failure with preserved ejection fraction. *Nat. Rev. Cardiol.* **11**, 507–515 (2014).
65. Reddy, Y. N. V. & Borlaug, B. A. Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *Curr. Probl. Cardiol.* **41**, 145–188 (2016).
66. van Heerebeek, L. & Paulus, W. J. Understanding heart failure with preserved ejection fraction: where are we today? *Neth. Heart J. Mon. J. Neth. Soc. Cardiol. Neth. Heart Found.* **24**, 227–236 (2016).
67. Gazewood, J. D. & Turner, P. L. Heart Failure with Preserved Ejection Fraction: Diagnosis and Management. *Am. Fam. Physician* **96**, 582–588 (2017).
68. Butler, J. *et al.* Developing therapies for heart failure with preserved ejection fraction: current state and future directions. *JACC Heart Fail.* **2**, 97–112 (2014).
69. Mann, D. Braunwald's Heart Disease : A textbook of Cardiovascular Medicine, Ninth Edition. in (2014).
70. Mitchell, G. F., Lamas, G. A., Vaughan, D. E. & Pfeffer, M. A. Left ventricular remodeling in the year after first anterior myocardial infarction: a quantitative analysis of contractile segment lengths and ventricular shape. *J. Am. Coll. Cardiol.* **19**, 1136–1144 (1992).
71. Francis, G. S., Goldsmith, S. R., Levine, T. B., Olivari, M. T. & Cohn, J. N. The neurohumoral axis in congestive heart failure. *Ann. Intern. Med.* **101**, 370–377 (1984).
72. Desai, A. S. *et al.* Influence of Hospitalization for Cardiovascular Versus Noncardiovascular Reasons on Subsequent Mortality in Patients With Chronic Heart Failure Across the Spectrum of Ejection Fraction. *Circ. Heart Fail.* (2014).

73. 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).
74. McMurray, J. J. V. Clinical practice. Systolic heart failure. *N. Engl. J. Med.* **362**, 228–238 (2010).
75. Kötter, S. *et al.* Differential changes in titin domain phosphorylation increase myofilament stiffness in failing human hearts. *Cardiovasc. Res.* **99**, 648–656 (2013).
76. Segura, A. M., Frazier, O. H. & Buja, L. M. Fibrosis and heart failure. *Heart Fail. Rev.* **19**, 173–185 (2014).
77. Laurent, G. J. Dynamic state of collagen: pathways of collagen degradation in vivo and their possible role in regulation of collagen mass. *Am. J. Physiol.* **252**, C1-9 (1987).
78. Medugorac, I. & Jacob, R. Characterisation of left ventricular collagen in the rat. *Cardiovasc. Res.* **17**, 15–21 (1983).
79. Sonmez, O. *et al.* Novel fibro-inflammation markers in assessing left atrial remodeling in non-valvular atrial fibrillation. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* **20**, 463–470 (2014).
80. Brilla, C. G. & Weber, K. T. Reactive and reparative myocardial fibrosis in arterial hypertension in the rat. *Cardiovasc. Res.* **26**, 671–677 (1992).
81. Weber, K. T. Targeting pathological remodeling: concepts of cardioprotection and reparation. *Circulation* **102**, 1342–1345 (2000).
82. Schaper, J. *et al.* Impairment of the myocardial ultrastructure and changes of the cytoskeleton in dilated cardiomyopathy. *Circulation* **83**, 504–514 (1991).
83. Weber, K. T. & Brilla, C. G. Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. *Circulation* **83**, 1849–1865 (1991).
84. Spinale, F. G. Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function. *Physiol. Rev.* **87**, 1285–1342 (2007).
85. Gandhi, M. S. *et al.* Cellular and molecular pathways to myocardial necrosis and replacement fibrosis. *Heart Fail. Rev.* **16**, 23–34 (2011).

86. Anker, S. D. & von Haehling, S. Inflammatory mediators in chronic heart failure: an overview. *Heart Br. Card. Soc.* **90**, 464–470 (2004).
87. Hedayat, M., Mahmoudi, M. J., Rose, N. R. & Rezaei, N. Proinflammatory cytokines in heart failure: double-edged swords. *Heart Fail. Rev.* **15**, 543–562 (2010).
88. Schnee, J. M. & Hsueh, W. A. Angiotensin II, adhesion, and cardiac fibrosis. *Cardiovasc. Res.* **46**, 264–268 (2000).
89. Blanda, V., Bracale, U. M., Di Taranto, M. D. & Fortunato, G. Galectin-3 in Cardiovascular Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, E9232 (2020).
90. Dong, R. *et al.* Galectin-3 as a novel biomarker for disease diagnosis and a target for therapy (Review). *Int. J. Mol. Med.* **41**, 599–614 (2018).
91. MacFadyen, R. J., Barr, C. S. & Struthers, A. D. Aldosterone blockade reduces vascular collagen turnover, improves heart rate variability and reduces early morning rise in heart rate in heart failure patients. *Cardiovasc. Res.* **35**, 30–34 (1997).
92. Zannad, F., Alla, F., Dousset, B., Perez, A. & Pitt, B. Limitation of excessive extracellular matrix turnover may contribute to survival benefit of spironolactone therapy in patients with congestive heart failure: insights from the randomized aldactone evaluation study (RALES). Rales Investigators. *Circulation* **102**, 2700–2706 (2000).
93. Iraqi, W. *et al.* Extracellular cardiac matrix biomarkers in patients with acute myocardial infarction complicated by left ventricular dysfunction and heart failure: insights from the Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study (EPHESUS) study. *Circulation* **119**, 2471–2479 (2009).
94. Zannad, F. *et al.* Eplerenone in patients with systolic heart failure and mild symptoms. *N. Engl. J. Med.* **364**, 11–21 (2011).
95. 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).

96. Shen, J. Z. *et al.* Cardiac Tissue Injury and Remodeling Is Dependent Upon MR Regulation of Activation Pathways in Cardiac Tissue Macrophages. *Endocrinology* **157**, 3213–3223 (2016).
97. Barrera-Chimal, J. *et al.* The myeloid mineralocorticoid receptor controls inflammatory and fibrotic responses after renal injury via macrophage interleukin-4 receptor signaling. *Kidney Int.* **93**, 1344–1355 (2018).
98. Rickard, A. J. *et al.* Deletion of mineralocorticoid receptors from macrophages protects against deoxycorticosterone/salt-induced cardiac fibrosis and increased blood pressure. *Hypertens. Dallas Tex 1979* **54**, 537–543 (2009).
99. Buonafina, M., Bonnard, B. & Jaisser, F. Mineralocorticoid Receptor and Cardiovascular Disease. *Am. J. Hypertens.* **31**, 1165–1174 (2018).
100. Angomachalelis, N., Hourzamanis, A. I., Sideri, S., Serasli, E. & Vamvalis, C. Improvement of left ventricular diastolic dysfunction in hypertensive patients 1 month after ACE inhibition therapy: evaluation by ultrasonic automated boundary detection. *Heart Vessels* **11**, 303–309 (1996).
101. Mitsunami, K. *et al.* Three-month effects of candesartan cilexetil, an angiotensin II type 1 (AT1) receptor antagonist, on left ventricular mass and hemodynamics in patients with essential hypertension. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **12**, 469–474 (1998).
102. Heusch, G. Myocardial ischaemia-reperfusion injury and cardioprotection in perspective. *Nat. Rev. Cardiol.* **17**, 773–789 (2020).
103. Sayer, G. & Bhat, G. The renin-angiotensin-aldosterone system and heart failure. *Cardiol. Clin.* **32**, 21–32, vii (2014).
104. Goldsmith, S. R. & Gheorghide, M. Vasopressin antagonism in heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* **46**, 1785–1791 (2005).
105. Dorofeyeva, L. V. Obtaining of measles virus haemagglutinin from strain L-16 grown in primary cell cultures. *Acta Virol.* **19**, 497 (1975).
106. Espinola-Klein, C. [Antithrombotic therapy after peripheral revascularization]. *Dtsch. Med. Wochenschr.* **146**, 136–140 (2021).

107. Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T. E., Khoo, J. C. & Witztum, J. L. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N. Engl. J. Med.* **320**, 915–924 (1989).
108. Lind, L. Evaluation of endothelium-dependent vasodilation in humans. *Blood Press.* **10**, 124–130 (2001).
109. Paulus, W. J. & Tschöpe, C. A novel paradigm for heart failure with preserved ejection fraction: comorbidities drive myocardial dysfunction and remodeling through coronary microvascular endothelial inflammation. *J. Am. Coll. Cardiol.* **62**, 263–271 (2013).
110. Hwang, S.-J., Melenovsky, V. & Borlaug, B. A. Implications of coronary artery disease in heart failure with preserved ejection fraction. *J. Am. Coll. Cardiol.* **63**, 2817–2827 (2014).
111. 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).
112. Mohammed, S. F. *et al.* Coronary microvascular rarefaction and myocardial fibrosis in heart failure with preserved ejection fraction. *Circulation* **131**, 550–559 (2015).
113. 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).
114. van Heerebeek, L. *et al.* Low myocardial protein kinase G activity in heart failure with preserved ejection fraction. *Circulation* **126**, 830–839 (2012).
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. Kanwar, M., Walter, C., Clarke, M. & Patarroyo-Aponte, M. Targeting heart failure with preserved ejection fraction: current status and future prospects. *Vasc. Health Risk Manag.* **12**, 129–141 (2016).
119. Nguyen Dinh Cat, A. *et al.* The endothelial mineralocorticoid receptor regulates vasoconstrictor tone and blood pressure. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **24**, 2454–2463 (2010).
120. 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).
121. Goursaud, S. & du Cheyron, D. Le syndrome cardiorenal : diagnostic, physiopathologie et prise en charge. *Réanimation* **23**, 585–594 (2014).
122. Smith, G. L. *et al.* Renal impairment and outcomes in heart failure: systematic review and meta-analysis. *J. Am. Coll. Cardiol.* **47**, 1987–1996 (2006).
123. Ronco, C., Haapio, M., House, A. A., Anavekar, N. & Bellomo, R. Cardiorenal syndrome. *J. Am. Coll. Cardiol.* **52**, 1527–1539 (2008).
124. Saw, E. L., Ramachandran, S., Valero-Muñoz, M. & Sam, F. Skeletal muscle (dys)function in heart failure with preserved ejection fraction. *Curr. Opin. Cardiol.* **36**, 219–226 (2021).
125. Mercurio, G., Deidda, M., Bina, A., Manconi, E. & Rosano, G. M. C. Gender-specific aspects in primary and secondary prevention of cardiovascular disease. *Curr. Pharm. Des.* **17**, 1082–1089 (2011).
126. Visser, J. A., Schipper, I., Laven, J. S. E. & Themmen, A. P. N. Anti-Müllerian hormone: an ovarian reserve marker in primary ovarian insufficiency. *Nat. Rev. Endocrinol.* **8**, 331–341 (2012).
127. van der Schouw, Y. T., van der Graaf, Y., Steyerberg, E. W., Eijkemans, J. C. & Banga, J. D. Age at menopause as a risk factor for cardiovascular mortality. *Lancet Lond. Engl.* **347**, 714–718 (1996).
128. Rahman, I., Åkesson, A. & Wolk, A. Relationship between age at natural menopause and risk of heart failure. *Menopause N. Y. N* **22**, 12–16 (2015).

129. Maas, A. H. E. M. *et al.* Red alert for women's heart: the urgent need for more research and knowledge on cardiovascular disease in women: proceedings of the workshop held in Brussels on gender differences in cardiovascular disease, 29 September 2010. *Eur. Heart J.* **32**, 1362–1368 (2011).
130. Merrill, M., Sweitzer, N. K., Lindenfeld, J. & Kao, D. P. Sex Differences in Outcomes and Responses to Spironolactone in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction: A Secondary Analysis of TOPCAT Trial. *JACC Heart Fail.* **7**, 228–238 (2019).
131. Dewan, P. *et al.* Sex-Related Differences in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *Circ. Heart Fail.* **12**, e006539 (2019).
132. Lombardi, M., Mercurio, G., Fini, M. & Rosano, G. M. C. Gender-specific aspects of treatment of cardiovascular risk factors in primary and secondary prevention. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **24**, 699–705 (2010).
133. Gustafsson, F. *et al.* Female sex is associated with a better long-term survival in patients hospitalized with congestive heart failure. *Eur. Heart J.* **25**, 129–135 (2004).
134. Ebong, I. A. *et al.* Age at menopause and incident heart failure: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Menopause N. Y. N* **21**, 585–591 (2014).
135. Fuller, P. J. *et al.* Molecular evolution of the switch for progesterone and spironolactone from mineralocorticoid receptor agonist to antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **116**, 18578–18583 (2019).
136. Shah, S. J., Katz, D. H. & Deo, R. C. Phenotypic spectrum of heart failure with preserved ejection fraction. *Heart Fail. Clin.* **10**, 407–418 (2014).
137. McMurray, J. J. V. Clinical practice. Systolic heart failure. *N. Engl. J. Med.* **362**, 228–238 (2010).
138. Shah, A. M. & Mann, D. L. In search of new therapeutic targets and strategies for heart failure: recent advances in basic science. *Lancet Lond. Engl.* **378**, 704–712 (2011).

