HAL
open science

Prévention de l'insuffisance cardiaque par l'antagonisation du récepteur des minéralocorticoïdes dans un contexte de syndrome métabolique : une étude intégrative du phénome, du transcriptiome et du miRNOme

Gina Youcef

To cite this version:

Gina Youcef. Prévention de l'insuffisance cardiaque par l'antagonisation du récepteur des minéralocorticoïdes dans un contexte de syndrome métabolique : une étude intégrative du phénome, du transcriptiome et du miRNOme. Médecine humaine et pathologie. Université de Lorraine, 2014. Français. NNT : 2014LORR0270 . tel-01751303

HAL Id: tel-01751303

https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01751303v1

Submitted on 29 Mar 2018

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

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

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

Ecole Doctorale BioSE (Biologie, Santé, Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE
Mention: « Sciences de la Vie et de la Santé »

Par **Gina YOUCEF**

Prévention de l'insuffisance cardiaque par l'antagonisation du récepteur aux minéralocorticoïdes dans un contexte de syndrome métabolique: une étude intégrative du phénome, du transcriptome et du miRNome

19 Décembre 2014

Membres du jury :

Rapporteurs :

Dr. Maria-Christina ZENNARO	**MD-PhD,** INSERM U970, HEGP, Paris, **FRANCE**
Dr. Claude DELCAYRE	**MD-PhD,** INSERM U942, Hôpital Lariboisière, Paris, **FRANCE**

Examinateurs :

Dr. Odile LECOMPTE	**PhD-MCU,** LBGI - BFO ICube UMR 7357, Strasbourg, **FRANCE**
Pr. Faiez ZANNAD	**MD-PhD, Pu-PH** CHU Nancy, INSERM U1116, Centre d'investigation clinique, Nancy, **FRANCE** (Directeur de thèse)
Dr. Anne PIZARD	**PhD,** INSERM U1116, Nancy, **FRANCE** (Co-directrice de thèse)
Dr. Laurent VALLAR	**PhD,** Genomics Research Unit, CRP-Santé, Luxembourg, **LUXEMBOURG** (co-directeur de thèse)

UMRS 1116 Défaillance Cardiovasculaire Aigue et Chronique – Nancy, FRANCE
Genomics Research Unit – Centre de Recherche Public de la Santé - LUXEMBOURG

REMERCIEMENTS

À ma chère famille,
pour avoir cru en moi et pour m'avoir soutenue, encouragée et supportée dans les moments les plus difficiles jusque l'aboutissement de ma thèse. Qu'ils sachent que je leurs dois ce que je suis aujourd'hui et qu'ils soient assurés de ma sincère reconnaissance.

À madame le Docteur **Maria-Christina Zennaro,** monsieur le Docteur **Claude Delcayre** et madame le Docteur **Odile Lecompte** les membres de mon jury de thèse,
pour avoir accepté de juger mon travail de doctorat. Je leur exprime mes sincères remerciements et ma profonde reconnaissance.

À monsieur le Docteur **Patrick Lacolley** et monsieur le Docteur **Laurent Vallar,**
pour m'avoir accueillis dans leurs unités respectives, l'UMR 1116 « Défaillance Cardiovasculaire Aiguë et Chronique » (Nancy) et le « Genomics Research Unit » (CRP Santé Luxembourg) et pour m'avoir permis d'y accomplir ma thèse.

À mes directeurs de thèse, monsieur le Professeur **Faiez Zannad**, madame le Docteur **Anne Pizard** et monsieur le Docteur **Laurent Vallar**,
je souhaiterais leurs exprimer toute ma reconnaissance et ma gratitude pour m'avoir guidée et conseillée tout au long de mon travail de thèse, mais également pour les valeurs qu'ils m'ont enseignées et le support qu'ils m'ont apporté jusque l'aboutissement de ma thèse.

Au **Fond National de la Recherche au Luxembourg (FNR),** qui a financé ma thèse,

À mes collègues de travail de Nancy, **Karima Ait-Aissa**, **Jeremy-Lagrange**, **Anna Filip**, **Zhor Ramdane Cherif**, **Moustafa Bourhim**, **Huguette Louis**, **Natalia Lopez-Andres**, **Cécile Lakomy, Audrey Isch, Simon Toupance, Nathalie Mercier**, **Simon Thornton**, **Jean-Pierre Max,** l'homme à tout-faire ! Les stagiaires que j'ai pu encadrer au cours de ma thèse,

Clément l'Huillier, **Elodie Varlet** et **Mathieu Fischer**, pour leur grande implication dans le projet et leur sérieux engagement. Qu'ils reçoivent mes sincèrement remerciements.

À **Arnaud Olivier** tout spécialement,
pour avoir été un remarquable co-équipier au cours de mon projet de thèse et sans qui le cœur de nos petites bêtes n'aurait jamais été si bien échographié ! Qu'il sache que son support a été très précieux.

À **Anne-Laure Leblanc**, notre animalière, pour son investissement unique et son travail exceptionnel fournis dans la gestion et le suivi des animaux tout au long de mon projet de thèse. Qu'elle sache combien son aide précieuse et ses efforts incomparables ont permis la progression de ce projet et permis sa qualité. Je lui exprime mes remerciements les plus sincères.

À **Renaud Fay** et **Carlos Labat**, pour leurs efforts considérables fournis dans l'analyse statistique des données phénotypiques des animaux tout au long de mon projet de thèse.

À mes collègues de travail au **Genomics Research Unit à Luxembourg**, ma 2ème équipe d'accueil,
pour m'avoir apporté tout leur support technique et intellectuel mais aussi pour leur constante bonne humeur et amitié. Mes pensées vont à **François Bernardin** mon collègue de bureau. Je le remercie pour m'avoir formée et assistée aux différentes techniques de biologie moléculaire et cellulaire, pour avoir assuré l'avancée des expériences lors de mes déplacements à Nancy, mais aussi pour m'avoir permis de garder le moral et la persévérance jusqu'au bout de ma thèse, **Nathalie Nicot** pour ses conseils techniques très précieux et son implication dans l'analyse des *microarrays* cardiaques, **Arnaud Muller** pour m'avoir formée à l'analyse bioinformatique des *microarrays*, pour m'avoir constamment accompagnée, épaulée et guidée par son esprit critique dans mes analyses, mais aussi pour son écoute constante et son amitié, qu'il sache que je lui exprime toute ma reconnaissance, **Tony Kaoma** pour son support biostatistique dans l'analyse des *microarrays* mais aussi ses conseils précieux et son support moral qui n'a jamais cessé tout au long de ma thèse, **Peter Nazarov** pour son aide en biostatistiques et pour m'avoir formée à CO-EXPRIMER tout ce que je voulais ! **Christophe Tierrez** pour sa bonne humeur, sa sympathie et son soutien.

À mes autres collègues au CRP Santé, **Nassera Aouali, Marwan Sleiman, Victoria El-khoury, Sophie Rodius, Celine Jeanty, Maud Théresine, Emeline Gorreti, Sabrina Fritah** et **Xianqing Mao**

qu'ils sachent combien leur présence, leur soutien et leur encouragement m'ont été importants.

ABREVIATIONS

11β-HSD2	11β2-hydroxystéroïde déshydrogénase
AACE	*American Academy of Clinical Endocrinologist*, L'académie clinique Américaine des endocrinologistes
ACTH	Hormone adrénocorticotrope
AG	Acide gras
AGT	Angiotensinogène
Aldo	Aldostérone
Ang II	Angiotensine II
ANP	*Atrial natriuretic peptide*, Peptide atrial natriurétique
ARAII	Antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II
ARM	Antagoniste du récepteur aux minéralocorticoïdes
AT1R	Récepteur de type 1 de l'angiotensine II
AT2R	Récepteur de type 2 de l'angiotensine II
BK	Bradykinine
BNP	*Brain natriuretic peptide*, Peptide cérébral natriurétique
CaM	Calmoduline
CaMK	Calmoduline kinases
CITP	Collagène de type I télopeptide
CK	Créatine kinase
CPT	Carnitine palmitoyl transférases
CREB	*cAMP response element-binding protein*, protéine se fixant à l'élément de réponse à l'adénosine monophosphate cyclique
CT-1	Cardiotrophine-1
DGCR8	*Di-george syndrome critical region gene 8*
DT2	Diabète de type 2
BK	Bradykinine
ECA	Enzyme de conversion de l'angiotensine II
EGFR	*Epidermal growth factor receptor*, Récepteur du facteur de croissance épidermique

EGIR	*European group for the study of insulin resistance*, Groupe Européen pour l'étude de la résistance à l'Insuline
ENaC	*Epithelial Sodium channel***,** Canaux sodiques épithéliaux
eNOS	*endothelial Nitric oxyde synthase*, Monoxyde d'azote synthase endothéliale
ERS	Eléments de réponse aux stéroïdes
ET-1	Endothéline-1
$FADH_2$	Flavine adénine dinucléotide oxydé
FE	Fraction d'éjection
FR	Fraction de raccourcissement
GATA4	*GATA motif binding protein 4*, protéine de liaison au motif GATA
GLUT	Transporteur de glucose
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
HDAC	Histone déacétylases
HDL	*High density lipoprotein*, lipoprotéines de haute densité
HTA	Hypertension artérielle
IC	Insuffisance cardiaque
ICD	Insuffisance cardiaque diastolique
IDF	*International Diabetes Federation*, Fédération internationale du diabète
IDM	Infarctus du myocarde
ICS	Insuffisance cardiaque systolique
IEC	Inhibiteur de l'enzyme de conversion
IL	Interleukines
IL-1β	Interleukine 1β
IMC	Indice de masse corporelle
InsR	Récepteur de l'insuline
MAPK	*Mitogen activated protein kinases,* Protéines kinases activées par des mitogènes
MCP-1	*Monocyte chemoattractant protein-1*, Protéine chémoattractive des monocytes
MCV	Maladies cardiovasculaires
MEC	Matrice extracellulaire
MMP	*Matrix metalloproteinases*, Metalloprotéinases matricielles