139. Garg, R. & Yusuf, S. Overview of randomized trials of angiotensin-converting enzyme inhibitors on mortality and morbidity in patients with heart failure. Collaborative Group on ACE Inhibitor Trials. *JAMA* **273**, 1450–1456 (1995).
140. Packer, M. *et al.* Effect of carvedilol on survival in severe chronic heart failure. *N. Engl. J. Med.* **344**, 1651–1658 (2001).
141. 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).
142. 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).
143. Zannad, F. *et al.* Rationale and design of the Eplerenone in Mild Patients Hospitalization And Survival Study in Heart Failure (EMPHASIS-HF). *Eur. J. Heart Fail.* **12**, 617–622 (2010).
144. McKee, P. A., Castelli, W. P., McNamara, P. M. & Kannel, W. B. The natural history of congestive heart failure: the Framingham study. *N. Engl. J. Med.* **285**, 1441–1446 (1971).
145. Jhund, P. S. *et al.* Long-term trends in first hospitalization for heart failure and subsequent survival between 1986 and 2003: a population study of 5.1 million people. *Circulation* **119**, 515–523 (2009).
146. Redfield, M. M. *et al.* Burden of systolic and diastolic ventricular dysfunction in the community: appreciating the scope of the heart failure epidemic. *JAMA* **289**, 194–202 (2003).
147. Ponikowski, P. *et al.* 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur. Heart J.* **37**, 2129–2200 (2016).
148. Hunt, S. A., American College of Cardiology, & American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure). ACC/AHA 2005 guideline update for the diagnosis and

- management of chronic heart failure in the adult: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure). *J. Am. Coll. Cardiol.* **46**, e1-82 (2005).
149. Brown, A. L. *et al.* Demographic, belief, and situational factors influencing the decision to utilize emergency medical services among chest pain patients. Rapid Early Action for Coronary Treatment (REACT) study. *Circulation* **102**, 173–178 (2000).
150. Selye, H. Production of Nephrosclerosis by Overdosage with Desoxycorticosterone Acetate. *Can. Med. Assoc. J.* **47**, 515–519 (1942).
151. Selye, H. Protection by a steroid-spirolactone against certain types of cardiac necroses. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y. N* **104**, 212–213 (1960).
152. Kuster, G. M. *et al.* Mineralocorticoid receptor inhibition ameliorates the transition to myocardial failure and decreases oxidative stress and inflammation in mice with chronic pressure overload. *Circulation* **111**, 420–427 (2005).
153. Rywik, T. M. [Summary of the article: Zannad F, McMurray JJV, Krum H *et al.*; for the EMPHASIS-HF Study Group. Eplerenone in patients with systolic heart failure and mild symptoms. *N Engl J Med*, 2011; 364: 11-21]. *Kardiol. Pol.* **69**, 631–632 (2011).
154. Swedberg, K., Eneroth, P., Kjeksus, J. & Wilhelmsen, L. Hormones regulating cardiovascular function in patients with severe congestive heart failure and their relation to mortality. CONSENSUS Trial Study Group. *Circulation* **82**, 1730–1736 (1990).
155. Ciccoira, M. *et al.* Relation of aldosterone ‘escape’ despite angiotensin-converting enzyme inhibitor administration to impaired exercise capacity in chronic congestive heart failure secondary to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am. J. Cardiol.* **89**, 403–407 (2002).
156. Rouleau, J. L. *et al.* Prognostic value of neurohumoral activation in patients with an acute myocardial infarction: effect of captopril. *J. Am. Coll. Cardiol.* **24**, 583–591 (1994).

157. Albaghdadi, M., Gheorghiade, M. & Pitt, B. Mineralocorticoid receptor antagonism: therapeutic potential in acute heart failure syndromes. *Eur. Heart J.* **32**, 2626–2633 (2011).
158. Staessen, J., Lijnen, P., Fagard, R., Verschueren, L. J. & Amery, A. Rise in plasma concentration of aldosterone during long-term angiotensin II suppression. *J. Endocrinol.* **91**, 457–465 (1981).
159. Fritsch Neves, M. & Schiffrin, E. L. Aldosterone: a risk factor for vascular disease. *Curr. Hypertens. Rep.* **5**, 59–65 (2003).
160. Ouvrard-Pascaud, A. *et al.* Conditional mineralocorticoid receptor expression in the heart leads to life-threatening arrhythmias. *Circulation* **111**, 3025–3033 (2005).
161. Gómez, A. M. *et al.* Mineralocorticoid modulation of cardiac ryanodine receptor activity is associated with downregulation of FK506-binding proteins. *Circulation* **119**, 2179–2187 (2009).
162. Favre, J. *et al.* Coronary endothelial dysfunction after cardiomyocyte-specific mineralocorticoid receptor overexpression. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **300**, H2035-2043 (2011).
163. Grune, J. *et al.* Steroidal and Nonsteroidal Mineralocorticoid Receptor Antagonists Cause Differential Cardiac Gene Expression in Pressure Overload-induced Cardiac Hypertrophy. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **67**, 402–411 (2016).
164. Lachaux, M. *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.* **20**, 2399–2407 (2018).
165. Juurlink, D. N. *et al.* Rates of hyperkalemia after publication of the Randomized Aldactone Evaluation Study. *N. Engl. J. Med.* **351**, 543–551 (2004).
166. Pitt, B. *et al.* Eplerenone reduces mortality 30 days after randomization following acute myocardial infarction in patients with left ventricular systolic dysfunction and heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* **46**, 425–431 (2005).
167. Cohn, J. N. & Colucci, W. Cardiovascular effects of aldosterone and post-acute myocardial infarction pathophysiology. *Am. J. Cardiol.* **97**, 4F-12F (2006).

168. Pitt, B. *et al.* Spironolactone for heart failure with preserved ejection fraction. *N. Engl. J. Med.* **370**, 1383–1392 (2014).
169. Pfeffer, M. A. *et al.* Regional variation in patients and outcomes in the Treatment of Preserved Cardiac Function Heart Failure With an Aldosterone Antagonist (TOPCAT) trial. *Circulation* **131**, 34–42 (2015).
170. Kristensen, S. L. *et al.* International geographic variation in event rates in trials of heart failure with preserved and reduced ejection fraction. *Circulation* **131**, 43–53 (2015).
171. Montalescot, G. *et al.* Early eplerenone treatment in patients with acute ST-elevation myocardial infarction without heart failure: the Randomized Double-Blind Reminder Study. *Eur. Heart J.* **35**, 2295–2302 (2014).
172. Kolkhof, P. *et al.* Steroidal and Novel Non-steroidal Mineralocorticoid Receptor Antagonists in Heart Failure and Cardiorenal Diseases: Comparison at Bench and Bedside. *Handb. Exp. Pharmacol.* **243**, 271–305 (2017).
173. Garg, R. *et al.* Mineralocorticoid receptor blockade improves coronary microvascular function in individuals with type 2 diabetes. *Diabetes* **64**, 236–242 (2015).
174. Joffe, H. V. *et al.* Beneficial effects of eplerenone versus hydrochlorothiazide on coronary circulatory function in patients with diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **92**, 2552–2558 (2007).
175. Saklayen, M. G. The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. *Curr. Hypertens. Rep.* **20**, 12 (2018).
176. Aguilar, M., Bhuket, T., Torres, S., Liu, B. & Wong, R. J. Prevalence of the metabolic syndrome in the United States, 2003–2012. *JAMA* **313**, 1973–1974 (2015).
177. Grundy, S. M. *et al.* Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation* **112**, 2735–2752 (2005).

178. Srikanthan, K., Feyh, A., Visweshwar, H., Shapiro, J. I. & Sodhi, K. Systematic Review of Metabolic Syndrome Biomarkers: A Panel for Early Detection, Management, and Risk Stratification in the West Virginian Population. *Int. J. Med. Sci.* **13**, 25–38 (2016).
179. Mozumdar, A. & Liguori, G. Persistent increase of prevalence of metabolic syndrome among U.S. adults: NHANES III to NHANES 1999-2006. *Diabetes Care* **34**, 216–219 (2011).
180. Hassoun, S. *et al.* Impact of ethnicity and obesity on insulin resistance in two ethnic groups at very high risk of type 2 diabetes. *Diabetes Metab.* **43**, 292–294 (2017).
181. Goff, L. M. Ethnicity and Type 2 diabetes in the UK. *Diabet. Med. J. Br. Diabet. Assoc.* **36**, 927–938 (2019).
182. Aguayo-Mazzucato, C. *et al.* Understanding the growing epidemic of type 2 diabetes in the Hispanic population living in the United States. *Diabetes Metab. Res. Rev.* **35**, e3097 (2019).
183. Lennerz, B. & Lennerz, J. K. Food Addiction, High-Glycemic-Index Carbohydrates, and Obesity. *Clin. Chem.* **64**, 64–71 (2018).
184. Cassidy, S. B., Schwartz, S., Miller, J. L. & Driscoll, D. J. Prader-Willi syndrome. *Genet. Med. Off. J. Am. Coll. Med. Genet.* **14**, 10–26 (2012).
185. Ceccato, F. & Boscaro, M. Cushing's Syndrome: Screening and Diagnosis. *High Blood Press. Cardiovasc. Prev. Off. J. Ital. Soc. Hypertens.* **23**, 209–215 (2016).
186. Duclos, M. Osteoarthritis, obesity and type 2 diabetes: The weight of waist circumference. *Ann. Phys. Rehabil. Med.* **59**, 157–160 (2016).
187. Musri, M. M. & Párrizas, M. Epigenetic regulation of adipogenesis. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **15**, 342–349 (2012).
188. Nie, Y., Ma, R. C., Chan, J. C. N., Xu, H. & Xu, G. Glucose-dependent insulinotropic peptide impairs insulin signaling via inducing adipocyte inflammation in glucose-dependent insulinotropic peptide receptor-overexpressing adipocytes. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **26**, 2383–2393 (2012).

189. Sookoian, S. & Pirola, C. J. DNA methylation and hepatic insulin resistance and steatosis. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **15**, 350–356 (2012).
190. Magkos, F., Fabbrini, E., Conte, C., Patterson, B. W. & Klein, S. Relationship between adipose tissue lipolytic activity and skeletal muscle insulin resistance in nondiabetic women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **97**, E1219–1223 (2012).
191. Schmidt, S. L., Harmon, K. A., Sharp, T. A., Kealey, E. H. & Bessesen, D. H. The effects of overfeeding on spontaneous physical activity in obesity prone and obesity resistant humans. *Obes. Silver Spring Md* **20**, 2186–2193 (2012).
192. Björntorp, P. The associations between obesity, adipose tissue distribution and disease. *Acta Med. Scand. Suppl.* **723**, 121–134 (1988).
193. Fox, C. S. *et al.* Genome-wide association of pericardial fat identifies a unique locus for ectopic fat. *PLoS Genet.* **8**, e1002705 (2012).
194. Lizcano, F. & Vargas, D. EID1-induces brown-like adipocyte traits in white 3T3-L1 pre-adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **398**, 160–165 (2010).
195. Morganstein, D. L. *et al.* Human fetal mesenchymal stem cells differentiate into brown and white adipocytes: a role for ERRalpha in human UCP1 expression. *Cell Res.* **20**, 434–444 (2010).
196. Tseng, Y.-H. *et al.* New role of bone morphogenetic protein 7 in brown adipogenesis and energy expenditure. *Nature* **454**, 1000–1004 (2008).
197. Cypess, A. M. & Kahn, C. R. Brown fat as a therapy for obesity and diabetes. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* **17**, 143–149 (2010).
198. Awa, W. L. *et al.* Type 2 diabetes from pediatric to geriatric age: analysis of gender and obesity among 120,183 patients from the German/Austrian DPV database. *Eur. J. Endocrinol.* **167**, 245–254 (2012).
199. Wietlisbach, V. *et al.* The relation of body mass index and abdominal adiposity with dyslipidemia in 27 general populations of the WHO MONICA Project. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. NMCD* **23**, 432–442 (2013).

200. Flegal, K. M., Carroll, M. D., Ogden, C. L. & Curtin, L. R. Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2008. *JAMA* **303**, 235–241 (2010).
201. Clegg, D. J. Minireview: the year in review of estrogen regulation of metabolism. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* **26**, 1957–1960 (2012).
202. Carr, M. C. The emergence of the metabolic syndrome with menopause. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **88**, 2404–2411 (2003).
203. Mauvais-Jarvis, F. Estrogen and androgen receptors: regulators of fuel homeostasis and emerging targets for diabetes and obesity. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* **22**, 24–33 (2011).
204. Pieronne-Deperrois, M. *et al.* Mineralocorticoid receptor blockade with finerenone improves heart function and exercise capacity in ovariectomized mice. *ESC Heart Fail.* **8**, 1933–1943 (2021).
205. Heine, P. A., Taylor, J. A., Iwamoto, G. A., Lubahn, D. B. & Cooke, P. S. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-alpha knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 12729–12734 (2000).
206. Murata, Y., Robertson, K. M., Jones, M. E. E. & Simpson, E. R. Effect of estrogen deficiency in the male: the ArKO mouse model. *Mol. Cell. Endocrinol.* **193**, 7–12 (2002).
207. Grodstein, F. *et al.* A prospective, observational study of postmenopausal hormone therapy and primary prevention of cardiovascular disease. *Ann. Intern. Med.* **133**, 933–941 (2000).
208. Garaulet, M., Pérez-Llamas, F., Zamora, S. & Tébar, F. J. [Comparative study of the type of obesity in pre- and postmenopausal women: Relationship with fat cell data, fatty acid composition and endocrine, metabolic, nutritional and psychological variables]. *Med. Clin. (Barc.)* **118**, 281–286 (2002).
209. Garaulet, M. *et al.* Body fat distribution in pre- and post-menopausal women: metabolic and anthropometric variables. *J. Nutr. Health Aging* **6**, 123–126 (2002).

210. Toth, M. J., Poehlman, E. T., Matthews, D. E., Tchernof, A. & MacCoss, M. J. Effects of estradiol and progesterone on body composition, protein synthesis, and lipoprotein lipase in rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **280**, E496-501 (2001).
211. Pedersen, S. B., Bruun, J. M., Kristensen, K. & Richelsen, B. Regulation of UCP1, UCP2, and UCP3 mRNA expression in brown adipose tissue, white adipose tissue, and skeletal muscle in rats by estrogen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **288**, 191–197 (2001).
212. Rodriguez-Cuenca, S. *et al.* Sex steroid receptor expression profile in brown adipose tissue. Effects of hormonal status. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **20**, 877–886 (2007).
213. Naaz, A. *et al.* Effect of ovariectomy on adipose tissue of mice in the absence of estrogen receptor alpha (ERalpha): a potential role for estrogen receptor beta (ERbeta). *Horm. Metab. Res. Horm. Stoffwechselforschung Horm. Metab.* **34**, 758–763 (2002).
214. Barros, R. P. A., Gabbi, C., Morani, A., Warner, M. & Gustafsson, J.-A. Participation of ERalpha and ERbeta in glucose homeostasis in skeletal muscle and white adipose tissue. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **297**, E124-133 (2009).
215. Riant, E. *et al.* Estrogens protect against high-fat diet-induced insulin resistance and glucose intolerance in mice. *Endocrinology* **150**, 2109–2117 (2009).
216. Tritos, N. A., Segal-Lieberman, G., Vezeridis, P. S. & Maratos-Flier, E. Estradiol-induced anorexia is independent of leptin and melanin-concentrating hormone. *Obes. Res.* **12**, 716–724 (2004).
217. Ladyman, S. R. & Grattan, D. R. Suppression of leptin receptor messenger ribonucleic acid and leptin responsiveness in the ventromedial nucleus of the hypothalamus during pregnancy in the rat. *Endocrinology* **146**, 3868–3874 (2005).
218. Saely, C. H., Geiger, K. & Drexel, H. Brown versus white adipose tissue: a mini-review. *Gerontology* **58**, 15–23 (2012).
219. Frigolet, M. E. & Gutiérrez-Aguilar, R. The colors of adipose tissue. *Gac. Med. Mex.* **156**, 142–149 (2020).

220. Kershaw, E. E. & Flier, J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **89**, 2548–2556 (2004).
221. Rydzewska, M., Nikořajuk, A., Matulewicz, N., Stefanowicz, M. & Karczewska-Kupczewska, M. Serum secreted frizzled-related protein 5 in relation to insulin sensitivity and its regulation by insulin and free fatty acids. *Endocrine* **74**, 300–307 (2021).
222. Coppack, S. W. Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue. *Proc. Nutr. Soc.* **60**, 349–356 (2001).
223. Recinella, L. *et al.* Adipokines: New Potential Therapeutic Target for Obesity and Metabolic, Rheumatic, and Cardiovascular Diseases. *Front. Physiol.* **11**, 578966 (2020).
224. Carnagarin, R., Dharmarajan, A. M. & Dass, C. R. PEDF-induced alteration of metabolism leading to insulin resistance. *Mol. Cell. Endocrinol.* **401**, 98–104 (2015).
225. Ryo, M. *et al.* Adiponectin as a biomarker of the metabolic syndrome. *Circ. J. Off. J. Jpn. Circ. Soc.* **68**, 975–981 (2004).
226. Cong, W. *et al.* Ghrelin receptor signaling: a promising therapeutic target for metabolic syndrome and cognitive dysfunction. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* **9**, 557–563 (2010).
227. Varela, L. *et al.* Ghrelin and lipid metabolism: key partners in energy balance. *J. Mol. Endocrinol.* **46**, R43-63 (2011).
228. Binder, B. R. *et al.* Plasminogen activator inhibitor 1: physiological and pathophysiological roles. *News Physiol. Sci. Int. J. Physiol. Prod. Jointly Int. Union Physiol. Sci. Am. Physiol. Soc.* **17**, 56–61 (2002).
229. Kraja, A. T. *et al.* Do inflammation and procoagulation biomarkers contribute to the metabolic syndrome cluster? *Nutr. Metab.* **4**, 28 (2007).
230. Vague, P. *et al.* Correlation between blood fibrinolytic activity, plasminogen activator inhibitor level, plasma insulin level, and relative body weight in normal and obese subjects. *Metabolism.* **35**, 250–253 (1986).

231. Juhan-Vague, I., Alessi, M.-C., Mavri, A. & Morange, P. E. Plasminogen activator inhibitor-1, inflammation, obesity, insulin resistance and vascular risk. *J. Thromb. Haemost. JTH* **1**, 1575–1579 (2003).
232. Bilgili, S., Celebiler, A. C., Dogan, A. & Karaca, B. Inverse relationship between adiponectin and plasminogen activator inhibitor-1 in metabolic syndrome patients. *Endocr. Regul.* **42**, 63–68 (2008).
233. Alessi, M.-C. & Juhan-Vague, I. PAI-1 and the metabolic syndrome: links, causes, and consequences. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **26**, 2200–2207 (2006).
234. Kruihof, E. K., Gudinchet, A. & Bachmann, F. Plasminogen activator inhibitor 1 and plasminogen activator inhibitor 2 in various disease states. *Thromb. Haemost.* **59**, 7–12 (1988).
235. Paganelli, F. *et al.* Relationship of plasminogen activator inhibitor-1 levels following thrombolytic therapy with rt-PA as compared to streptokinase and patency of infarct related coronary artery. *Thromb. Haemost.* **82**, 104–108 (1999).
236. Ma, J. *et al.* Differing effects of mineralocorticoid receptor-dependent and -independent potassium-sparing diuretics on fibrinolytic balance. *Hypertens. Dallas Tex* **1979** **46**, 313–320 (2005).
237. Dong, M. & Ren, J. What fans the fire: insights into mechanisms of leptin in metabolic syndrome-associated heart diseases. *Curr. Pharm. Des.* **20**, 652–658 (2014).
238. Ghantous, C. M., Azrak, Z., Hanache, S., Abou-Kheir, W. & Zeidan, A. Differential Role of Leptin and Adiponectin in Cardiovascular System. *Int. J. Endocrinol.* **2015**, 534320 (2015).
239. Yang, R. & Barouch, L. A. Leptin signaling and obesity: cardiovascular consequences. *Circ. Res.* **101**, 545–559 (2007).
240. Tardiff, J. C. Cardiac hypertrophy: stressing out the heart. *J. Clin. Invest.* **116**, 1467–1470 (2006).
241. Thøgersen, A. M. *et al.* Interactions between fibrinolysis, lipoproteins and leptin related to a first myocardial infarction. *Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil. Off. J. Eur. Soc. Cardiol. Work. Groups Epidemiol. Prev. Card. Rehabil. Exerc. Physiol.* **11**, 33–40 (2004).

242. Yoshinaga, M. *et al.* Adipokines and the prediction of the accumulation of cardiovascular risk factors or the presence of metabolic syndrome in elementary school children. *Circ. J. Off. J. Jpn. Circ. Soc.* **72**, 1874–1878 (2008).
243. Lee, S. W., Jo, H. H., Kim, M. R., You, Y. O. & Kim, J. H. Association between metabolic syndrome and serum leptin levels in postmenopausal women. *J. Obstet. Gynaecol. J. Inst. Obstet. Gynaecol.* **32**, 73–77 (2012).
244. Yun, J. E., Kimm, H., Jo, J. & Jee, S. H. Serum leptin is associated with metabolic syndrome in obese and nonobese Korean populations. *Metabolism.* **59**, 424–429 (2010).
245. Kadowaki, T. *et al.* Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.* **116**, 1784–1792 (2006).
246. Falahi, E., Khalkhali Rad, A. H. & Roosta, S. What is the best biomarker for metabolic syndrome diagnosis? *Diabetes Metab. Syndr.* **9**, 366–372 (2015).
247. Kotani, K. & Sakane, N. Leptin:adiponectin ratio and metabolic syndrome in the general Japanese population. *Korean J. Lab. Med.* **31**, 162–166 (2011).
248. Cicero, A. F. G. *et al.* Metabolic syndrome, adipokines and hormonal factors in pharmacologically untreated adult elderly subjects from the Brisighella Heart Study historical cohort. *Obes. Facts* **5**, 319–326 (2012).
249. Engeli, S., Negrel, R. & Sharma, A. M. Physiology and pathophysiology of the adipose tissue renin-angiotensin system. *Hypertens. Dallas Tex 1979* **35**, 1270–1277 (2000).
250. van Harmelen, V. *et al.* The association of human adipose angiotensinogen gene expression with abdominal fat distribution in obesity. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. J. Int. Assoc. Study Obes.* **24**, 673–678 (2000).
251. Engeli, S. *et al.* Weight loss and the renin-angiotensin-aldosterone system. *Hypertens. Dallas Tex 1979* **45**, 356–362 (2005).

252. Olivier, A. *et al.* Effect of eplerenone in patients with heart failure and reduced ejection fraction: potential effect modification by abdominal obesity. Insight from the EMPHASIS-HF trial. *Eur. J. Heart Fail.* **19**, 1186–1197 (2017).
253. Caprio, M. *et al.* Pivotal role of the mineralocorticoid receptor in corticosteroid-induced adipogenesis. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **21**, 2185–2194 (2007).
254. Ferguson, D. *et al.* Role of Mineralocorticoid Receptor in Adipogenesis and Obesity in Male Mice. *Endocrinology* **161**, bqz010 (2020).
255. Armani, A. *et al.* Mineralocorticoid receptor antagonism induces browning of white adipose tissue through impairment of autophagy and prevents adipocyte dysfunction in high-fat-diet-fed mice. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **28**, 3745–3757 (2014).
256. Thuzar, M., Law, W. P., Dimeski, G., Stowasser, M. & Ho, K. K. Y. Mineralocorticoid antagonism enhances brown adipose tissue function in humans: A randomized placebo-controlled cross-over study. *Diabetes Obes. Metab.* **21**, 509–516 (2019).
257. Buglioni, A. *et al.* Circulating aldosterone and natriuretic peptides in the general community: relationship to cardiorenal and metabolic disease. *Hypertens. Dallas Tex 1979* **65**, 45–53 (2015).
258. Marzolla, V. *et al.* The role of the mineralocorticoid receptor in adipocyte biology and fat metabolism. *Mol. Cell. Endocrinol.* **350**, 281–288 (2012).
259. 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).
260. Lewis, G. A. *et al.* Biological Phenotypes of Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *J. Am. Coll. Cardiol.* **70**, 2186–2200 (2017).
261. Ford, E. S. The metabolic syndrome and mortality from cardiovascular disease and all-causes: findings from the National Health and Nutrition Examination Survey II Mortality Study. *Atherosclerosis* **173**, 309–314 (2004).

262. Alberti, K. G. M. M., Zimmet, P. & Shaw, J. Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabet. Med. J. Br. Diabet. Assoc.* **23**, 469–480 (2006).
263. Grundy, S. M. *et al.* Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute scientific statement. *Curr. Opin. Cardiol.* **21**, 1–6 (2006).
264. Tadic, M. & Cuspidi, C. Obesity and heart failure with preserved ejection fraction: a paradox or something else? *Heart Fail. Rev.* **24**, 379–385 (2019).
265. Borlaug, B. A. Evaluation and management of heart failure with preserved ejection fraction. *Nat. Rev. Cardiol.* **17**, 559–573 (2020).
266. Tourki, B. & Halade, G. V. Heart Failure Syndrome With Preserved Ejection Fraction Is a Metabolic Cluster of Non-resolving Inflammation in Obesity. *Front. Cardiovasc. Med.* **8**, 695952 (2021).
267. Maric, C. & Hall, J. E. Obesity, metabolic syndrome and diabetic nephropathy. *Contrib. Nephrol.* **170**, 28–35 (2011).
268. Bagasrawala, S. I., Sheth, H., Shah, H., Ansari, R. & Lakdawala, M. Metabolic Syndrome Rather than Obesity Alone Is More Significant for Kidney Disease. *Obes. Surg.* **29**, 3478–3483 (2019).
269. D’Agati, V. D. *et al.* Obesity-related glomerulopathy: clinical and pathologic characteristics and pathogenesis. *Nat. Rev. Nephrol.* **12**, 453–471 (2016).
270. Grundy, S. M. *et al.* Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation* **109**, 433–438 (2004).
271. Bhandari, R., Kelley, G. A., Hartley, T. A. & Rockett, I. R. H. Metabolic syndrome is associated with increased breast cancer risk: a systematic review with meta-analysis. *Int. J. Breast Cancer* **2014**, 189384 (2014).

272. Lastra, G. *et al.* Direct renin inhibition improves systemic insulin resistance and skeletal muscle glucose transport in a transgenic rodent model of tissue renin overexpression. *Endocrinology* **150**, 2561–2568 (2009).
273. Urbanet, R. *et al.* Adipocyte Mineralocorticoid Receptor Activation Leads to Metabolic Syndrome and Induction of Prostaglandin D2 Synthase. *Hypertens. Dallas Tex 1979* **66**, 149–157 (2015).
274. Ronconi, V. *et al.* Aldosterone, mineralocorticoid receptor and the metabolic syndrome: role of the mineralocorticoid receptor antagonists. *Curr. Vasc. Pharmacol.* **10**, 238–246 (2012).
275. Fallo, F., Pilon, C. & Urbanet, R. Primary aldosteronism and metabolic syndrome. *Horm. Metab. Res. Horm. Stoffwechselforschung Horm. Metab.* **44**, 208–214 (2012).
276. 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).
277. Bender, S. B. *et al.* Mineralocorticoid receptor antagonism treats obesity-associated cardiac diastolic dysfunction. *Hypertens. Dallas Tex 1979* **65**, 1082–1088 (2015).
278. Pitt, B. *et al.* Cardiovascular Events with Finerenone in Kidney Disease and Type 2 Diabetes. *N. Engl. J. Med.* **385**, 2252–2263 (2021).
279. Bakris, G. L. *et al.* Effect of Finerenone on Chronic Kidney Disease Outcomes in Type 2 Diabetes. *N. Engl. J. Med.* **383**, 2219–2229 (2020).
280. Frampton, J. E. Finerenone: First Approval. *Drugs* **81**, 1787–1794 (2021).
281. Roche, C. *et al.* Soluble epoxide hydrolase inhibition improves coronary endothelial function and prevents the development of cardiac alterations in obese insulin-resistant mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **308**, H1020-1029 (2015).
282. Gobato, A. O., Vasques, A. C. J., Zambon, M. P., Barros Filho, A. de A. & Hessel, G. Metabolic syndrome and insulin resistance in obese adolescents. *Rev. Paul. Pediatr. Orgao Of. Soc. Pediatr. Sao Paulo* **32**, 55–62 (2014).