NA	Noradrénaline
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide oxydé
NCEP/ATPIII	*National Cholesterol Education Program/Adult Treatment Panel III*, Programme national d'éducation sur le Cholestérol/ Panel III du traitement chez l'adulte
NFAT	*Nuclear factor of activated T cells*, facteur nucléaire des cellules T activées
NPY	Neuropeptide Y
NYHA	*New York Heart Association*
OMS	Organisation mondiale de la santé
PA	Pression artérielle
PAI-1	Inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1
PAS	Pression artérielle systolique
PGC1α	Co-activateur 1α de PPARγC
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinases
PICP	Procollagène de type I
PIIINP	Propeptide N-terminal du procollagène de type III
PLC	Phospholipase C
PPAR	*Peroxisome proliferator-activated receptor*, Récepteurs activés par les proliférateurs de peroxysomes
RCPG	Récepteurs couplés aux protéines G
RISC	*RNA induced silencing complex*, complexe induisant la répression de l'expression des ARN
RG	Récepteur aux glucocorticoïdes
RM	Récepteur aux minéralocorticoïdes
ROS	*Reactive oxygen species*, Espèces réactives de l'oxygène
SAV	Système Arginine-Vasopressine
SHHF	*Spontaneously Hypertensive Heart Failure*, Rats spontanément hypertendus développant une insuffisance cardiaque
SKK	Système Kallicréines-Kinines
SMet	Syndrome métabolique
SNS	Système nerveux sympathique
SRAA	Système rénine-angiotensine-aldostérone
TA	Tissu adipeux

TIMP	*Tissue inhibitors of matrix metalloproteinases*, Inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases matricielles
TNF-α	*Tumor necrosis factor-α*, Facteur tumoral nécrosant-α
VD	Ventricule droit
VEGF	*Vascular endothelium growth factor*, Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VG	Ventricule gauche

SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX 11

LISTE DES PUBLICATIONS EN RAPPORT AVEC LE TRAVAIL DE THÈSE 13

AVANT-PROPOS 14

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE 17

I. L'insuffisance cardiaque 17

1. Définition, symptômes et étiologie de l'insuffisance cardiaque 17
2. Épidémiologie 19
   a. Prévalence et incidence 19
   b. Hospitalisation et morbi-mortalité 20
3. Les formes d'insuffisance cardiaque 20
   a. L'insuffisance cardiaque aiguë 20
   b. L'insuffisance cardiaque chronique 21
      i. L'insuffisance cardiaque chronique diastolique 23
      ii. L'Insuffisance cardiaque chronique systolique 24
4. Physiopathologie de l'insuffisance cardiaque 25
   a. Mécanismes adaptatifs compensateurs 25
      i. Les systèmes neuro-humoraux 26
      ii. Adaptations métaboliques 30
      iii. Le remodelage cardiaque 33
   b. Acteurs moléculaires utilisés dans le diagnostic de l'insuffisance cardiaque 38
      i. Médiateurs neuro-hormonaux: 38
      ii. Marqueurs du remodelage cardiomyocytaire : 39
      iii. Marqueurs de la réponse inflammatoire 40
5. Traitements de l'insuffisance cardiaque 40

II. Le Syndrome métabolique : un facteur de risque important pour les maladies cardiovasculaires et l'insuffisance cardiaque 48

1. Définitions 48
2. Épidémiologie 50
3. Morbi-mortalité et risque cardiovasculaire lié au syndrome métabolique 50
4. Physiopathologie du syndrome métabolique 51

III. L'aldostérone et le récepteur des minéralocorticoïdes: des acteurs importants dans la physiopathologie de l'insuffisance cardiaque et du syndrome métabolique 58

1. Physiologie du système rénine-angiotensine-aldostérone 58
2. L'aldostérone et le récepteur des minéralocorticoïdes dans la physiopathologie des maladies cardiovasculaires, de l'insuffisance cardiaque et du syndrome métabolique 62

a. Généralités sur le récepteur des minéralocorticoïdes 62

b. Rôle physiopathologique de l'aldostérone dans le système cardiovasculaire et son rôle dans l'insuffisance cardiaque 68

c. Rôle physiopathologique de l'aldostérone dans le syndrome métabolique 70

IV. L'apport des approches « omiques » dans la connaissance de la physiopathologie de l'insuffisance cardiaque et du syndrome métabolique 72

1. Généralités 72

2. Étude du transcriptome pour la compréhension de la physiopathologie de l'insuffisance cardiaque et du syndrome métabolique 77

HYPOTHESE ET OBJECTIFS DE L'ETUDE 84

METHODOLOGIE : CHOIX DU MODELE ET DES CONDITIONS EXPERIMENTALES 87

RESULTATS : PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES EN RAPPORT AVEC LE TRAVAIL DE THESE 99

Etude N°1: « Simultaneous Characterization of Metabolic, Cardiac, Vascular and Renal Phenotypes » 99

Etude N°2: « Mineralocorticoid receptor antagonism during metabolic syndrome development delays the progression towards heart failure ». 105

Etude N°3: « Phenome-guided analysis of the cardiac and adipose transcriptome and miRNome of obese SHHF rats reveals the cardioprotective effects of long-term Eplerenone treatment during metabolic syndrome development ». 110

DISCUSSION GENERALE 116

CONCLUSIONS et PERSPECTIVES 128

BIBLIOGRAPHIE 132

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

FIGURES

Figure 1: Schéma général simplifié des suites d'évènements conduisant à l'apparition de l'IC. 17
Figure 2 : Schéma présentant les stades d'évolution de l'IC 23
Figure 3 : Caractéristiques de l'insuffisance cardiaque diastolique (ICD) et systolique (ICS) 24
Figure 4 : Schéma de l'évolution de l'IC du stade de compensation vers la décompensation. 25
Figure 5 : Principaux mécanismes adaptatifs compensateurs de l'IC. 26
Figure 6 : Systèmes neuro-humoraux impliqués dans les mécanismes adaptatifs de l'IC. 29
Figure 7 : Schéma illustrant l'utilisation du métabolisme cardiaque au cours du développement de l'IC 32
Figure 8 : Types de remodelages ventriculaires : concentrique et excentrique 34
Figure 9 : Principales voies de signalisations impliquées dans les mécanismes d'hypertrophie cardiaque 35
Figure 10 : Schéma présentant le mécanisme d'activation des MMP et leurs actions sur la dégradation de la MEC 36
Figure 11 : Relation entre les mécanismes de remodelage cardiaque structurel et le remodelage cardiaque métabolique lié aux altérations d'utilisation du substrat énergétique. 37
Figure 12 : Présentation du système rénine angiotensine aldostérone et l'action des différents agents pharmacologiques sur cette voie. 42
Figure 13 : Mode d'action des diurétiques 43
Figure 14: Incidence de l'IC en fonction de la présence ou non du SMet 49
Figure 15: Signalisation intracellulaire de l'insuline. 51
Figure 16: Mécanismes d'actions cellulaires principaux de l'insuline et leurs régulations lors de l'insulino-résistance 53
Figure 17: Composition du tissu adipeux 54
Figure 18: Modulation phénotypique du tissu adipeux au cours de l'obésité 55
Figure 19 : Le Système Rénine-Angiotensine-Aldostérone 58
Figure 21 : Mécanismes intervenant dans la régulation de l'équilibre hydro-sodé au niveau rénal et le maintien de la PA. 60
Figure 22 : Structure génomique du RM humain 61
Figure 23 : Les différents domaines présents dans la structure des RM 62
Figure 24 : Mécanisme d'activation du RM au niveau cellulaire 63
Figure 25 : Effets non génomiques et génomiques de l'aldostérone 65
Figure 26 : Implication de l'aldostérone et du RM dans diverses fonctions dans l'organisme 66
Figure 27 : La biologie des systèmes permet l'intégration des données obtenues à différents niveaux de complexité. 71
Figure 28 : Les différentes familles d'ARNs cellulaires. 72
Figure 29 : Biogenèse des microARNs et leurs mécanismes d'action sur l'expression génique 74
Figure 30 : Origines des miRs présents dans le sang circulant 79
Figure 31 : Mécanismes d'actions de la leptine et de son récepteur sur la satiété ainsi que les effets de leurs déficiences 86

Figure 32 : Morphologie des cœurs des rats SHHF (droite) au stade d'IC terminale en comparaison avec un cœur de rat sain normal de Wistar (gauche) 88
Figure 33 : Mutation du récepteur de la leptine chez le rat SHHF$^{cp/cp}$ à l'origine de leur SMet..... 89
Figure 34 : Morphologie corporelle des rats SHHF$^{cp/cp}$ présentant un SMet en comparaison avec leurs frères de litières normaux les rats SHHF$^{+/+}$..... 90
Figure 35 : Courbe de Kaplan Meier représentant le taux de survie des rats SHHF selon leur génotype 90
Figure 36 : Principe général d'étude du transcriptome basée sur la technologie des microarrays Affymetrix..... 94
Figure 37 : Mode opératoire mis en œuvre dans l'étude N°1 98
Figure 38 : Récapitulatif de l'historique d'installation des constituants du SMet et des altérations du phénotype cardiaque chez le rat SHHFcp/cp. 101
Figure 39 : Mode opératoire mis en œuvre dans l'étude N°2 correspondant à l'évaluation de la prévention de l'IC dans un contexte de SMet par antagonisation du MR chez les rats SHHF. 103
Figure 40 : Récapitulatif des effets majeurs obtenus au cours de l'étude N°2 par l'administration chronique d'un ARM chez les SHHF$^{cp/cp}$ 106
Figure 41 : Mode opératoire mis en œuvre dans l'étude N°3 pour la caractérisation du transcriptome et miRnome du tissu adipeux et cardiaque des rats SHHF traités ou non à l'Eplérénone..... 109