283. Li, Y. *et al.* High fat diet-induced obesity leads to depressive and anxiety-like behaviors in mice via AMPK/mTOR-mediated autophagy. *Exp. Neurol.* **348**, 113949 (2022).
284. González, A., Schelbert, E. B., Díez, J. & Butler, J. Myocardial Interstitial Fibrosis in Heart Failure: Biological and Translational Perspectives. *J. Am. Coll. Cardiol.* **71**, 1696–1706 (2018).
285. Chistiakov, D. A., Shkurat, T. P., Melnichenko, A. A., Grechko, A. V. & Orekhov, A. N. The role of mitochondrial dysfunction in cardiovascular disease: a brief review. *Ann. Med.* **50**, 121–127 (2018).
286. Palmer, J. W., Tandler, B. & Hoppel, C. L. Biochemical properties of subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria isolated from rat cardiac muscle. *J. Biol. Chem.* **252**, 8731–8739 (1977).
287. Karoui, A. *et al.* An integrated functional and transcriptomic analysis reveals that repeated exposure to diesel exhaust induces sustained mitochondrial and cardiac dysfunctions. *Environ. Pollut. Barking Essex 1987* **246**, 518–526 (2019).
288. Bradshaw, R. A., Robinson, G. W., Hass, G. M. & Hill, R. L. The reaction of fumarase with iodoacetate and 4-bromocrotonate. *J. Biol. Chem.* **244**, 1755–1763 (1969).
289. Ford, E. S., Giles, W. H. & Mokdad, A. H. Increasing prevalence of the metabolic syndrome among u.s. Adults. *Diabetes Care* **27**, 2444–2449 (2004).
290. Isomaa, B. *et al.* Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care* **24**, 683–689 (2001).
291. Bostick, B. *et al.* Mineralocorticoid receptor blockade prevents Western diet-induced diastolic dysfunction in female mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **308**, H1126–1135 (2015).
292. Huby, A.-C., Tremblay, M. L. & Belin de Chantemele, E. J. Antagonistic effects of mineralocorticoid receptor (MR) blockade on the vascular reactivity of male and female leptinsensitized mice. *FASEB J.* **27**, 1131.16–1131.16 (2013).
293. Youcef, G. *et al.* Preventive and chronic mineralocorticoid receptor antagonism is highly beneficial in obese SHHF rats. *Br. J. Pharmacol.* **173**, 1805–1819 (2016).

294. Jia, G. *et al.* Endothelial Mineralocorticoid Receptor Deletion Prevents Diet-Induced Cardiac Diastolic Dysfunction in Females. *Hypertens. Dallas Tex 1979* **66**, 1159–1167 (2015).
295. Zhai, Y. *et al.* Fluvastatin decreases cardiac fibrosis possibly through regulation of TGF-beta(1)/Smad 7 expression in the spontaneously hypertensive rats. *Eur. J. Pharmacol.* **587**, 196–203 (2008).
296. Marzolla, V. *et al.* The novel non-steroidal MR antagonist finerenone improves metabolic parameters in high-fat diet-fed mice and activates brown adipose tissue via AMPK-ATGL pathway. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **34**, 12450–12465 (2020).
297. Le Billan, F. *et al.* Cistrome of the aldosterone-activated mineralocorticoid receptor in human renal cells. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **29**, 3977–3989 (2015).
298. Martínez-Martínez, E. *et al.* Aldosterone Target NGAL (Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin) Is Involved in Cardiac Remodeling After Myocardial Infarction Through NFκB Pathway. *Hypertens. Dallas Tex 1979* **70**, 1148–1156 (2017).
299. Kolkhof, P. *et al.* Finerenone, a novel selective nonsteroidal mineralocorticoid receptor antagonist protects from rat cardiorenal injury. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **64**, 69–78 (2014).
300. Kakou, A., Louis, H., Cattan, V., Lacolley, P. & Thornton, S. N. Correlation between arterial mechanical properties, vascular biomaterial and tissue engineering. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **37**, 71–75 (2007).
301. 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.* **26**, 1544–1550 (2005).
302. Hausladen, A. & Fridovich, I. Superoxide and peroxynitrite inactivate aconitases, but nitric oxide does not. *J. Biol. Chem.* **269**, 29405–29408 (1994).
303. Špinar, J., Špinarová, L. & Vítovec, J. EMPEROR reduced - empagliflozin in patients with heart failure and reduced ejection fraction. *Vnitr. Lek.* **67**, 43–47 (2021).

Annexes

Annexe 1	B. Bonnard, M. Pieronne-Deperrois, Z. Djerada, S. Elmoghrabi, P. Kolkhof, A. Ouvrard-Pascaud, P. Mulder, F. Jaisser, S. Messaoudi, Mineralocorticoid receptor antagonism improves diastolic dysfunction in chronic kidney disease in mice. JMCC (2018)
Annexe 2	B. Bonnard, E. Martinez-Martinez, A. Fernandez-Celis, M. Pieronne-Deperrois, Q-T. Do, I. Ramos, P. Rossignol, F. Zannad, P. Mulder, A. Ouvrard-Pascaud, N. Lopez-Andres, F. Jaisser. Scientific reports (2021)
Annexe 3	Valorisation scientifique

Accepted Manuscript

Mineralocorticoid receptor antagonism improves diastolic dysfunction in chronic kidney disease in mice

Benjamin Bonnard, Marie Pieronne-Deperrois, Zoubir Djerada, Soumaya Elmoghrabi, P. Kolkhof, Antoine Ouvrard-Pascaud, P. Mulder, Frédéric Jaisser, Smail Messaoudi



PII: S0022-2828(18)30368-7
DOI: doi:[10.1016/j.yjmcc.2018.06.008](https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2018.06.008)
Reference: YJMCC 8752

To appear in: *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*

Received date: 28 February 2018
Revised date: 11 June 2018
Accepted date: 27 June 2018

Please cite this article as: Benjamin Bonnard, Marie Pieronne-Deperrois, Zoubir Djerada, Soumaya Elmoghrabi, P. Kolkhof, Antoine Ouvrard-Pascaud, P. Mulder, Frédéric Jaisser, Smail Messaoudi, Mineralocorticoid receptor antagonism improves diastolic dysfunction in chronic kidney disease in mice. *Yjmcc* (2018), doi:[10.1016/j.yjmcc.2018.06.008](https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2018.06.008)

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

Mineralocorticoid receptor antagonism improves diastolic dysfunction in chronic kidney disease in mice.

Benjamin Bonnard¹, Marie Pieronne-Deperrois^{2*}, Zoubir Djerada^{2*}, Soumaya Elmoghrabi¹, Kolkhof P³, Antoine Ouvrard-Pascaud², Mulder P², Frédéric Jaisser^{1,4}, Smail Messaoudi¹.

1- Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Inserm U1138, Cordeliers Institute, Paris VI-University, Paris, France.

2- Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM U1096, FHU-REMEDI-VHF, Rouen, France

3- Cardiology Research, Bayer AG, Wuppertal, Germany.

4- Inserm, Clinical Investigation Centre 1433, Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

*Equally contributed

Corresponding author:

Frédéric Jaisser.

Adresse : Centre de recherche des Cordeliers. Inserm U1138. 15 rue de l'école de médecine.

Email: frederic.jaisser@inserm.fr

Abstract.

Managing the cardiovascular complications of renal failure is a major therapeutic challenge in clinical practice. Mineralocorticoid Receptor (MR) blockade is a highly effective strategy for the management of heart failure, but the use of MR antagonists (MRA) is limited by their side effects rendering them contraindicated in patients with renal failure. Finerenone is a new non-steroidal MRA that shows fewer hyperkalaemic events than the traditional steroidal MRAs and could therefore represent an alternative to these molecules in patients with damaged kidney function. The aim of this study is to characterize the effects of Finerenone on the cardiac complications of renal failure in a mouse model of chronic kidney disease (CKD). CKD was induced by subtotal nephrectomy (Nx), and finerenone was administered at a low dose (2.5 mg/kg/d) from week 4 to week 10 post-Nx. Cardiac function was assessed by echocardiography and invasive hemodynamics while cardiac fibrosis was measured by Sirius Red staining. Renal failure induced cardiac systolic and diastolic dysfunctions in the untreated CKD mice, as well as minor changes on cardiac structure. We also observed alterations in the phosphorylation of proteins playing key roles in the calcium handling (Phospholamban, Calmodulin kinase II) in these mice. Finerenone prevented most of these lesions with no effects on neither the renal dysfunction nor kaliemia. The benefits of finerenone suggest that activation of MR is involved in the cardiac complication of renal failure and strengthen previous studies showing beneficial effects of MRA in patients with CKD.

Keywords: Mineralocorticoid receptor; finerenone; cardio-renal syndrome; diastolic dysfunction.



OPEN

Antifibrotic effect of novel neutrophil gelatinase-associated lipocalin inhibitors in cardiac and renal disease models

Benjamin Bonnard^{1,7}, Ernesto Martínez-Martínez^{1,7}, Amaya Fernández-Celis², Marie Pieronne-Deperrois³, Quoc-Tuan Do⁴, Isbaal Ramos⁵, Patrick Rossignol⁶, Faiez Zannad⁶, Paul Mulder³, Antoine Ouvrard-Pascaud³, Natalia López-Andrés^{2,6,7} & Frédéric Jaisser^{1,6,7}✉

Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) is involved in cardiovascular and renal diseases. Gene inactivation of NGAL blunts the pathophysiological consequences of cardiovascular and renal damage. We aimed to design chemical NGAL inhibitors and investigate its effects in experimental models of myocardial infarction (MI) and chronic kidney disease induced by 5/6 nephrectomy (CKD) on respectively 8–12 weeks old C57Bl6/j and FVB/N male mice. Among the 32 NGAL inhibitors tested, GPZ614741 and GPZ058225 fully blocked NGAL-induced inflammatory and profibrotic markers in human cardiac fibroblasts and primary mouse kidney fibroblasts. The administration of GPZ614741 (100 mg/kg/day) for three months, was able to improve cardiac function in MI mice and reduced myocardial fibrosis and inflammation. The administration of GPZ614741 (100 mg/kg/day) for two months resulting to no renal function improvement but prevented the increase in blood pressure, renal tubulointerstitial fibrosis and profibrotic marker expression in CKD mice. In conclusion, we have identified new compounds with potent inhibitory activity on NGAL-profibrotic and pro-inflammatory effects. GPZ614741 prevented interstitial fibrosis and dysfunction associated with MI, as well as tubulointerstitial fibrosis in a CKD model. These inhibitors could be used for other diseases that involve NGAL, such as cancer or metabolic diseases, creating new therapeutic options.

Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) (also known as lipocalin-2, oncogene 24p3, siderocalin, or uterocalin) is a small circulating protein induced in a wide variety of pathological situations. Initially, NGAL was identified in mature neutrophil granules and shown to also be expressed in the kidney, prostate, and various epithelia¹. Over the last decade, NGAL has been shown to have a broad expression pattern and is expressed by renal, endothelial, and smooth muscle cells and hepatocytes, as well as cardiomyocytes, neurons, and various populations of immune cells, such as macrophages and dendritic cells.

Several studies have highlighted NGAL as a potent early biomarker of renal injury or as an inflammation biomarker^{2,3}. Other studies have shown that NGAL has a role in iron trafficking and chemotactic and bacteriostatic effects, as well as in differentiation, proliferation, and inflammation^{4–7}. NGAL participates in the epithelial-mesenchymal transition in vivo, as shown in a pulmonary adenocarcinoma model⁸, and in vitro in prostate and breast-cancer cells⁹. In these models, NGAL promotes the motility, invasiveness, and metastatic capacities of cancer cells. More recently, NGAL has also been shown to be involved in cardiovascular, metabolic, and renal diseases¹⁰. Indeed, gene inactivation in mice blunts the pathophysiological consequences of cardiovascular (myocardial infarction or ischemia)^{11,12}, renal (subtotal nephrectomy)¹³, and metabolic (high-fat diet)¹⁴ challenges.

¹INSERM, UMRS 1138, Centre de Recherche des Cordeliers, Sorbonne Université, Université de Paris, 15 rue de l'École de Médecine, 75006 Paris, France. ²Cardiovascular Translational Research, Navarrabiomed (Miguel Servet Foundation), Instituto de Investigación Sanitaria de Navarra (IdiSNA), Pamplona, Spain. ³Inserm U1096, UFR Médecine-Pharmacie, Rouen, France. ⁴Greenpharma SAS, Orléans, France. ⁵Innovative Technologies in Biological Systems SL (INNOPROT), Bizkaia, Spain. ⁶INSERM Centre d'Investigations Cliniques-Plurithématique 1433, UMR 1116, CHRU de Nancy, French-Clinical Research Infrastructure Network (F-CRIN) INI-CRCT, Université de Lorraine, Nancy, France. ⁷These authors contributed equally: Benjamin Bonnard, Ernesto Martínez-Martínez, Natalia López-Andrés and Frédéric Jaisser. ✉email: frederic.jaisser@inserm.fr

Overall, these data suggest that NGAL is a potential therapeutic target in several diseases. There is thus a need to find NGAL inhibitors that can be used as therapeutic agents in various disease settings. More precisely, we aimed to design chemical NGAL inhibitors and investigate the protective effects of pharmacological NGAL blockade in cardiac and renal fibrosis. We thus performed *in vitro* studies in human cardiac fibroblasts and primary mouse renal fibroblasts and *in vivo* experiments in myocardial infarction (MI) and chronic kidney disease (CKD) mouse models.

Results

Selection of potential disruptors of the NGAL-NGAL receptor interaction. We prepared a database of compounds for virtual screening and built *in silico* screening models for NGAL-interacting compounds prior to the virtual screening of compounds on NGAL-modulated pathways.

We used the www.ambinter.com database, containing more than 35 million molecular references. Our aim was to have access to as many molecules as possible for future virtual and real screening. These chemical catalogues are generally found in various formats that are not directly exploitable. We developed a procedure to “normalize” the structures that would go into the database: discard radioactive, metallic, products, or reactive products, pan-assay interfering compounds, separate salts from the main compounds, normalize the informatic representation of the chemical structures (aromatization, ionic states, etc.), and calculate the 3D structure of each compound. Natural compounds can present specific problems, such as fused rings or missing chirality information. In such cases, the most probable configurations were calculated according to their internal energies. Unity molecular fingerprints (which can be considered as bar-codes that identify molecules) were calculated for the molecules for subsequent diversity or similarity searches. Subsets of the database consisting of natural products, drug-like molecules, lead-like molecules, and molecules that interfere with protein–protein interactions were also built. A workflow for the preparation of the molecules was therefore applied for virtual screening¹⁵.