TABLEAUX

Tableau 1 : Symptômes cliniques de l'IC..... 18
Tableau 2 : Classification de l'IC selon la NYHA 22
Tableau 3 : Principaux acteurs moléculaires utilisés dans le diagnostic de l'IC..... 38
Tableau 4: Facteurs influençant l'interprétation clinique des taux de BNP mesurés..... 39
Tableau 5 : Critères de diagnostic du SMet selon les définitions proposés par différentes organisations scientifiques ou médicales..... 48
Tableau 6 : Les principaux co-activateurs et co-répresseurs du RM au niveau cellulaire 64
Tableau 7 : Principaux miRs impliqués dans la physiopathologie du SMet..... 78
Tableau 8 : miRs d'intérêt récemment identifiés dans l'insuffisance cardiaque..... 80
Tableau 9 : Caractéristiques phénotypiques des principaux modèles murins d'études du SMet..... 87

LISTE DES PUBLICATIONS EN RAPPORT AVEC LE TRAVAIL DE THÈSE

Publication N°1

Simultaneous characterization of metabolic, cardiac, vascular and renal phenotypes of lean and obese SHHF rats.

PLoS One. 2014 May 15;9(5):e96452. doi: 10.1371/journal.pone.0096452. eCollection 2014.

Gina Youcef[1, 2, 3,4], Arnaud Olivier[1, 2, 3, 5,6], Clément P. J. L'Huillier[1,2,3], Carlos Labat[1,2,3], Renaud Fay[5, 6], Lina Tabcheh[2, 3,7], Simon Toupance[1, 2, 3, 5,6], Rosa-Maria Rodriguez-Gueant[2, 3, 5,8], Damien Bergerot[9], Fréderic Jaisser[5,6], Patrick Lacolley[1,2,3,5], Faiez Zannad[1,2,3,5,6], Laurent Vallar[4], Anne Pizard[1,2,3,6]

[1]UMRS U1116 Inserm, Vandœuvre-lès-Nancy, France, [2] Fédération de Recherche 3209, Nancy, France,[3]Université´ de Lorraine, Nancy, France, [4]Genomics Research Unit, Centre de Recherche Public de la Sante´ , Strassen, Luxembourg, [5]CHU Nancy, Nancy, France, [6]CIC 1433, Pierre Drouin, Vandœuvre-lès-Nancy, France, [7]UMR 7365 CNRS, Vandœuvre-lès-Nancy, France, [8]U954 Inserm, Vandœuvre-lès-Nancy, France, [9]CIC 9201, PARCC, HEGP, Paris, France

Publication N°2

Mineralocorticoid receptor antagonism during metabolic syndrome development delays the progression towards heart failure

Manuscrit soumis dans le journal *Hypertension*

Gina Youcef[1,2,3,4], Arnaud Olivier[1,2,3,5,6], Clément P.J. L'Huillier[1,2,3], Carlos Labat[1,2,3], Renaud Fay[5,6], A. Bianchi[2,3,7], Rosa-Maria Rodriguez-Guéant [2,3,5,8], Frédéric Jaisser[5,6], Faiez Zannad[1,2,3,5,6],Laurent Vallar[4], and Anne Pizard[1,2,3,6]

[1] UMRS U1116 Inserm, Vandoeuvre-lès-Nancy, France. [2] Fédération de Recherche 3209, Nancy, France. [3] Université de Lorraine, Nancy, France.[4] Genomics Research Unit, Centre de Recherche Public de la Santé, Luxembourg.[5] CHU Nancy, Nancy, France.[6] CIC 1433, Pierre Drouin, Vandoeuvre-lès-Nancy, France.[7] UMR 7365 CNRS, Vandoeuvre-lès-Nancy, France.[8] U954 Inserm, Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

Publication N°3

Phenome-guided analysis of the cardiac and adipose transcriptome and miRNome of obese SHHF rats reveals the cardioprotective effects of long-term Eplerenone treatment during metabolic syndrome development

Manuscrit en cours de préparation pour soumission dans le journal *Diabetes*

Gina Youcef[1,2,3,4], Nathalie Nicot[1], Arnaud Muller[1], Tony Kaoma[1], François Bernardin[1], Petr Nazarov[1], Faiez Zannad[2,3,4,5,6], Anne Pizard[2,3,4,6] and Laurent Vallar[1]

[1]Genomics Research Unit, Centre de Recherche Public de la Santé, Luxembourg. [2]UMRS U1116 Inserm, Vandoeuvre-lès-Nancy, France. [3] Fédération de Recherche 3209, Nancy, France.[4] Université de Lorraine, Nancy, France.[5] CHU Nancy, Nancy, France.[6] CIC 1433, Pierre Drouin, Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

AVANT-PROPOS

Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), les maladies cardiovasculaires (MCV) sont la première cause de mortalité dans le monde. Actuellement estimé à 17,3 millions de décès, soit 30 % des causes de mortalité à travers le monde, ce chiffre est prévu à la hausse d'ici 2030 avec 23,3 millions de décès. Ainsi les MCV resteront de nouveau la première cause de mortalité mondiale (OMS, 2014). Dans le même temps, les troubles métaboliques deviennent des problèmes de santé publique dans une société où les mauvaises habitudes alimentaires et le mode de vie sédentaire sont en croissance importante. Ceci laisse présager de l'apparition de problèmes cardiovasculaires chez des individus de plus en plus jeunes et une progression plus précoce vers le syndrome d'**insuffisance cardiaque**. Ces troubles métaboliques incluant le diabète de type 2, l'insulino-résistance, l'obésité, les dyslipidémies et l'hypertension artérielle regroupés sous le nom de **syndrome métabolique** augmentent en effet le risque cardiovasculaire par 2, le risque d'accident vasculaire cérébral par 2 à 4 et le risque d'infarctus du myocarde par 4 [1]. Partant de ce concept, une nécessité urgente de prise en charge des individus lorsque ces derniers ne sont encore qu' « à risque », représente une stratégie séduisante de prévention des maladies cardiovasculaires et de leur forme d'évolution, l'insuffisance cardiaque.

Le présent projet a ainsi pour but d'évaluer l'efficacité d'une stratégie thérapeutique visant à cibler les facteurs de risque cardiovasculaires qui composent le syndrome métabolique afin de prévenir la survenue subséquente de l'insuffisance cardiaque. Des preuves expérimentales et cliniques ont d'ores et déjà montrées que les antagonistes du **récepteur aux minéralocorticoïdes** bloquant les effets de l'**aldostérone** sont efficaces dans le traitement l'insuffisance cardiaque avancée. Cette même hormone est aussi impliquée dans le syndrome métabolique, faisant de cette dernière une cible commune intéressante dans les deux pathologies. Ainsi, la démarche adoptée au cours de ce projet s'est articulée autour de trois axes principaux de recherche. *(i)* Dans un premier temps la caractérisation et validation d'un modèle expérimental pertinent pour notre étude, développant un hyperaldostéronisme, un syndrome métabolique et une insuffisance cardiaque. *(ii)* Dans un second temps, étudier l'impact sur ce modèle d'un antagoniste du récepteur aux minéralocorticoïdes sur le syndrome métabolique et son potentiel effet préventif

subséquent sur l'insuffisance cardiaque et *(iii)* enfin, analyser l'impact moléculaire de ce traitement préventif sur le transcriptome et miRNome adipeux et cardiaque afin d'obtenir une vue d'ensemble intégrative des données phénotypiques et génomiques.

Ce manuscrit constitue le support d'une thèse sur articles et s'organise en cinq parties principales. Une **introduction bibliographique**, **les hypothèses et objectifs** de l'étude, **la méthodologie** employée pour le choix du modèle d'étude et des conditions expérimentales, la présentation des **résultats principaux obtenus faisant l'objet de publications scientifiques** et une **discussion générale** du travail de thèse.

La première partie introductive présente les différentes notions et aspects traités au cours de ce projet en commençant par la présentation du syndrome d'insuffisance cardiaque puis celle de syndrome métabolique en tant que facteur de risque aggravant de l'insuffisance cardiaque. Elle présente par la suite l'aldostérone et le récepteur aux minéralocorticoïdes en tant que cibles communes participant à la physiopathologie de l'insuffisance cardiaque et du syndrome métabolique. Enfin, la dernière partie de l'introduction vise à présenter l'approche des « omiques » et leurs contributions dans la compréhension des pathologies de l'insuffisance cardiaque et du syndrome métabolique au niveau moléculaire.

La partie méthodologie de ce manuscrit est focalisée sur le choix du modèle expérimental sur lequel s'est appuyé le présent projet. Les autres données techniques et méthodologiques employées pour les différentes études menées dans ce projet sont détaillés dans les sections matériels et méthodes respectives de chaque publication présentée.

La partie résultats présente les trois publications scientifiques principales relatives à mon travail de thèse. Pour chaque étude menée une page d'introduction décrit le travail effectué et une page de conclusion résume les résultats principaux obtenus. Les deux premières études ont été menées grâce à mon travail dans l'UMRS 1116 à Nancy et la troisième étude correspondant à mon travail de thèse mené au Genomics Research Unit à Luxembourg (CRP Santé) sur la base d'une collaboration franco-luxembourgeoise.

La partie discussion correspond à une discussion générale reprenant l'ensemble des résultats obtenus au cours de ce projet.