Several crystal structures of NGAL with siderophores are published in the Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>). Examination of these 3D structures, with or without siderophores, clearly shows that the general 3D structure of the protein does not change. Therefore, targeting the “main” binding site of siderophores may not exert significant effects, although we cannot rule this out. The biological activity of NGAL may be related to its interactions with a receptor. As the NGAL receptor could not be modelled (no crystallographic data and no reliable homologue with a known 3D structure), our strategy was based on blocking the interaction of NGAL with its receptor by identifying putative protein–protein interaction (PPI) disruptors. Based on the 3D structure of NGAL (PDB accession numbers: 1DFV & 1NGL), we surveyed potential “hot spots” (i.e. important residues for PPI) on the protein surface using ANCHOR¹⁶ (<http://structure.pitt.edu/anchor/>), an online software to analyse PPIs. We then identified two peripheral sites that may be druggable PPI zones (see Fig. 1A, red and cyan sites).

We selected potential disruptors of the NGAL-NGAL receptor interaction by virtual screening. This consisted of simulating the binding energy of a small molecule with NGAL binding sites. As there are significant differences between NMR and X-ray 3D structures of NGAL (RMSD = 4.6 Å calculated according to the backbone of 1DFV and 1NGL, see Fig. 1A), it was necessary to use these two structures as templates for modelling NGAL. Surflex-dock 2.7¹⁷, as implemented in Sybyl-X 2.1.1, was used for docking calculations. We identified two peripheral sites that may be druggable PPI zones. The “-pscreen” parameter was selected for virtual screening. Based on potential protein–protein interaction with NGAL, 32 potential hits were selected based on their docking score and after visual inspection. As an example, Fig. 1B shows the docking of GPZ614741 (one of the active molecules, see below) on a PPI site of NGAL.

Inhibitory activity of compounds selected after virtual screening. We previously reported that recombinant human NGAL (hNGAL) induced expression of inflammatory (IL6) and profibrotic (Col I, Col III) markers in HCFs¹¹. Thus, the inhibitory activity of the compounds was initially evaluated on hNGAL-induced IL6 secretion. Among the 32 compounds obtained by virtual screening, four compounds (GPZ614741, GPZ058225, GPZ425915 and GPZ413473) showed an important inhibitor effect on hNGAL-induced IL6 secretion (Table S1) and were tested for their effects on different intracellular fibrotic markers such as collagen I and III, fibronectin and galectin-3 (Table S2). In all cases, GPZ614741 (also named GP1) and GPZ058225 (also named GP2) were the most effective and were selected to create a second-generation compounds derived from GPZ614741 or GPZ058225 (Table S3). The inhibitory activity of 23s-generation compounds derived from GPZ614741 or GPZ058225 were next evaluated on hNGAL-induced IL6 secretion in HCFs (Table S4). Eleven were as efficient as GPZ614741 and GPZ058225 at inhibiting hNGAL-induced IL6 secretion, whereas the other tested compounds were unable to conserve their inhibitory effect (Table S4).

GP1 and GP2 fully inhibited NGAL-induced IL6 and Col1 secretion (Fig. 1C). The two selected compounds also blocked hNGAL-induced expression of intracellular profibrotic proteins (Col I, Col III, fibronectin, Gal3) (Fig. 1D), as well as cell proliferation (Fig. 1E).

To evaluate the dose dependent effect of NGAL inhibitor, we performed a dose–response of GP1 and GP2 on proliferation induced by NGAL in human cardiac fibroblasts (Fig. S2). Both compounds were able to block the proliferative effects of NGAL at 1 and 10 μM, but not at lower concentrations (Fig. S2). GP1 and GP2 at 1 μM did not prevent the increase in IL6 secretion induced by NGAL (Fig. S3), indicating that 10 μM is an efficient concentration to inhibit IL6 secretion induced by NGAL in HCF cells. In mouse kidney fibroblasts (MKFs) co-treated with NGAL + GP1 at 1 μM, collagen I expression was prevented but not those of fibronectin, αSMA, IL6 and MCP1 (Fig. S4). To assess the specificity of GP1 for NGAL, we treated HCFs and MKFs with recombinant TGFβ, a known profibrotic and proinflammatory stimulus. TGFβ increased IL6 and Col I secretion in HCFs (Fig. S5) and induced gene expression of Col I, Fibronectin and IL6 in MKFs (Fig. S6). GP1 has no inhibitory

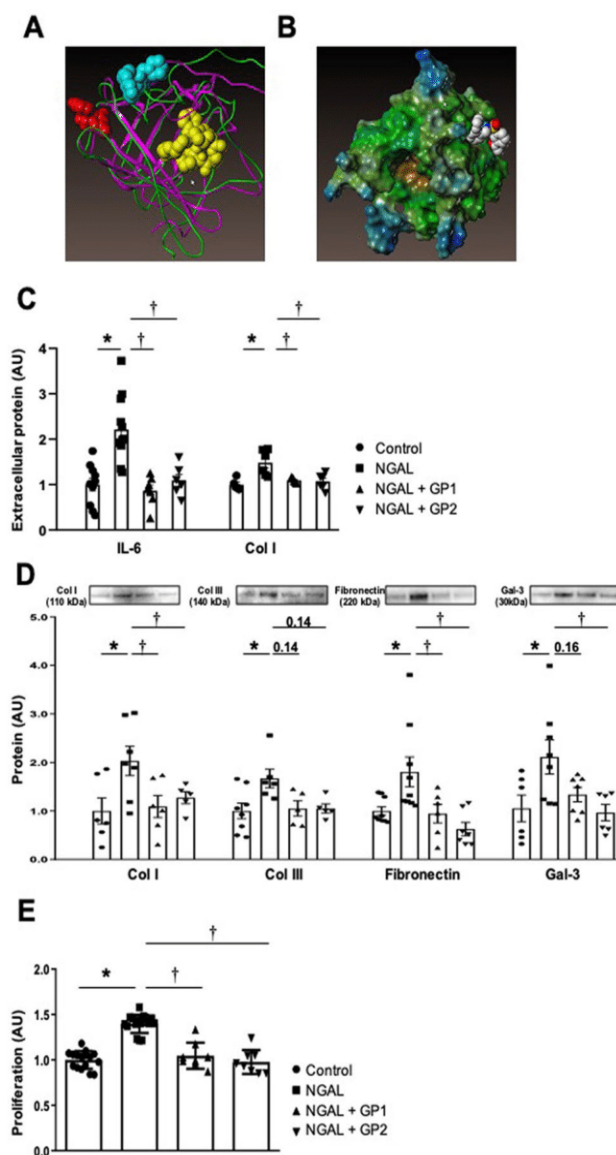


Figure 1. (A) Difference in the 3D structure of NGAL as determined by X-rays (1DVF, magenta) and NMR (1NGL, green). The main site is represented by yellow spheres and the two peripheral sites by red and cyan spheres. (B) Interaction of GPZ614741 with the NGAL PPI site. Effects of GP1 (GPZ614741) and GP2 (GPZ058225), at 10 μ M, on (C) IL6 and Col I secretion, (D) cellular content of Col I, Col III, fibronectin, and Gal-3, and (E) cell proliferation in hNGAL-treated human cardiac fibroblasts. The full-length gel and bands are included in the Supplementary Fig. 10. * $p < 0.05$ vs. Control. † $p < 0.05$ vs. NGAL-treated human cardiac fibroblasts.

effect over the TGF β effects, supporting the view that GP1 has no off-target effects on profibrotic and proinflammatory pathways (Figs. S5,S6).

Cell toxicity and absorption, distribution, metabolism, and excretion (ADME) tests. An ADME-Tox panel (Table S5) showed GP1 to be nontoxic for hepatocytes (MTT, up to 0.1 mM) and cardiomyocytes (hERG predictor assay). The PPB was low and fully stable to acidic pH. It was also perfectly soluble in aqueous buffers and partially processed by CYP3A4. The ADME-Tox panel showed GP2 to have no significant hepatotoxicity (>0.1 mM) or cardiotoxicity (it did not block the hERG channel). GP2 bound to plasma proteins within an acceptance range. It showed mild solubility problems (only 63% in the solubility test) and the CYP3A4 isoform appeared to be involved in its processing (inhibited the enzyme activity in a competition assay by 32%) (Table S5).

Based on the efficacy and ADME-TOX results, we next tested whether oral administration of GP1 (GPZ614741) could efficiently prevent the cardiac and renal impact of MI or subtotal nephrectomy in vivo, respectively.

Impact of GP1 (GPZ614741) in a myocardial infarction mouse model. We previously reported that *Lcn2* (NGAL) gene inactivation blunts the functional and morphological consequences of MI¹¹. We therefore

Cardiac parameters	Sham	MI	MI + GP1
HW/TL (mg/mm)	8.5 ± 0.4	10.9 ± 0.4*	11.3 ± 0.8*
LVW/TL (mg/mm)	6.2 ± 0.3	8.3 ± 0.3*	8.8 ± 0.6*
LVEDD (mm)	3.33 ± 0.08	6.31 ± 0.12*	5.88 ± 0.39*
LVESD (mm)	2.03 ± 0.05	5.47 ± 0.13*	4.90 ± 0.39*
FS (%)	39 ± 0.93	13.4 ± 1.0*	17.2 ± 1.3*
SV (ml/beat)	0.092 ± 0.003	0.062 ± 0.005*	0.086 ± 0.004†
CO (ml/min)	39.7 ± 2.0	29.4 ± 1.9*	47.1 ± 3.3†
LVEDP (mmHg)	2.73 ± 0.95	5.91 ± 0.49*	4.41 ± 0.57
LVESP (mmHg)	85.05 ± 1.39	78.82 ± 2.76	82.31 ± 4.22
LV (dP/dt _{max})	5220 ± 229	3894 ± 259*	4501 ± 320
LV (dP/dt _{min})	4874 ± 550	3117 ± 253*	4487 ± 413†
tau e	6.05 ± 0.30	7.97 ± 0.45*	6.08 ± 0.27†
tau 1/2	4.43 ± 0.20	5.82 ± 0.32*	4.33 ± 0.21†
Renal parameters	Sham	CKD	CKD + GP1
KW/TL (mg/mm)	9.40 ± 0.26	11.5 ± 0.42*	11.3 ± 0.23*
SBP (mmHg)	115 ± 0.75	139.3 ± 2.22*	122.1 ± 2.58†
Plasma creatinine level (mM)	4.14 ± 1.30	21.5 ± 1.45*	20.4 ± 1.54*
Plasma urea level (mM)	7.11 ± 0.34	15.2 ± 0.36*	16.74 ± 1.86*

Table 1. Cardiac parameters in the myocardial infarction animal model and renal parameters in the chronic kidney disease animal model. *HW/TL* heart weight/tibia length; *LVW/TL* left ventricle weight/tibia length; *LVEDD* left ventricular end diastolic diameter; *LVESD* left ventricular end systolic diameter; *FS* Fractional shortening; *SV* stroke volume; *CO* cardiac output; *LVEDP* left ventricular end systolic pressure; *LVESP* Left ventricular end systolic pressure; *LV dP/dt_{max}* and *dP/dt_{min}* contractility and relaxation index, respectively; *tau-e* and *tau 1/2* relaxation constants; *KW/TL* kidney weight/tibia length; *SBP* systolic blood pressure. **p* < 0.05 vs. Sham. †*p* < 0.05 vs. MI or CKD mice.

tested whether the GP1 compound mimicked the genetic inactivation of *Lcn2/NGAL* in a murine MI model. As shown in Table 1, three months administration of GP1 (100 mg/kg/day in the food) induced a significant increase in fractional shortening (FS) resulting from a slight, statistically non-significant decrease in both the LV end diastolic and systolic diameters (LVDD and LVSD, respectively) relative to those of the non-treated MI group. At the same time-point, both stroke volume (SV) and cardiac output (CO) were higher in the GP1-treated group than the non-treated MI group.

Three months of treatment with GP1 (100 mg/kg/day in the food) did not modify the LV end-systolic pressure (LVESP) relative to that of the MI non-treated group and resulted in a trend towards an increase in the LV dP/dt_{max} (*p* = 0.07) (Table 1). Moreover, the LV end-diastolic pressure (LVEDP) tended to be lower in the MI GP1-treated group, whereas the increase in the LV dP/dt_{min}, together with the decrease in the LV relaxation constant Tau, indicated an improvement in diastolic relaxation upon chronic treatment.

Treatment with GP1 (100 mg/kg/day in the food) resulted in a significantly lower LV interstitial collagen deposition than in the non-treated MI group (Fig. 2A). Three months of treatment with GP1 significantly prevented the upregulation of Col I, αSMA and CTGF observed in the non-treated MI group (Fig. 2B–D). The infarct size in mid LV sections was similar between GP1-treated vs. untreated infarcted mice (infarct size %: untreated 39.0 ± 2.3, GP1-treated 40.0 ± 1.8, *n* = 4–9, NS). Permanent coronary artery ligation induces transmural infarction and the inhibition of NGAL did not affect collagen levels in the infarct zone which contained only fibrosis (Fig. S7). Treatment with GP1 significantly prevented the upregulation of cardiac protein levels of IL6 and the expression of inflammatory markers, such as CD68 (marker of monocytes lineage), CD80, and CD86 (markers of macrophages) (Fig. 2E).

Impact of GP1 (GPZ614741) on renal fibroblasts and the kidney in a CKD mouse model. We next tested whether GP1 blunted recombinant mNGAL-induced expression of profibrotic/proinflammatory markers in mouse primary renal fibroblasts (MKF) and whether in vivo administration of GP1 in the 5/6 Nx CKD mouse model had a similar effect as that reported for *Lcn2/NGAL* gene inactivation¹³.