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

I. L'insuffisance cardiaque

1. Définition, symptômes et étiologie de l'insuffisance cardiaque

Définition

L'insuffisance cardiaque (IC) est un syndrome clinique qui constitue l'évolution de la majorité des maladies cardiaques. La définition retenue par la Société Européenne de Cardiologie (*European Society of Cardiology*, ESC) caractérise l'IC comme résultant d'une altération progressive de la structure et de la fonction du myocarde suite à *un stimulus* (évènement cardiovasculaire, présence de facteurs de risque, maladies génétiques) conduisant à une incapacité de ce dernier à assurer un débit sanguin suffisant pour pallier aux besoins énergétiques de l'organisme. Cette inadéquation entre la fonction du cœur et les besoins de l'organisme implique la mise en jeu de mécanismes compensateurs, initialement destinés à permettre une adaptation à cette contrainte mais qui à long terme favorisent l'entrée dans un cercle vicieux aboutissant à la détérioration progressive du myocarde (**Figure 1**).

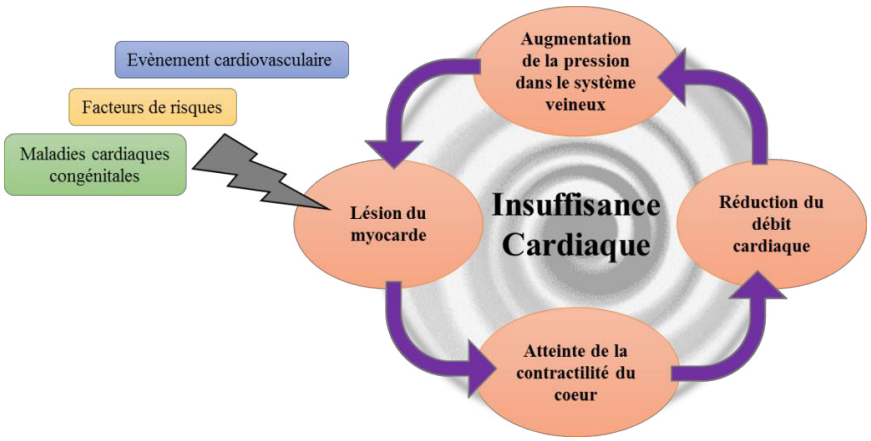


Figure 1: Schéma général simplifié des suites d'évènements conduisant à l'apparition de l'IC. Suite à *un stimulus* tel qu'un évènement cardiovasculaire, la présence de facteurs de risques ou de maladies génétiques, le myocarde subit des lésions ayant pour conséquences une altération de sa capacité à se contracter. Cette dysfonction contractile du myocarde implique une réduction du débit sanguin amenant à une augmentation de la pression sanguine dans le système de retour veineux qui sera à l'origine de nouvelles lésions du myocarde.

Symptômes

L'étude de la cohorte de Framingham débutée en 1948 sur plus de 5000 individus dans le Massachusetts [2] et qui en est désormais à sa troisième génération de patients a permis l'identification des critères de diagnostic de l'IC. Ces derniers ont été déterminés sur la base d'un suivi très régulier des patients, de leurs symptômes, leurs habitudes de vie et a ainsi permis l'identification des facteurs de risques de l'IC [3]. Ces critères sont nombreux et varient selon la sévérité avec laquelle se manifeste le syndrome d'IC. Les signes cliniques typiques sont une fatigue et des essoufflements débutant d'abord lors d'un effort physique puis au repos, pour les stades plus avancés, une orthopnée, des dyspnées nocturnes ainsi que des œdèmes et ascites (**Tableau 1**).

Symptômes cliniques
Typiques
Essoufflements
Orthopnée
Dyspnée nocturne
Diminution de la tolérance à l'exercice physique
Fatigue
Gonflement des chevilles, œdèmes
Moins fréquents
Toux nocturnes
Sifflement lors de la respiration
Prise de poids
Perte de poids (dans les cas d'IC avancée)
Sensation de ballonnement
Perte d'appétit
Confusion (plus fréquente chez les individus âgés)
Dépression
Palpitations
Syncope

Tableau 1 : Symptômes cliniques de l'IC [4].

Étiologie

Plusieurs pathologies ou facteurs de risques peuvent participer à la progression vers l'IC. En effet son étiologie est complexe et elle implique souvent la coexistence de plusieurs anomalies pouvant interagir chez un même patient. Parmi ces pathologies, on retrouve les maladies coronariennes, l'hypertension artérielle (HTA), les valvulopathies, les cardiomyopathies génétiques ou acquises, les myocardites, les maladies pulmonaires, mais également des facteurs de risques non cardiaques incluant le diabète de type 2 (DT2), l'obésité et le syndrome métabolique [4].

Bien que la prise en charge des patients présentant une IC ait été beaucoup améliorée dans les dernières décennies pour soulager les symptômes de cette condition, les études épidémiologiques portant sur l'IC indiquent qu'elle reste tout de même parmi les plus préoccupantes en termes de santé publique.

2. Épidémiologie

a. Prévalence et incidence

On compte aujourd'hui près de 26 millions de personnes dans le monde souffrant d'IC correspondant à une prévalence de 1 à 2% de la population mondiale [5]. Cette prévalence élevée est en progression constante avec une incidence d'environ 1 million de nouveaux cas par an [6], constituant de ce fait une épidémie globale. La prévalence de l'IC reste majeure face à celle par exemple du cancer qui affecte 32 millions de personnes [7] et pour le SIDA qui touche 34 millions de patients [8]. L'IC est une condition physiopathologique majoritairement chronique. Ainsi, sa prévalence est plus élevée avec l'âge (plus de 65 ans) [9], chez les hommes par rapport aux femmes [10-12], dans les pays industrialisés où l'incidence de facteurs de risques cardiovasculaires liés à des mauvaises habitudes de vie favorisant la survenue de pathologies telles que l'obésité, le DT2, les dyslipidémies sont en recrudescence importante [13]. Par conséquent, l'effet conjoint du vieillissement de la population, de la meilleure prise en charge en phase aigüe des cardiomyopathies ischémiques [14] mais aussi de l'augmentation des mauvaises habitudes de vie participent de façon majeure à la progression alarmante de l'IC dans la population.

b. Hospitalisation et morbi-mortalité

L'hospitalisation liée à l'IC représente 5 % des admissions en hôpital dans le monde [15]. C'est une condition pathologique qui reste de mauvais pronostic vital, puisqu'en moyenne, 10 % des individus admis à l'hôpital avec une IC meurent pendant leur séjour, 30 et 60 % meurent respectivement dans l'années et dans les 5 ans suivant leur admission [4]. Selon la forme d'IC diagnostiquée à l'arrivée en hospitalisation, la prise en charge du patient et le pronostic vital varient.

3. Les formes d'insuffisance cardiaque

Bien que simple dans sa définition, l'IC est un syndrome clinique complexe qui regroupe des causes et des mécanismes physiopathologiques et des expressions cliniques diverses. L'IC peut atteindre le ventricule droit (VD) ou le ventricule gauche (VG), elle peut être aiguë ou chronique dans sa survenue et dite soit à fraction d'éjection préservée, soit à fraction d'éjection réduite selon le degré d'atteinte de la fonction myocardique.

Dans ce projet, nous nous sommes particulièrement intéressés à la forme d'IC chronique atteignant le VG.

a. L'insuffisance cardiaque aiguë :

L'IC aiguë est une situation clinique très grave qui menace le pronostic vital du patient nécessitant une hospitalisation et la mise en place d'un traitement de façon urgente. En effet, elle apparaît de façon soudaine et les symptômes sont d'emblée sévère. Sa prévalence est forte chez les individus âgés de 75 ans en moyenne et chez les hommes par rapport aux femmes [16, 17]. Elle est définie comme la survenue récente et brutale de signes cliniques et symptômes traduisant une fonction myocardique altérée. L'IC aiguë peut survenir *de novo* chez un individu sain (situation rare) ou être la conséquence d'une décompensation rapide d'une IC chronique (situation la plus fréquente) [18]. L'étiologie de l'IC aiguë est variée, mais est majoritairement due à une pathologie coronarienne ou hypertensive (42% des cas). L'élément déclenchant peut également être une infection ou une arythmie (30% des cas), un écart aux traitements de l'IC (10%) ou une ischémie myocardique (<10 % des cas) [19]. La

mortalité liée à une IC aiguë est de l'ordre de 20 % dans l'année suivant le diagnostic, par décompensation aiguë ou mort subite [20].

b. L'insuffisance cardiaque chronique

L'insuffisance cardiaque chronique désigne une situation plus stable de l'IC, évoluant par une installation progressive des symptômes. Elle évolue en plusieurs stades allant de I à IV (ou de A à D selon les nomenclatures) qui ont été caractérisé par la « New York Heart Association » (NYHA) suivant la sévérité des symptômes (**Tableau 2** et **Figure 2**). Le **stade I** (ou A) correspond à celui où le patient est asymptomatique mais où la présence de facteurs de risque (HTA, athérosclérose, obésité, dyslipidémie, SMet) constitue le premier stimulus enclenchant l'évolution vers une cardiomyopathie. À ce stade, le patient ne souffre pas de gêne fonctionnelle suite à la sollicitation du muscle cardiaque comme l'exercice physique, il n'existe pas d'anomalies structurales ni fonctionnelles du cœur. Si l'évolution se poursuit, l'IC progresse ensuite vers un **stade II** où une altération de la structure cardiaque se met en place accompagnée alors d'une légère gêne fonctionnelle suite à une activité physique ordinaire se manifestant par un essoufflement, une fatigue ou des palpitations. Cependant à ce stade aucun symptôme particulier n'est observable au repos. Le **stade III**, correspond à la véritable installation des symptômes de l'IC, se caractérisant par une limitation marquée à l'effort et à l'activité physique. A ce stade, l'évolution de la condition clinique de l'IC devient vraiment handicapante car la moindre activité physique conduit à un essoufflement important mais encore asymptomatique au repos. Le **stade IV**, est le stade terminal dans l'évolution de l'IC, il se traduit par un inconfort conséquent suite à la moindre activité physique et des symptômes d'essoufflements et de fatigue sont même ressentis au repos.