MKF were stimulated with recombinant murine NGAL (mNGAL), with or without GP1. GP1 inhibited mNGAL-induced expression of profibrotic (Col I, fibronectin, αSMA) (Fig. 3A) and inflammatory (IL6, MCP1) markers (Fig. 3B).

In vivo administration of GP1 had no impact on functional parameters, such as plasma levels of urea or creatinine (neither one nor two months after CKD induction) (Table 1), indicating that GP1 did not blunt renal dysfunction associated with CKD in the 5/6 nephrectomy model. However, two months of GP1 administration prevented the increase in blood pressure observed in this CKD model (Table 1).

We next analyzed whether the anti-fibrotic and anti-inflammatory effects observed in the MI model were also present in the mouse CKD model. Two months of GP1 administration had a strong antifibrotic effect in vivo by blunting the renal tubulointerstitial fibrosis associated with CKD (Fig. 4A). Both CKD and CKD + GP1 mice did

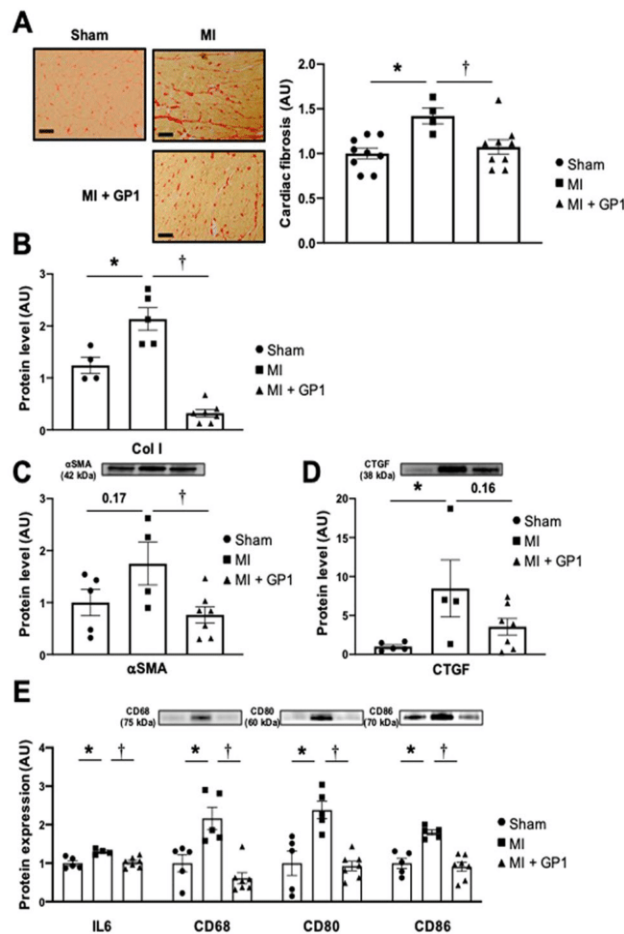


Figure 2. Effect of three months of GP1 (GPZ614741) administration. (A) Representative microphotographs and quantification of interstitial fibrosis. (B) Col I, (C) αSMA, (D) CTGF and (E) proinflammatory markers (IL6, CD68, CD80, and CD86) protein levels in Sham, MI, and MI + GP1 (GPZ614741)-treated mice. The full-length gel and bands are included in the Supplementary Fig. 11. * $p < 0.05$ vs. Sham. † $p < 0.05$ vs. MI mice.

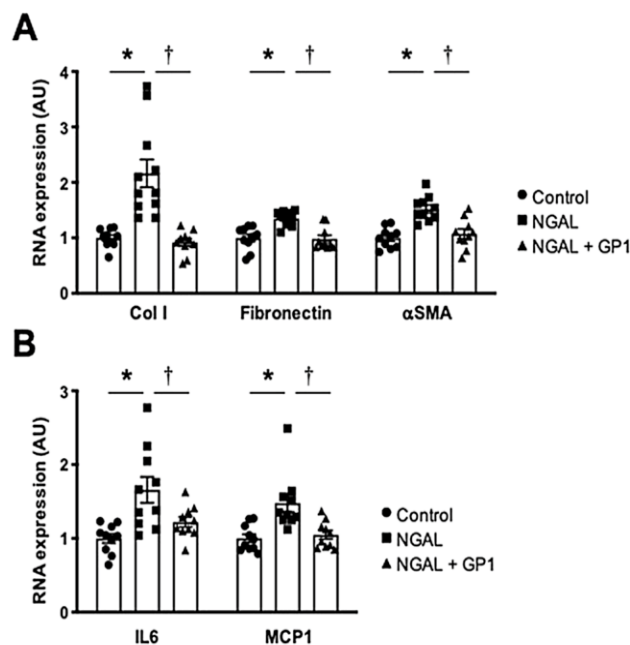


Figure 3. Effect of GP1 (GPZ614741), at 10 μM, on mRNA levels of (A) profibrotic markers (Col I, fibronectin and αSMA) and (B) proinflammatory markers (IL6 and MCP1) in mNGAL-treated MKF cells. * $p < 0.05$ vs. Control. † $p < 0.05$ vs. NGAL-treated MKF cells.

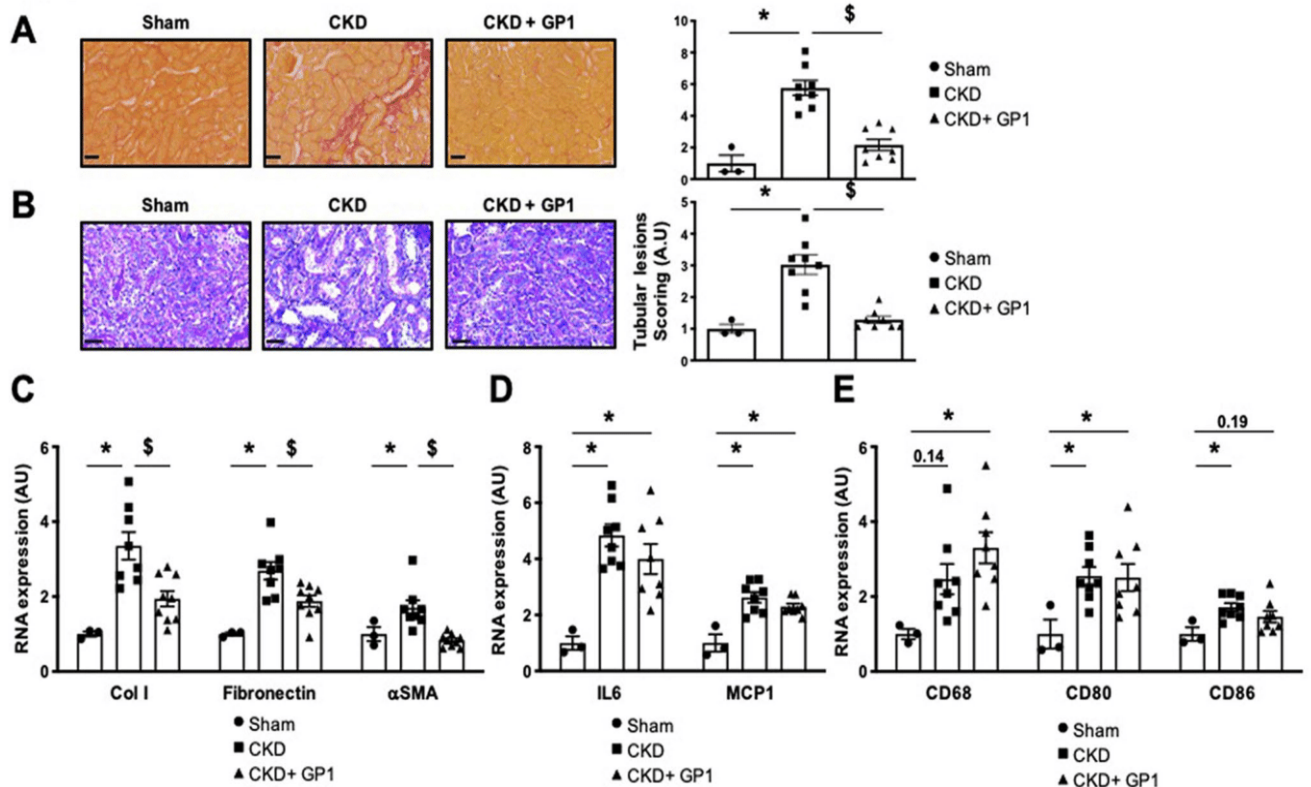


Figure 4. Effect of two months of GP1 (GPZ614741) administration. (A) Representative microphotographs and quantification of Sirius red staining and (B) Periodic acid-Schiff staining (scale bar 50 μ m), and (C) mRNA expression of profibrotic markers (Col I, fibronectin and α SMA), (D) proinflammatory markers (IL6 and MCP1), and (E) CD68, CD80, and CD86 in a CKD mouse model. * $p < 0.05$ vs. Sham. † $p < 0.05$ vs. CKD mice.

not show collagen deposition in glomeruli compared to Sham group (Fig. S8). Tubular lesion scoring revealed that GP1 prevented tubular injury induced by CKD ($\times 3.1$ in CKD vs. Sham mice) (Fig. 4B). GP1 administration also blunted the increased expression of profibrotic markers (Col I, fibronectin, α SMA) (Fig. 4C) but not those of inflammatory markers, such as IL6 and MCP1 (Fig. 4D), CD 68, CD80, or CD86 (Fig. 4E).

Discussion

We have identified several compounds with potent inhibitory activity on the NGAL-mediated expression of profibrotic and pro-inflammatory markers and cell proliferation in two primary cell cultures of fibroblasts of human cardiac or murine renal origin. One of the compounds, GP1, showed efficient *in vivo* activity to prevent the interstitial fibrosis associated with MI and CKD. The effects of GP1 (GPZ614741) on cardiac function, fibrosis, and inflammation mimics the functional, molecular, and histological impact of global genetic inactivation of *Lcn2* in the same MI model that we previously reported in Martinez-Martinez et al.¹¹. In the CKD model, the effect was only partial relative to global genetic *Lcn2* inactivation. Although the effect of GP1 on renal fibrosis mimicked the effect of global genetic inactivation of *Lcn2*, it did not improve renal function or inflammation. The reason for these differences may be related to heterogeneous intrarenal tissue distribution of the compound, which may thus, for example, not have an effect on glomerular function. The absence of effect on renal inflammatory markers is more puzzling, given the good inhibitory effect of GP1 on NGAL-induced inflammatory gene expression in primary kidney fibroblasts, as well as *in vivo* in the MI model. Of note, GP1 blunted the increased blood pressure normally associated with CKD. This may be related to the vascular impact of NGAL, which has indeed been previously reported upon metabolic challenge in mice¹⁴. Further studies are required to determine the possible mechanisms related to blood pressure control.

NGAL/Lipocalin-2 (LCN-2) is a member of the broader lipocalin family, which includes over 20 soluble proteins, most of which are extracellular¹. This family is evolutionarily conserved and found in various lineages from bacteria to plants, invertebrates, and vertebrates¹⁸. Lipocalins have a three-dimensional structure (lipocalin domain) in which eight β -strands form a symmetrical β -barrel fold with a cylindrical shape. The β -barrel structure provides a hydrophobic cavity to bind to a variety of lipophilic ligands, including retinoic acid, progesterone, prostaglandin, fatty acids, steroids, leukotriene B4, and platelet activating factor^{1,18}. NGAL/Lipocalin 2 is produced by a variety of cells of the cardiovascular and renal systems, adipocytes, and inflammatory cells and is also found in brain, bone, gut, liver, etc. Two different cell-surface receptors for NGAL/LCN2 have been described: solute carrier family 22 member 17 (SLC22A17, 24p3R or NGALR2) and low-density lipoprotein-related protein 2 (LPRP2 or megalin). High levels of 24p3R are expressed by specific cells, including macrophages, neutrophils, lung and gut epithelia, kidney epithelial cells, vascular cells and cardiomyocytes, astrocytes, microglia, and neurons. Megalin, a multi-ligand endocytic receptor, is highly expressed by certain types of absorptive epithelial

cells, such as thyroid cells, epididymal cells, renal proximal tubule cells, and neuro-epithelium. Sensory organs, including the eye (specifically, retinal ganglion cells) and ear, also express megalin¹⁸.

Such a broad expression pattern of NGAL/LCN2 and its receptors suggests a potential role in a multitude of physiological and/or pathological processes. The use of mouse models with genetic inactivation of *Lcn2* has allowed exploration of these roles, revealing both detrimental and beneficial effects of NGAL/LCN2. Global *Lcn2* gene inactivation has beneficial effects in the cardiovascular system (recently summarized in Buonafina et al.)¹⁹. However, contrasting results have been reported in the kidney, for which the injection of recombinant NGAL in acute kidney injury provides a benefit²⁰ but NGAL/LCN2 has a deleterious role in CKD progression^{13,21}. As reported here, NGAL/LCN2 plays a major role in end-organ damage and organ fibrosis in both cardiac- and renal-disease models. *Lcn2* knockout mice also revealed the important metabolic effects of NGAL/LCN2, with higher body and adipose tissue weight in *Lcn2* KO than wild type mice, as well as insulin resistance, but a benefit of LCN2 was also been reported in being of adipocytes and increased thermogenesis²². Detrimental roles of NGAL/LCN2 have been shown in cancer. NGAL/LCN2 induces proliferation and stimulates AKT and HIF1- α activation, thus promoting angiogenesis and invasion. Moreover, NGAL can form a complex with MMP9, increasing ECM degradation and favoring metastasis²³. Finally, NGAL/LCN2 is a pleiotropic mediator of various inflammatory processes. Lipocalin-2 has been shown to cause M1 macrophage polarization, while suppressing the formation of the M2 macrophage phenotype, to favor inflammation via the recruitment of inflammatory cells, such as neutrophils, and the induction of pro-inflammatory cytokines.