Classe	Symptômes
Classe I	-stade asymptomatique -pas de gêne fonctionnelle particulière liée à l'activité physique
Classe II	-légère gêne fonctionnelle lors d'un exercice physique -une activité physique ordinaire induit un léger essoufflement, une fatigue ou des palpitations -aucun symptôme particulier au repos
Classe III	-limitation marquée de l'activité physique -la moindre activité physique conduit à un essoufflement, une fatigue et des palpitations -aucun symptôme au repos
Classe IV	-inconfort important avec la moindre activité physique -symptômes présents même au repos

Tableau 2 : Classification de l'IC selon la NYHA [4].

Les thérapies actuelles de l'IC sont majoritairement débutées au stade III dans l'évolution de l'IC, lorsque le patient arrive en consultation ou en hospitalisation avec des symptômes caractéristiques. Cependant, il est important de noter que les objectifs des nouvelles stratégies thérapeutiques à but préventif de l'IC visent à une prise en charge des patients dès le stade I ou II, alors qu'ils sont encore asymptomatiques et qu'il est encore possible d'intervenir sur les facteurs de risque [21].

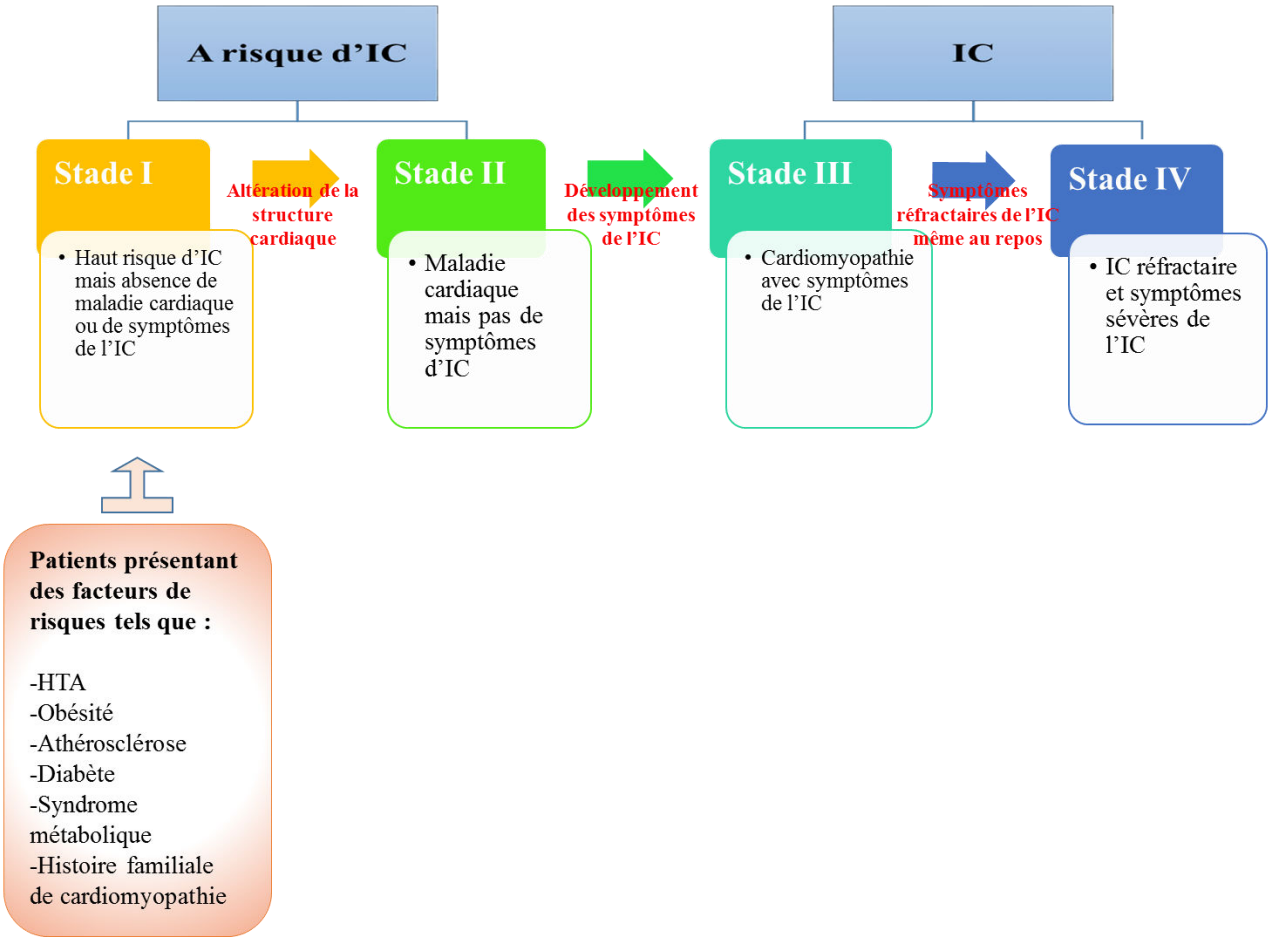


Figure 2 : Schéma présentant les stades d'évolution de l'IC.
HTA= Hypertension artérielle ; IC=insuffisance cardiaque

On distingue deux types d'IC selon le type d'anomalie fonctionnelle affectant le VG: l'insuffisance cardiaque diastolique et l'insuffisance cardiaque systolique

i. L'insuffisance cardiaque chronique diastolique

L'insuffisance cardiaque diastolique (ICD) représente 40% des cas d'IC chronique. Elle touche le plus souvent les femmes et est très fréquente chez les individus âgés. Le pronostic de l'ICD est sévère mais reste néanmoins plus faible que celui de l'IC systolique [22]. Bien que la mortalité annuelle de l'ICD soit plus basse que celle des patients présentant une dysfonction systolique, la morbidité est surtout caractérisée par une incidence élevée

d'hospitalisations récurrentes [23]. Dans l'ICD, la **fraction d'éjection** (FE) est préservée ou légèrement diminuée (>40-45 %). Elle se caractérise surtout par une rigidité relative du VG où le myocarde présente une incapacité à se distendre lors d'un stress, une hypertrophie et de la fibrose (**Figure 4**). Ceci entraine une augmentation des pressions en amont mis en évidence à l'échocardiographie doppler[24, 25].

ii. L'Insuffisance cardiaque chronique systolique

L'insuffisance cardiaque chronique systolique (ICS) est la forme majoritaire d'IC chronique (60% des cas). Elle correspondant à une altération de la fonction contractile du myocarde associant une réduction de la FE (<40-45 %), qui a pour conséquence une diminution du débit cardiaque. La diminution du débit cardiaque sera à l'origine d'une dilatation du VG (**Figure 3**), ayant pour but de maintenir le volume systolique (phénomène de Frank Starling) [26].

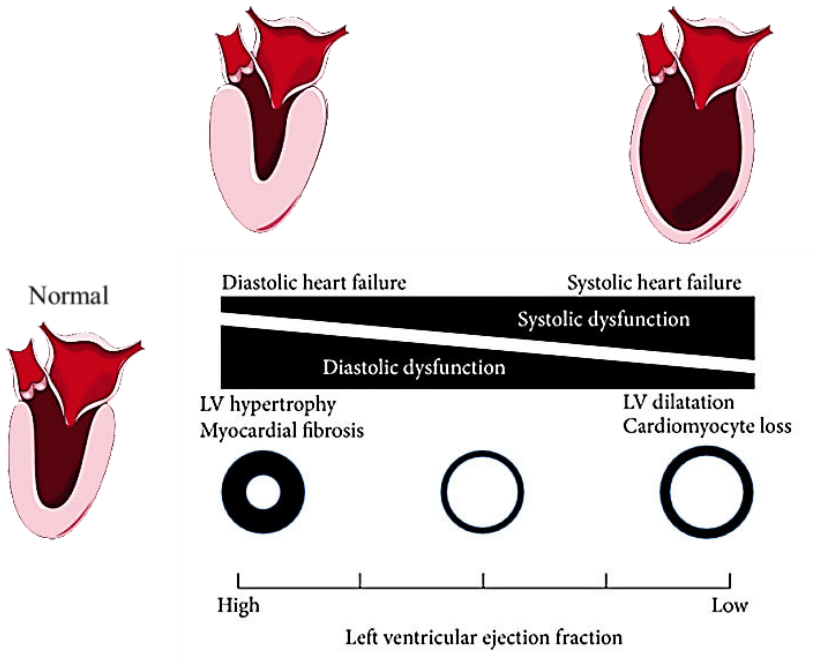


Figure 3 : Caractéristiques de l'insuffisance cardiaque diastolique (ICD) et systolique (ICS). (Adaptée de [24]). Au cours de l'ICD, le VG présente une hypertrophie et une fibrose avec une préservation de la fraction d'éjection du ventricule gauche. L'ICS se caractérise par une perte de cardiomyocytes et donc une dilatation du ventricule gauche ayant pour conséquence une réduction de la fraction d'éjection systolique.

4. Physiopathologie de l'insuffisance cardiaque

L'IC étant un syndrome clinique s'installant progressivement. Sa physiopathologie est caractérisée par deux grandes phases au cours de son évolution. Une **phase de compensation** au cours de laquelle les symptômes sont généralement stables et le patient est asymptomatique. Pendant cette phase, divers mécanismes physiologiques compensateurs se mettent en place afin de pallier aux défaillances du muscle cardiaque. Parmi eux, on retrouve une activation de systèmes neuro-humoraux qui seront décrits plus loin, dans la section « physiopathologie de l'IC » de ce manuscrit. La deuxième phase correspond à une **phase de décompensation** pendant laquelle on assiste à une aggravation aiguë des symptômes et signes cliniques amenant le patient vers une détérioration des fonctions cardiaques. Durant cette phase, les mécanismes initialement compensateurs sont dépassés, et un tableau clinique annonçant le stade terminal de l'IC se met en place [27] (**Figure 4**).

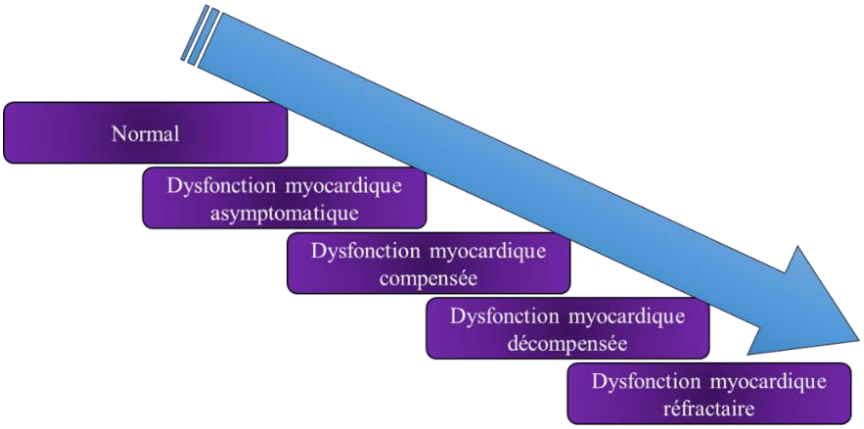


Figure 4 : Schéma de l'évolution de l'IC du stade de compensation vers la décompensation.

a. Mécanismes adaptatifs compensateurs

L'IC chronique fait intervenir des mécanismes hémodynamiques, métaboliques et neuro-hormonaux pour induire les effets adaptatifs du myocarde face à l'inadéquation entre sa fonction et les besoins énergétiques de l'organisme (**Figure 5**) [28].

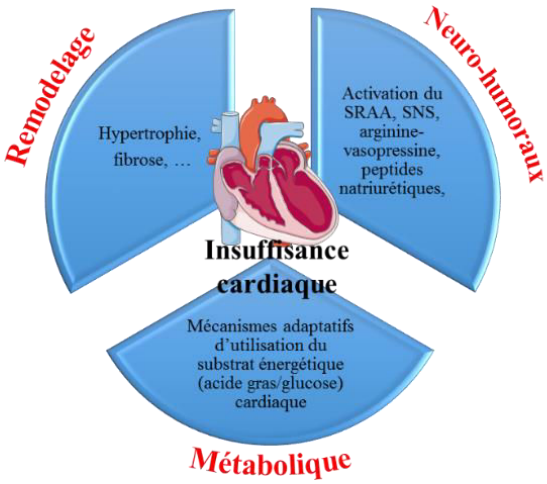


Figure 5 : Principaux mécanismes adaptatifs compensateurs de l'IC. SRAA=système rénine-angiotensine-aldostérone ; SNS=système nerveux sympathique.

i. Les systèmes neuro-humoraux :

La diminution du débit cardiaque au cours de l'IC est un facteur déterminant qui initie la stimulation des systèmes neuro-humoraux tels que le système nerveux sympathique, le système rénine-angiotensine-aldostérone et le système arginine-vasopressine qui sont détaillés ci-dessous. L'activation de ces systèmes a pour finalité une rétention hydro-sodée participant à l'augmentation de la volémie, une vasoconstriction périphérique et une stimulation de la contractilité myocardique. À long terme, cela contribue à l'augmentation de la post charge (la force s'opposant à l'éjection du sang par le VG en systole), ainsi que de l'activité du myocarde, le tout contribuant à une transition vers un remodelage myocardique. Les principaux systèmes neuro-humoraux s'activant au cours des processus de compensations de l'IC sont les suivants (**Figure 6**) :

-Une activation du **système nerveux sympathique (SNS)** ou **adrénergique**. Ce système hormonal constitue le premier mécanisme adaptatif se mettant en place pour pallier la baisse du débit cardiaque et la contractilité myocardique observée lors de l'IC (**Figure 6**). Ainsi, une libération de puissantes catécholamines telle que la noradrénaline (NA) agit au niveau des terminaisons nerveuses myocardiques et permet d'augmenter la fréquence cardiaque (effet chronotrope positif) et la contractilité du myocarde (effet inotrope positif)

via les récepteurs β1 et β2 adrénergiques. . Il s'agit du plus puissant mécanisme mis en jeu par l'organisme permettant d'augmenter les performances cardiaques, bénéfique à court terme (compensation) mais délétère à long terme (décompensation) [29, 30]. Les données expérimentales ont mis en évidence très tôt l'importance du système adrénergique dans la physiopathologie cardiaque. Ainsi, Milano CA *et al.* ont d'abord montrés que des souris surexprimant le récepteur β2 adrénergique cardiaque présentent une fonction myocardique augmentée [31]. Par la suite, Engelhardt S. *et al*. ont montré que la surexpression du récepteur β1 adrénergique au niveau cardiaque est accompagnée d'une première phase où est observée une augmentation des performances myocardiques évoluant à long terme vers une hypertrophie cardiaque et une IC [32-34]. Ceci met en évidence des activités différentielles de ces deux types de récepteur dans la régulation des performances cardiaques au cours des cardiomyopathies. La stimulation du récepteur β2 adrénergique implique une continuité dans le maintien d'une hypercontractilité cardiaque alors que la stimulation du récepteur β1 adrénergique implique une hypercontractilité dépendante du temps. Par ailleurs, l'antagonisation des récepteurs β adrénergiques prévient les lésions myocardique dans divers modèles expérimentaux [35-38], et les inhibiteurs spécifiques permettant d'y parvenir, les β-bloquants, font aujourd'hui partie du traitement conventionnel de l'IC congestive [39, 40].

-Une activation du **système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA).** Un chapitre spécifique (chapitre III) est dédié au rôle du SRAA dans la physiopathologie de l'IC dans ce manuscrit**.** L'implication du SRAA dans les mécanismes adaptatifs de l'IC s'opère de manière plus tardive en comparaison avec le SNS. La baisse de la PA et l'hypoperfusion rénale au cours de l'IC sont à l'origine de la stimulation du SRAA (**Figure 6**). Ainsi, le SRAA activé permet le maintien de l'homéostasie circulatoire puisqu'il contribue à la rétention hydro-sodée induisant une augmentation de la volémie et l'augmentation de la pression de remplissage donc la précharge (force qui distend les fibres myocardiques avant leur contraction). Tout comme l'hyperactivation du SNS, l'activation à long terme du SRAA participe aux mécanismes maladaptatifs (ou de décompensation) puisque les principales hormones du SRAA, à savoir l'angiotensine II et l'aldostérone exercent des effets pro-hypertrophiques et pro-fibrosants au niveau cardiaque [41].

-Une augmentation du **système arginine-vasopressine (SAV).** La vasopressine est une hormone antidiurétique qui est secrétée par l'hypophyse antérieure suite à l'activation du SRAA (**Figure 6**). Elle agit via les récepteurs V1a exprimés au niveau des cellules musculaires lisses vasculaires en participant à la vasoconstriction périphérique, ainsi qu'au niveau des cardiomyocytes en induisant une accumulation de Ca^{2+} intracellulaire responsable d'un effet inotrope positif. Elle agit également via le récepteur V2 qui possède des effets inverses à ceux du V1a. Le V2 est exprimé au niveau du rein et sa stimulation par la vasopressine provoque une rétention hydro-sodée. Le récepteur s'exprime également au niveau des cellules endothéliales où il participe à la vasorelaxation. Il a été montré que l'ajout de vasopressine sur des cultures primaires de cardiomyocytes néonataux de rat induit une hypertrophie cellulaire en augmentant la synthèse protéique et l'expression de *c-fos* responsable de la croissance myocytaire [42]. L'antagonisation du V1a dans un modèle d'IC chez le rat, provoquée par ligature de l'artère coronaire, montre des effets diurétiques et des bénéfices sur le développement de l'IC [43]. De plus, une étude tout à fait récente menée sur des cardiomyocytes isolés de rats adultes *in vitro* et *ex vivo* montre un effet synergique des V1a et des récepteurs β1 adrénergiques dans l'induction des effets physiopathologiques de l'IC [44]. Par ailleurs, l'étude clinique **EVEREST** (*Efficacy of Vasopressin Antagonism in hEart failuRE: Outcome Study With Tolvaptan*) montre des effets bénéfiques de l'antagonisation de la vasopressine chez des patients souffrant d'une IC [45].