On the other hand, NGAL/LCN2 is required to limit infection. LCN2 was indeed first identified as a neutrophil granule component with a strong binding affinity to bacterial siderophores. As iron is essential for bacterial growth, NGAL/LCN2 has a bactericidal effect against a number of bacterial species by chelating siderophore-bound iron and making it unavailable for bacterial use. NGAL/LCN2 also plays an important role in immune activation during acute infection. However, LCN2 was shown to worsen the outcome in pneumococcal pneumonia infection by deactivating alveolar macrophages in an animal model²⁴. NGAL/LCN2 also acts as a source of iron to *Mycobacterium tuberculosis* in infected macrophages, facilitating mycobacterial growth in vivo.

Overall, NGAL/LCN2 plays a critical role in the differential regulation of inflammation during acute infections and the progression of several chronic diseases. This Janus face/dual role suggests that NGAL/LCN2 could be an important therapeutic target in chronic diseases, but caution must be exercised in the acute setting, especially during infectious diseases in which limiting the action of NGAL/LCN2 may be deleterious.

Several ways could be used to modulate NGAL/LCN2 expression and/or activity. A few studies have used anti-NGAL antibodies, demonstrating neutralizing activity in vivo in the mouse. Anti-NGAL antibody treatment attenuated immune-cell recruitment, such as neutrophil and macrophages, in a cardiac ischemia reperfusion (IR) injury model, along with suppressed M1 marker expression and increased M2 marker expression²⁵. The role of NGAL in neutrophil recruitment has also been assessed in the liver; neutralization of NGAL by antibody injections protected mice from hepatic injury and neutrophil infiltration induced by alcohol challenge²⁶. Similarly, neutralizing NGAL antibodies reduced Ly6G neutrophil infiltration in two different psoriasis models²⁷, leading to the diminution of proinflammatory gene expression (IL6, IL8, IL17, IL1 β and IL23)⁶. In patients with an abdominal aortic aneurysm (AAA), NGAL levels are elevated in the plasma and AAA tissue^{28,29}. In a mouse model of AAA, Tarín et al. showed that genetic deletion of *Lcn2* or neutralization of NGAL with polyclonal anti-NGAL antibody injections protected against AAA-induced lesions, with lower neutrophil infiltration and the diminution of MMP activity³⁰. In contrast, Saha et al. showed that antibody-mediated neutralization of NGAL exacerbates DSS-induced colitis³¹, highlighting a protective role of NGAL in this model. Anti-NGAL antibodies lower tissue iron concentrations in a dose-dependent manner, which could starve cancer cells, thus reducing metastasis³². In cancer, NGAL is known to promote EMT through the alteration of E/N-cadherin expression⁹. Treatment of MCF-7 breast cancer cells (which have a metastatic tumor cell phenotype) with anti-NGAL antibodies prevented changes in E/N-cadherin expression relative to their control³³ and anti-NGAL antibody administration decreased lung metastasis in a mouse model of breast cancer²³.

Another possible therapeutic approach would be to reduce NGAL expression by RNA interference. Guo et al. engineered an encapsulating liposome delivery system to target LCN2 siRNA in cells via the intercellular adhesion molecule (ICAM)-1. This approach was used to treat breast-cancer cells, reducing angiogenesis and tumor progression in vivo in a xenograph mouse model³⁴.

Our approach was to identify small molecules that interfere with NGAL signaling in human fibroblasts. We identified several candidates and provide a proof of concept study that at least one of them efficiently reduces ECM remodeling in vivo in two preclinical models of CV and renal diseases. These inhibitors could be tested in other diseases that involve NGAL, such as metabolic and cardiovascular diseases or cancer, such as breast or prostate cancers, for which genetic *Lcn2* inactivation and NGAL-neutralizing antibodies have proven to be beneficial.

Limitations

Our proof of concept study had several limitations. Full characterization of the hits we identified is now required to precisely identify binding modes and in vivo pharmacodynamic and pharmacokinetic properties in various disease models. Moreover, additional structure activity relationship studies should be performed to identify derivatives with higher efficacy. As a proof of principle, we tested in vivo only one of the NGAL inhibitors at one fixed dose. Several studies should now be performed to test various doses, as well as the other compounds that we have shown to be active ex vivo using various readouts.

Methods

The study was carried out in compliance with the ARRIVE guidelines.

Compounds. 3-Acetyl-N-[2-(1H-pyrazol-1-yl)phenyl]methyl-benzenesulfonamide (GPZ614741, CAS 1241512-52-6) has been synthesized according to the scheme presented in Fig. S1. To a solution of [2-(1H-pyrazol-1-yl)phenyl]methylamine (3.0 g) in pyridine (20 mL) was slowly added 3-acetylbenzylsulfonyl chloride (4.17 g) at 0 °C, and the mixture was stirred overnight at 115 °C. After cooling down, the reaction solution was concentrated under reduced pressure. The residue was then dissolved in dichloromethane, washed with HCl 2 N, a saturated aqueous solution of NaHCO₃ and saturated brine, then dried over magnesium sulfate, and concentrated under reduced pressure. The residue was finally purified by flash column chromatography (1: 1EtOAc/petroleum ether) to give the title compound as a white solid (5.72 g, 93% yield). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.27 (t, J = 1.6 Hz, 1H), 8.01 (dt, J = 1.6 and 8.0 Hz, 1H), 7.96 (dt, J = 1.6 and 8.0 Hz, 1H), 7.69 (d, J = 1.2 Hz, 1H), 7.63 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.48 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 7.30–7.26 (m, 2H), 7.18–7.14 (m, 2H), 6.45 (t, J = 2.2 Hz, 1H), 4.08 (d, J = 6.4 Hz, 2H), 2.55 (s, 3H).

Other compounds used in the present study are commercialized by Ambinter (see Tables S6,S7).

Cell toxicity and absorption, distribution, metabolism, and excretion (ADME) tests. Several parameters have been evaluated to determine ADME-Tox profile of the compounds. Two specific toxicity assays have been performed to assess hepatotoxicity and cardiotoxicity. Hepatotoxicity was evaluated in isolated hepatocytes from swiss mice and determined by the thiazolyl blue tetrazolium bromide colorimetric assay (sigma, St Louis, MO, USA). Cardiotoxicity was evaluated using the commercially available Predictor hERG fluorescence polarization kit (Thermo Fisher Scientific, Illinois, USA). Several absorption, distribution, metabolism, and excretion (ADME) assays have been carried out. The following experiments were undertaken: stability in human microsomes, binding to human plasma protein, and CYP3A4 inhibition assay (Vivid CYP3A4 assay, Thermo Fisher Scientific, Illinois, USA). Physico-chemical properties were also assessed such as aqueous solubility and chemical stability.

Cell culture. Primary human cardiac fibroblasts (HCF) were obtained from Promocell (Heidelberg, Germany) and maintained in Fibroblast Media 3 following manufacturer's instructions (Promocell). Cells were used between passages 5 and 7. Cells were stimulated with recombinant hNGAL (500 ng/mL, R&D Systems) or with TGFβ (10 ng/mL, R&D Systems) for 24 h. To assess cell proliferation the MTT test was used following provider's instructions (Roche). For protein analysis. Primary Mouse Kidney Fibroblasts (MKF) were isolated from Wild Type (WT) mice. Briefly, 8 weeks old mice were sacrificed by cervical dislocation and kidneys were cleaned and rinsed in cold DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline). The renal cortex was minced and incubated in Dulbecco's modified eagle medium/Nutrient mixture F-12 (DMEM/F12, Sigma) containing 1 mg/mL collagenase A (Roche) during 25 min at 37 °C. The digestion was inactivated by adding culture medium (DMEM/F12 + 10% FBS) then the cell suspension was passed through a 100-μm cell strainer. After centrifugation, the pellet (containing MKF) was diluted with culture medium then plated in 75 cm² culture flask. After 24 h MKF were washed with DPBS before replacement of fresh culture medium. Thereafter, culture medium was changed every 48 h. Once 70–80% confluent, MKF were trypsinized and plated in 12 or 6-well plates. For experimental use, MKF were starved with culture medium containing only 3% FBS. MKF were treated with mNGAL (500 ng/mL, R&D Systems) or with TGFβ (10 ng/mL, R&D Systems) for 6 h for gene expression analysis.

Animal experiments. Animals were housed in a climate-controlled facility with a 12-h/12-h light/dark cycle and provided free access to food and water. Experiments were approved by the Darwin ethics committee of Sorbonne University, and conducted according to the INSERM animal care and use committee guidelines. The NGAL inhibitor GP1 was incorporated in regular chow (A04, Safe, Augy, France) at the dose of 625 mg GP1/kg of chow to achieve a low dose of 100 mg/kg/day of GP1 administered to the mice (based on a daily consumption of 4 g of chow).

Myocardial infarction (MI) was induced as previously described¹¹. Briefly, Chronic Heart Failure (CHF) resulted from left ventricle MI that was induced by left coronary artery ligation in 8 week-old male mice. Mice were anesthetized with intraperitoneal injections of ketamine (90 mg/kg, Merial, France) and xylazine (3.6 mg/kg, Bayer, France), followed by artificial ventilation. Anesthesia and sedation were controlled by monitoring heart rate and by performing paw pinch reflex and corneal reflex tests, before a thoracotomy was performed. The left main coronary artery was ligated close to its origin. After surgery, analgesia was prolonged during the awakening phase by an intramuscular injection of Bepirucare (50 μg/kg). Post-infarction mortality in this mouse model is about 30–40%, primarily occurring around days 4–7 after MI. Sham-operated mice (control) were subjected to the same protocol except that the artery was not ligated. The inhibitor was administered the 8 day after MI for the indicated period. Tissue were harvested after 12 weeks after MI. Left ventricle diastolic and systolic diameters were measured in anesthetized (isoflurane 1.5%) mice, according to the American Society of Echocardiography's leading-edge method (using Vivid 7 echograph a 14 MHz probe). In addition, LV outflow velocity was measured by pulsed waves, and CO was calculated as follows:

$$CO = \text{aortic VTI} \times [\pi \times (\text{LV outflow diameter}/2)^2] \times \text{heart rate, where VTI is velocity-time integral.}$$

LV hemodynamic was assessed as described previously¹¹. Briefly, mice were anesthetized (chloral 320 mg/kg, IP) and the carotid artery cannulated with a pressure-volume catheter (SPR839, Millar-Instruments, USA) and the catheter was advanced into the LV. Pressure-volume loops were obtained at baseline and during loading by gently occluding the abdominal aorta. LV end-systolic and end-diastolic pressures, dP/dt_{max/min}, LV relaxation constant tau and were measured/calculated with IOX software (EMKA, France). Systolic BP was measured by tail-cuff plethysmography in trained conscious mice at weeks 8–10 using a BP2000 Visitech model. BP was measured every day in the same room at the same hour for 5 consecutive days. The BP measurements (expressed as mmHg) presented are the averages of the last 3 days.

Chronic kidney disease (CKD) was induced by subtotal nephrectomy in 8-week-old male mice (25–26 g). All surgeries were performed under ketamine/xylazine anaesthesia. Briefly, the left kidney was exposed, and the upper and lower poles were tied with a poly-glycolic acid suture line. The peritoneum and skin were then sutured, and the animals were returned to their individual cages. After 1 week of recovery, the second kidney was removed. Removal of the second kidney represents T0. Sham mice were subjected to the same surgical procedures but neither renal poles nor the right kidney were removed. Mice were monitored for any sign of distress, and those observed to be experiencing severe, unrelievable pain were euthanized. Renal failure was assessed by the measure of plasma creatinine and urea with an automatic analyser (Konelab 20i; Thermo Fisher Scientific, Vernon Hills, IL) at weeks 4 and 8 post-Nx.

Histology and molecular biology. In the MI model, heart was harvested after hemodynamics and the atria and the ventricles were separated and weighed individually. A section of the left ventricle was immersed in Bouin fixative solution. In the CKD model, kidneys were harvested and a section was immersed in paraformaldehyde fixative solution. After fixation, the sections were dehydrated and embedded in paraffin. From these sections, 5- μ m thick histologic slices were obtained and were stained with Sirius Red. For the measurement of cardiac or renal collagen density, slides were examined and photographed under a light microscope (Zeiss) at 40 \times magnification. Collagen content was calculated as percentage of collagen area to total area of the image. Perivascular collagen was excluded from the analysis. For tubular lesions scoring, kidney slides were stained with Periodic Acid-Schiff kit (Sigma) and the score of tubules with injury (epithelial cell necrosis and detachment, and tubular dilation) was analyzed blinded to the experimental groups.

Western-blot analysis. Total protein aliquots of 20 μ g were prepared from cardiac homogenates and HCF and electrophoresed on SDS polyacrylamide gels and transferred to Hybond-c Extra nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences). Membranes were incubated with primary antibodies for: Collagen I (Santa Cruz; dilution 1:500), Collagen type III (Santa Cruz; dilution 1:500), fibronectin (Millipore, 1:500), Galectin-3 (Thermo, 1:1000), α -SMA (Sigma, 1:1000), CTGF (Santa Cruz, 1:200), CD68 (Abcam, 1:500), CD80 (Santa Cruz, 1:500), CD86 (Santa Cruz, 1:500). Stain free detection was used for loading control (Bi-Rad Laboratories, CA, USA) After washing, the blots were incubated with peroxidase-conjugated secondary antibody, and binding revealed by ECL chemiluminescence (Amersham). After densitometric analyses, optical density values were expressed as arbitrary units. Results are expressed as an n-fold increase over the values of the control group in densitometric arbitrary units.

ELISA. IL6 and collagen type I concentrations were measured in cardiac tissue and cell supernatants by ELISA according to the manufacturer's instructions (R&D Systems).

Proliferation. Cell proliferation was assessed using the MTT Proliferation Assay (Sigma).

Real-time reverse transcription PCR. Frozen tissues (kidneys, heart) were homogenized in TRIzol (Life Technologies, Illinois, USA) using FastPrep beads (MP-Bio, CA, USA). cDNAs were generated using the Superscript II reverse transcriptase kit (Invitrogen, NY, USA), and qPCR was performed as previously described. Briefly, transcript levels were analysed in a CFX396 apparatus (Biorad). The reactions were performed in duplicate for each sample using the IQ SYBR Green supermix Kit (Biorad, CA, USA). To normalize gene expression, the geometric mean of multiple internal reference genes were used (*RS16*, *Ubc*, *Hprt* and *Gapdh* for mice experiments). Values in control conditions were set as 1 for each gene. The sequences of the specific primers are detailed in Table S8.