-Une augmentation de la **production des facteurs peptidiques natriurétiques : le peptide atrial natriurétique** (Atrial natriuretic peptide, **ANP**) et **le peptide cérébral natriurétique** (Brain natriuretic peptide, **BNP**) qui sont secrétés sous l'effet de la distension des cavités cardiaques auriculaires et ventriculaires provoquée par le stress pariétal. Ces peptides ont un puissant effet natriurétique, diurétique et vasodilatateur. Ils contribuent ainsi de façon importante à la diminution de la charge cardiaque en augmentant l'excrétion hydro-sodée initialement activée par le SRAA. Ils ont par ailleurs également des rôles anti-hypertrophiques et anti-fibrosants [46]. De nombreuses études expérimentales ont montré les effets cardiovasculaires importants des peptides natriurétiques : les premières études de Tamura N *et al.* ont montré que les souris déficientes en BNP développent une importante fibrose cardiaque [47]. Plus récemment, Crivellente F. *et al.* ont montré que dans diverses

souches de rats (Wistar (sain), Sprague-Dawley (sain) et SHR (spontanément hypertendu)), les taux d'ANP corrèlent avec la masse ventriculaire gauche des rats [48]. Dernièrement, Sergeeva IA *et al.* ont montré un résultat innovant mettant en évidence la possibilité d'identifier les régions cardiaques soumises aux effets de stress liés à l'ANP et BNP *in vivo* chez la souris. Cette nouvelle stratégie pourrait être utilisée dans l'imagerie fonctionnelle destinée à identifier *in vivo* l'hypertrophie cardiaque et les régions myocardiques infarcies et ainsi aider au diagnostic des MCV [49]. En clinique, l'analyse combinée de l'échocardiographie et des taux de BNP a déjà permis de mieux stratifier le risque d'IC [50], ainsi la transposition de cette technique d'imagerie pourrait être potentiellement intéressante. Le dosage du BNP est utilisé en routine en clinique chez les patients insuffisants cardiaques afin de mesurer la sévérité et le stade de l'IC.

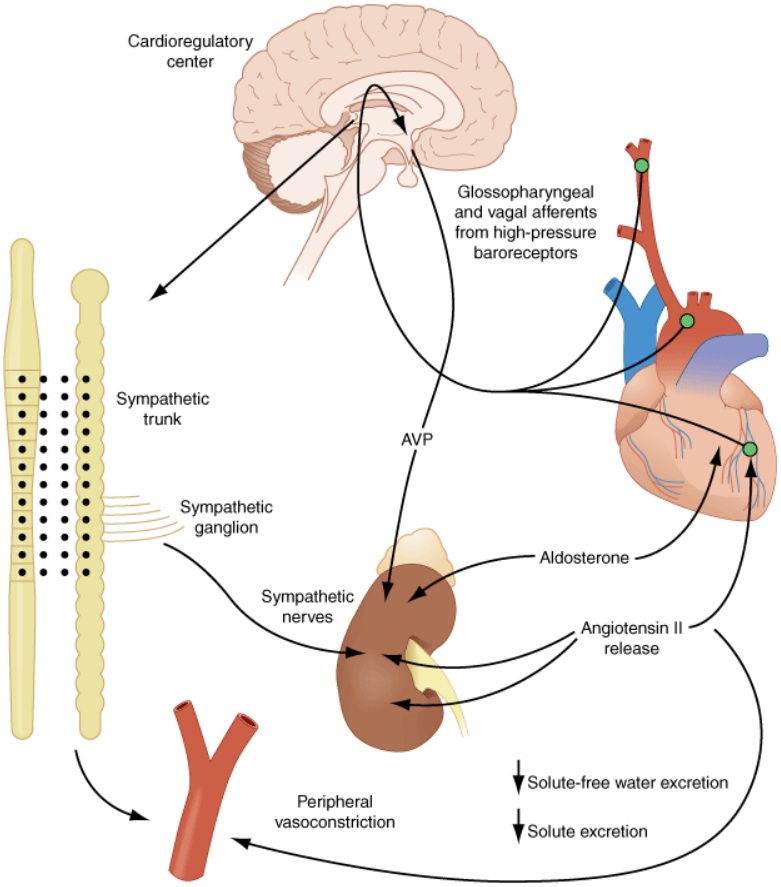


Figure 6 : Systèmes neuro-humoraux impliqués dans les mécanismes adaptatifs de l'IC [51]. AVP=arginine vasopressine.

D'autres substances sont également sécrétées et participent aux processus compensateurs de l'IC, tels que **l'endothéline-1** (ET-1), un vasoconstricteur très puissant principalement relargué par les cellules endothéliales favorisant également la prolifération cellulaire, la fibrose [52] et la contractilité myocardique[53] ; **le neuropeptide Y** (NPY), un peptide vasoconstricteur sécrété par les terminaisons nerveuses sympathiques avec la NA et participant à la vasoconstriction périphérique[54] ; **le peptide adrénomédulline**, à propriété vasoactive, qui est retrouvé en grande quantité dans les oreillettes cardiaques, la glande surrénale et l'hypophyse, et qui compense les effets vasoconstricteurs opérant au cours de l'IC [55-57] ; **la bradykinine** (BK), qui est une kinine puissamment vasodilatatrice faisant partie du **système kallicréines-kinines** (SKK) et qui agit via les récepteurs B1 et B2 de la BK. Le SKK est un système qui contrebalance les effets du SRAA puisque l'enzyme de conversion de l'angiotensinogène impliquée dans la cascade de production de l'aldostérone est également l'enzyme qui dégrade la BK [58] ; **l'apeline**, peptide vasoactif qui a suscité un récent intérêt dans l'IC du fait de son puissant effet inotrope positif au niveau du myocarde sans induire d'effets hypertrophiques. Les taux d'apeline sont fortement diminués au cours de l'IC [59, 60].

L'adaptation de l'organisme à la déficience cardiaque par la mise en jeu de système neuro-humoraux s'accompagne également d'une adaptation des propriétés métaboliques intrinsèques du myocarde. Ces adaptations métaboliques sont cruciales dans la régulation de l'activité du myocarde au cours de l'IC.

ii. Adaptations métaboliques

Le travail en continu du muscle cardiaque implique une consommation permanente d'énergie par ce dernier. Pour ce faire, le myocarde est capable d'utiliser plusieurs types de substrats énergétiques. De façon préférentielle et importante, le myocarde utilise les acides gras (AG), cette source d'énergie est riche et prolongée, mais demande une consommation accrue d'oxygène. Le glucose est la deuxième source d'énergie, sa consommation est plus rapide et moins coûteuse en oxygène, mais son rendement énergétique est moindre par rapport aux AG. D'autres substrats tels que les corps cétoniques, le lactate et les acides

aminés sont également minoritairement utilisés. Le choix du substrat énergétique est établi en fonction des conditions physiologiques et permet ainsi au myocarde de s'adapter en permanence aux besoins énergétiques en fonction des situations [61].

L'utilisation des AG par le myocarde se fait à travers la **β-oxydation mitochondriale**. Le transport des AG au sein des cardiomyocytes est assuré par le transporteur des AG, le CD36 (ou FAT). Au sein de la cellule cardiaque, les AG sont transformés en acyl-CoA par l'acyl-CoA synthase dans le cytoplasme, entrent dans la mitochondrie grâce aux carnitine Palmitoyl transférases (CPT1 et CPT2). Une fois dans la mitochondrie, l'acyl-CoA est oxydé en acétyl-CoA par la β-oxydation et entre par la suite dans le cycle de Krebs pour produire du NADH et FADH2 qui via la phosphorylation oxydative produisent de l'ATP à partir de l'ADP et l'oxygène. Pour le glucose, son entrée dans la cellule se fait via les transporteurs de glucose GLUT1 et GLUT4, dans le cytoplasme il est transformé en pyruvate par la **glycolyse** qui est constituée de deux phases: la **phase préparatoire** qui est consommatrice d'énergie (ATP) et la **phase de remboursement** qui produit de l'ATP [62].

Dans l'IC, un déséquilibre existe entre les besoins énergétiques du cœur et la capacité de cet organe à subvenir à ses besoins [61]. Cette inadéquation s'accompagne d'une inaptitude du myocarde à utiliser les AG en raison de l'importante consommation en oxygène qu'ils requièrent. Pour s'adapter, le cœur modifie son substrat énergétique de préférence, en passant des AG au glucose moins consommateur d'énergie et d'oxygène [63]. Ce phénomène connu sous le nom de **transfert de substrat énergétique** (ou « *switch* » énergétique) au niveau du myocarde s'opère de manière très précoce au cours du développement de l'IC (**Figure 7**), généralement suite à l'activation des systèmes neuro-humoraux. L'utilisation du glucose en tant que substrat énergétique du myocarde est un processus fœtal qui disparaît dans le myocarde adulte. Au cours de l'IC, le cœur s'adapte en réactivant des programmes d'expression génique fœtaux pour pallier aux défaillances physiologiques auxquels il fait face. Ainsi l'utilisation du glucose devient majoritaire et la phase préparatoire est diminuée alors que la phase de remboursement est augmentée [64]. À long terme, ce processus adaptatif du métabolisme énergétique cardiaque devient délétère et conduit au développement d'hypertrophie, fibrose et remodelage cardiaque (**Figure 7**).