Statistical analyses. All data are presented as the mean \pm SEM. $p < 0.05$ was considered significant. Distributions were verified using the Kolmogorov–Smirnov test. Differences in the means between two groups for non-repeated variables were compared by Student's *t* test. Differences in the means among groups and treatments were compared by one-way ANOVA for multiple comparisons, followed by Tukey's correction for multiple comparisons (GraphPad).

Received: 2 August 2020; Accepted: 19 January 2021

Published online: 28 January 2021

References

- Li, D., Yan Sun, W., Fu, B., Xu, A. & Wang, Y. Lipocalin-2-The myth of its expression and function. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **127**, 142–151 (2019).
- Zhang, J. *et al.* Clinical significance of novel biomarker NGAL in early diagnosis of acute renal injury. *Exp. Ther. Med.* **14**, 5017–5021 (2017).
- Tornblom, S. *et al.* Urine NGAL as a biomarker for septic AKI: A critical appraisal of clinical utility-data from the observational FINNAKI study. *Ann. Intensive Care.* **10**, 51 (2020).
- Bao, G. *et al.* Iron traffics in circulation bound to a siderocalin (Ngal)-catechol complex. *Nat. Chem. Biol.* **6**, 602–609 (2010).
- Schroll, A. *et al.* Lipocalin-2 ameliorates granulocyte functionality. *Eur. J. Immunol.* **42**, 3346–3357 (2012).
- Shao, S. *et al.* Increased lipocalin-2 contributes to the pathogenesis of psoriasis by modulating neutrophil chemotaxis and cytokine secretion. *J. Invest. Dermatol.* **136**, 1418–1428 (2016).

7. Goetz, D. H. *et al.* The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. *Mol. Cell.* **10**, 1033–1043 (2002).
8. Mongre, R. K. *et al.* Epigenetic induction of epithelial to mesenchymal transition by LCN2 mediates metastasis and tumorigenesis, which is abrogated by NF- κ B inhibitor BRM270 in a xenograft model of lung adenocarcinoma. *Int. J. Oncol.* **48**, 84–98 (2016).
9. Yang, J. *et al.* Lipocalin 2 promotes breast cancer progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **106**, 3913–3918 (2009).
10. Legrand, M. & Rossignol, P. Cardiovascular consequences of acute kidney injury. *N. Engl. J. Med.* **382**, 2238–2247 (2020).
11. Martínez-Martínez, E. *et al.* Aldosterone target NGAL (neutrophil gelatinase-associated lipocalin) is involved in cardiac remodeling after myocardial infarction through NF κ B pathway. *Hypertension* **70**, 1148–1156 (2017).
12. Sung, H. K. *et al.* Lipocalin-2 (NGAL) attenuates autophagy to exacerbate cardiac apoptosis induced by myocardial ischemia. *J. Cell Physiol.* **232**, 2125–2134 (2017).
13. Viau, A. *et al.* Lipocalin 2 is essential for chronic kidney disease progression in mice and humans. *J. Clin. Invest.* **120**, 4065–4076 (2010).
14. Song, E. *et al.* Deamidated lipocalin-2 induces endothelial dysfunction and hypertension in dietary obese mice. *J. Am. Heart Assoc.* **3**, e000837 (2014).
15. Gally, J. M., Bourg, S., Do, Q. T., Aci-Seche, S. & Bonnet, P. VSPrep: A general KNIME workflow for the preparation of molecules for virtual screening. *Mol. Inform.* (2017). <https://doi.org/10.1002/minf.201700023>.
16. Meireles, L. M., Domling, A. S. & Camacho, C. J. ANCHOR: A web server and database for analysis of protein-protein interaction binding pockets for drug discovery. *Nucleic Acids Res.* **38**, W407–411 (2010).
17. Jain, A. N. Surflex-Dock 2.1: Robust performance from ligand energetic modeling, ring flexibility, and knowledge-based search. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **21**, 281–306 (2007).
18. Ghosh, S. *et al.* The role of lipocalin-2 in age-related macular degeneration (AMD). *Cell Mol. Life Sci.* **77**, 835–851 (2020).
19. Buonafina, M., Martínez-Martínez, E. & Jaisser, F. More than a simple biomarker: The role of NGAL in cardiovascular and renal diseases. *Clin. Sci. (Lond.)*. **132**, 909–923 (2018).
20. Ma, Q., Devarajan, S. R. & Devarajan, P. Amelioration of cisplatin-induced acute kidney injury by recombinant neutrophil gelatinase-associated lipocalin. *Ren. Fail.* **38**, 1476–1482 (2016).
21. Nickolas, T. L. *et al.* NGAL (Lcn2) monomer is associated with tubulointerstitial damage in chronic kidney disease. *Kidney Int.* **82**, 718–722 (2012).
22. Deis, J. A. *et al.* Adipose Lipocalin 2 overexpression protects against age-related decline in thermogenic function of adipose tissue and metabolic deterioration. *Mol. Metab.* **24**, 18–29 (2019).
23. Leng, X. *et al.* Inhibition of lipocalin 2 impairs breast tumorigenesis and metastasis. *Cancer Res.* **69**, 8579–8584 (2009).
24. Warszawska, J. M. *et al.* Lipocalin 2 deactivates macrophages and worsens pneumococcal pneumonia outcomes. *J. Clin. Invest.* **123**, 3363–3372 (2013).
25. Cheng, L. *et al.* Lipocalin-2 promotes m1 macrophages polarization in a mouse cardiac ischaemia-reperfusion injury model. *Scand J Immunol.* **81**, 31–38 (2015).
26. Wieser, V. *et al.* Lipocalin 2 drives neutrophilic inflammation in alcoholic liver disease. *J. Hepatol.* **64**, 872–880 (2016).
27. Shao, S. *et al.* Neutrophil Extracellular Traps Promote Inflammatory Responses in Psoriasis via Activating Epidermal TLR4/IL-36R Crosstalk. *Front Immunol.* **10**, 746 (2019).
28. Folkesson, M. *et al.* Presence of NGAL/MMP-9 complexes in human abdominal aortic aneurysms. *Thromb. Haemost.* **98**, 427–433 (2007).
29. Ramos-Mozo, P. *et al.* Increased plasma levels of NGAL, a marker of neutrophil activation, in patients with abdominal aortic aneurysm. *Atherosclerosis.* **220**, 552–556 (2012).
30. Tarin, C. *et al.* Lipocalin-2 deficiency or blockade protects against aortic abdominal aneurysm development in mice. *Cardiovasc. Res.* **111**, 262–273 (2016).
31. Saha, P., Singh, V., Xiao, X., Yeoh, B. S. & Vijay-Kumar, M. Data on importance of hematopoietic cell derived Lipocalin 2 against gut inflammation. *Data Brief.* **8**, 812–816 (2016).
32. Duan, X. *et al.* Tumor associated macrophages deliver iron to tumor cells via Lcn2. *Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol.* **10**, 105–114 (2018).
33. Oren, B. *et al.* Tumour stroma-derived lipocalin-2 promotes breast cancer metastasis. *J. Pathol.* **239**, 274–285 (2016).
34. Guo, P., Yang, J., Jia, D., Moses, M. A. & Auguste, D. T. ICAM-1-targeted, Lcn2 siRNA-encapsulating liposomes are potent anti-angiogenic agents for triple negative breast cancer. *Theranostics.* **6**, 1–13 (2016).

Acknowledgements

We thank the group of the CEF of the Cordeliers Research Center for their support with animal care.

Author contributions

N.L.-A. and F.J. conceived and designed the study. B.B., E.M.-M., A.F.-C., Q.-T. D., I.R. and A.O.-P. performed the data. B.B., E.M.-M., P.R., F.Z., P.M., A.O.-P., N.L.-A. and F.J. analyzed and interpreted the data. A.O.-P., N.L.-A. and F.J. led the design and drafted the paper.

Funding

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-16-CE14-0021-01), the Fight-HF Avenir Investment Program (ANR-15-RHUS-0004), the European Fibro-Target Project (Grant agreement No. SP7#602904), Miguel Servet contract CP13/00221 from the “Instituto de Salud Carlos III-FEDER”, Fondo de Investigaciones Sanitarias [PI18/01875] and the FP7-funded COST ADMIRE network (BM1301). BB was supported by a PhD grant from the Region Ile de France ARDoc. EMM was supported by a contract from CAM (Atracción de Talento).

Competing interests

Dr. Martínez-Martínez, Dr. Mulder, Dr. Do, Dr. Ouvrard-Pascaud, Dr. López-Andrés and Dr. Jaisser have filed a patent on the use of NGAL inhibitors. All other authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82279-0>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to F.J.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2021

VALORISATION SCIENTIFIQUE

- ESAC Symposium on Aldosterone and the Mineralocorticoid Receptor, Rome, 2019

Présentation orale : “Finerenone improves the cardiovascular function in post-menopausal mice with metabolic syndrome”

- American Society of Nephrology, Kidney Week, Washington, 2019

Poster “Finerenone improves the cardiovascular benefits after a return to a normal diet in the mouse model of high-fat diet-induced obesity”

- 54th EASD (European Association for the Study of Diabetes) Annual Meeting, Berlin, 2018

Présentation orale : “Finerenone improves the cardiovascular benefits after a return to a normal diet in the mouse model of high-fat diet-induced obesity”

- Journée de Recherche Biomédicale Normande, Caen, 2018

Poster : “Finerenone improves the cardiovascular benefits after a return to a normal diet in the mouse model of high-fat diet-induced obesity”

- ESAC Symposium on Aldosterone and the Mineralocorticoid Receptor, Paris, 2018

Présentation orale : “Finerenone improves the cardiovascular benefits after a return to a normal diet in the mouse model of high-fat diet-induced obesity”

- Journée de Recherche Biomédicale Normande, Caen, 2017

Poster : “Finerenone improves left ventricular diastolic coronary and cardiac mitochondrial functions, and exercise ability in post-menopausal mice”

- ESAC Symposium on Aldosterone and the Mineralocorticoid Receptor, Dublin, 2016

Poster commenté : “Finerenone improves left ventricular diastolic coronary and cardiac mitochondrial functions, and exercise ability in post-menopausal mice”

Présentation orale : critique d'article en groupe dans le cadre du programme E-learning ADMIRE COST

EFFETS BENEFIQUES DE LA FINERENONE, ANTAGONISTE DU RECEPTEUR MINERALOCORTICOÏDE, DANS LES CONSEQUENCES CARDIOVASCULAIRES D'UN SYNDROME METABOLIQUE, CHEZ DES SOURIS EN CONDITIONS DE POST-MENOPAUSE OU APRES AMAIGRISSEMENT DE SOURIS MALES OBESES

Résumé

Les patients obèses et les femmes en postménopause montrent une prévalence plus élevée de dysfonction diastolique ventriculaire gauche, pouvant évoluer en insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée. A ce jour, aucune stratégie thérapeutique n'est adaptée à ces patients. Néanmoins, il a été montré que le système rénine-angiotensine-aldostérone était pathologiquement suractivé dans un contexte d'insuffisance cardiaque. C'est pourquoi nous avons testé l'efficacité de la finérénone, un antagoniste du récepteur minéralocorticoïde non-stéroïdien, dans deux modèles murins d'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée.

La première étude porte sur des souris mâles nourries par un régime riche en graisse pendant 16 semaines. Au terme de ces 16 semaines, le régime alimentaire est normalisé pour deux groupes de souris, dont un reçoit le traitement par la finérénone pendant 8 semaines. Les résultats obtenus montrent que l'amaigrissement conduit à une amélioration des paramètres métaboliques, mais que seul l'ajout du traitement par la finérénone permet une amélioration franche de la dysfonction diastolique et de la capacité d'exercice.

La seconde étude porte sur des souris ovariectomisées à l'âge de 4 mois puis traitées par la finérénone pendant 1 mois à l'âge de 7 mois. Les résultats obtenus montrent une amélioration de la dysfonction diastolique, soutenue par une amélioration de la fonction coronaire et de la capacité d'exercice.

En conclusion, la finérénone améliore la dysfonction cardiovasculaire, la fonction coronaire et la capacité d'exercice dans ces deux modèles murins de dysfonction diastolique associée à une altération des paramètres métaboliques. Ces études soulignent l'intérêt du récepteur minéralocorticoïde comme cible pharmacologique dans le traitement de l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée.

Mots-clés : insuffisance cardiaque, finérénone, obésité, syndrome métabolique, ménopause

Abstract

Obese patients and postmenopausal women show a higher prevalence of left ventricular diastolic dysfunction, which may progress to heart failure with preserved ejection fraction. To date, no therapeutic strategy is adapted to these patients. Nevertheless, it has been shown that the renin-angiotensin-aldosterone system is pathologically overactivated in heart failure. In this context, we tested the efficacy of finerenone, a non-steroidal mineralocorticoid receptor antagonist, in two mouse models of heart failure with preserved ejection fraction.

The first study involved mice fed a high-fat diet for 16 weeks. At the end of 16 weeks, the diet was normalized in two groups of mice, one of which received treatment with finerenone for 8 weeks. The results show that normalization of the diet shows an improvement of the metabolic parameters, but only the addition of the finerenone treatment allows a clear improvement of the diastolic dysfunction and of the exercise capacity.

The second study involved ovariectomized mice at 4 months of age and then treated with finerenone for 1 month at 7 months of age. The results show an improvement in diastolic dysfunction, supported by an improvement in coronary function and exercise capacity.

In conclusion, finerenone improves cardiovascular dysfunction, coronary function, and exercise capacity in these two mouse models of diastolic dysfunction associated with altered metabolic parameters. These studies highlight the interest of the mineralocorticoid receptor as a pharmaceutical target in the treatment of heart failure with preserved ejection fraction.

Keywords: heart failure, finerenone, obesity, metabolic syndrome, menopause