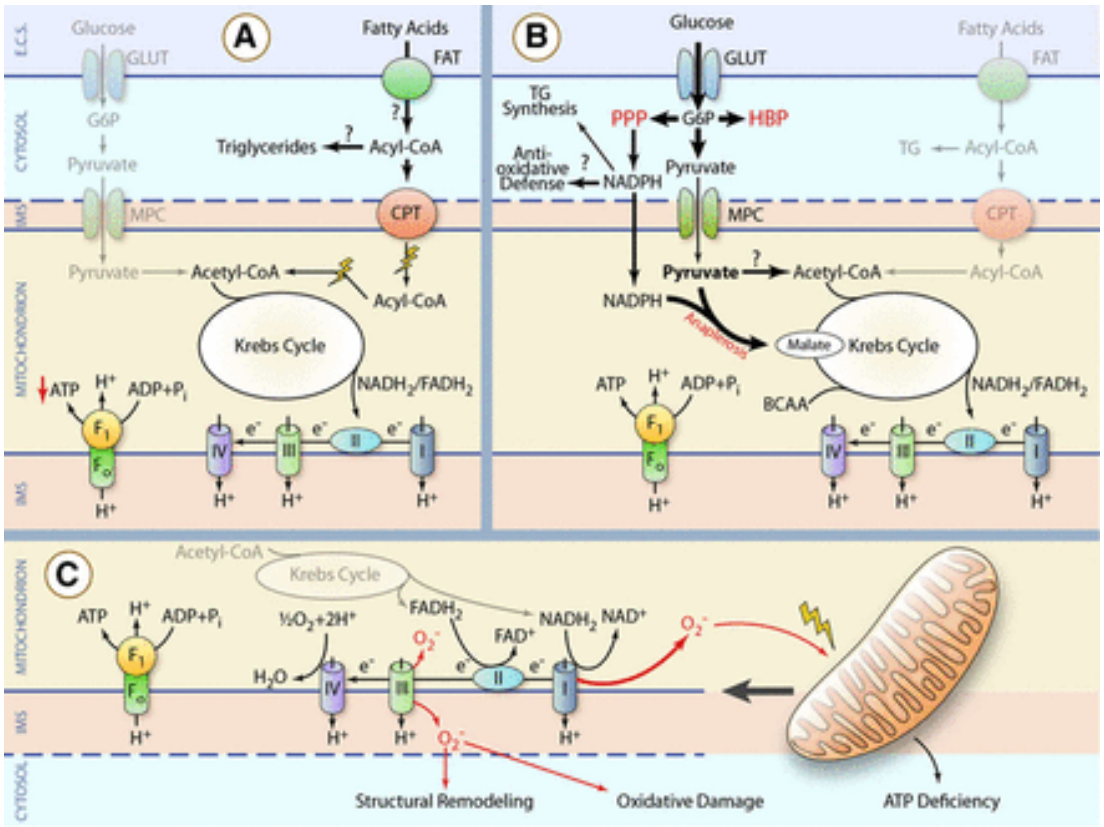


Figure 7 : Schéma illustrant l'utilisation du métabolisme cardiaque au cours du développement de l'IC [61]**.** Au cours de l'IC, l'utilisation des acides gras est réduite, entrainant une baisse de la production d'ATP (A), alors que l'utilisation du glucose est favorisée (B) ainsi qu'une altération de la phosphorylation oxydative au niveau mitochondriale (C) contribuant à un stress oxydatif et au remodelage cardiaque. BCAA=branched-chain amino acid; CoA=coenzyme A; CPT=carnitine palmitoyltransferase; FAT=fatty acid transporter; G6P=glucose 6-phosphate; GLUT=glucose transporter; HBP=hexosamine biosynthetic pathway; IMS=mitochondrial intermembrane space; PPP=pentose phosphate pathway; TG=triglycerides.

De nombreux travaux expérimentaux ont mis en évidence que la régulation du métabolisme énergétique au niveau cardiaque est sous la dépendance de la famille des récepteurs activés par les proliférateurs de peroxysomes, **PPAR** (peroxisome proliferator-activated receptor family) [65, 66]. Ainsi, des souris surexprimant PPARα au niveau cardiaque développent un surcroît d'oxydation des AG myocardiques, ce qui a pour conséquence une diminution de l'utilisation du glucose, une accumulation de triglycérides (TG) et un phénotype de cardiomyopathie diabétique [67, 68]. De plus ces souris présentent une hypertrophie cardiaque et une dysfonction myocardique. La déficience en CD36 permet de prévenir ces effets [69]. Par ailleurs, des souris déficientes en **PPARα** présentent le phénotype inverse : une diminution d'oxydation des AG et une augmentation de l'utilisation du glucose au niveau cardiaque [70]. Chez l'homme, l'hypertrophie cardiaque et l'IC sont caractérisées par

une diminution d'expression de PPARα [71] . Ces données confirment le « *switch* » de substrat énergétique observé dans les cardiomyopathies et l'IC. Par ailleurs d'autres récepteurs nucléaires participent à cette régulation d'utilisation de l'énergie au niveau cardiaque comme les autres isoformes de PPAR : **PPARβ** et **PPARδ**. Ainsi, la déficience en PPARβ et PPARδ cardiaques dans un modèle de souris est responsable de la diminution de taux d'oxydation d'AG [72]. Concernant l'isoforme **PPARγ**, bien que son expression soit minime dans le cœur, des études expérimentales ont montré que sa surexpression au niveau myocardique est responsable d'une dysfonction cardiaque associée à une accumulation de lipides ainsi que des altérations mitochondriales [73]. Cependant, une autre étude a révélé que PPARγ ne joue pas de rôle dans la régulation du métabolisme énergétique au niveau cardiaque, alors que l'utilisation d'agonistes de PPARα permettent de protéger le cœur de souris déficientes en PPARγ de la lipotoxicité induite par un régime riche en gras [74]. Un autre acteur important dans la régulation du métabolisme au niveau cardiaque est le co-activateur 1α de PPARγ (**PGC-1α**). Plusieurs études ont montré son rôle important dans le contrôle du métabolisme énergétique cardiaque aussi bien chez l'homme que dans des modèles expérimentaux d'IC, et ont révélé que son expression est diminuée dans l'IC [75-78].

La régulation du métabolisme énergétique est donc un phénomène important au cours de la physiopathologie de l'IC. Le mécanisme adaptatif de basculement vers l'utilisation du glucose est bénéfique à court terme mais délétère si la pathologie continue de progresser. Cette évolution s'accompagne d'un remodelage cardiaque et d'une fibrose.

iii. Le remodelage cardiaque :

Suite aux modifications neuro-humorales et métaboliques importantes que subit le myocarde au cours des processus de l'IC, un phénomène de remodelage ventriculaire se met en place afin de compenser la surcharge mécanique volumique ou de pression (HTA) et l'altération contractile du VG. Cependant, il est important de noter qu'à long terme, le phénomène de remodelage est directement lié à la future dégradation des performances myocardiques. Ainsi, cette suite de modifications biologiques et structurelles du myocarde

qui participe au remodelage ventriculaire constitue la transition entre un phénomène physiologique d'adaptation et un phénomène pathologique d'altération accompagnant l'évolution de l'IC [79]. Le remodelage ventriculaire correspond à une modification de la géométrie et de la structure du VG se traduisant par une hypertrophie, une dilatation et une fibrose du ventricule. On distingue deux types de remodelage en réponse à la surcharge hémodynamique : le remodelage hypertrophique **concentrique** faisant suite à une surcharge de pression (HTA) et le remodelage **excentrique** faisant suite à une surcharge volumique (**Figure 8**). Le remodelage concentrique se caractérise par une augmentation de l'épaisseur des parois ventriculaires au dépend du diamètre de la cavité interne du VG. Ce phénomène s'opère par l'addition d'unités sarcomériques, en parallèle les unes par rapport aux autres, et contribue ainsi à l'augmentation de la taille des cardiomyocytes. Quant au remodelage excentrique, il se caractérise par l'allongement des cardiomyocytes par une addition sériée d'unités sarcomériques contribuant à une dilatation de la cavité ventriculaire (**Figure 8**).

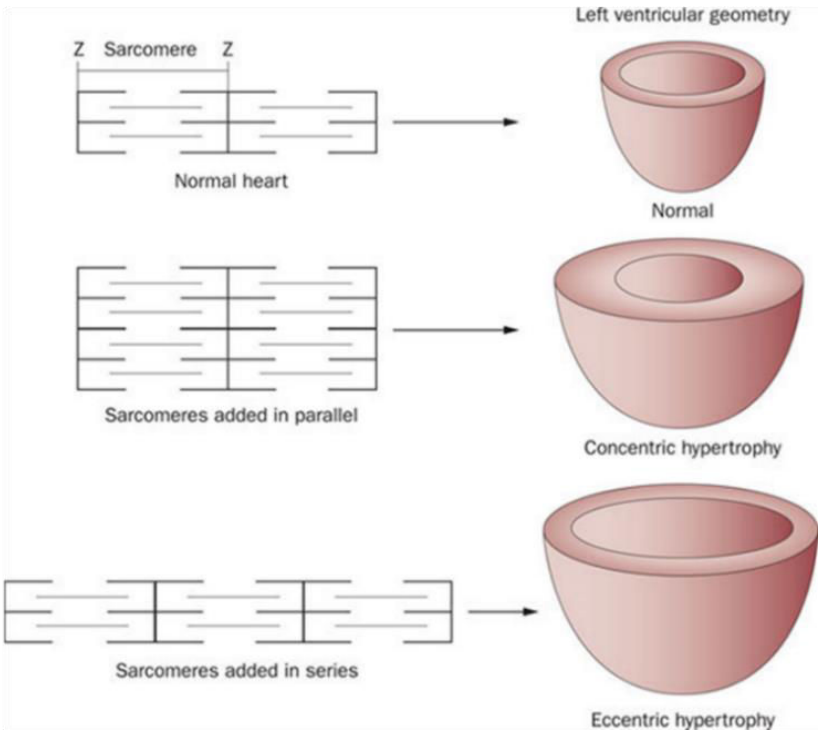


Figure 8 : Types de remodelages ventriculaires : concentrique et excentrique [80]. Suite à une surcharge barométrique, le myocarde met en place des mécanismes adaptatifs de remodelage hypertrophique concentrique faisant appel à l'addition parallèles de sarcomères. Alors qu'une surcharge volumétrique induit l'addition de sarcomères en série conduisant à un remodelage hypertrophique dit excentrique.

La signalisation hypertrophique cardiaque s'opérant au cours du remodelage ventriculaire fait intervenir: l'activation des récepteurs couplés aux protéines G (**RCPG**) ; la voie des protéines kinases activées par des mitogènes (*mitogen-activated protein kinases* (**MAPK**)); la voie du facteur nucléaire des lymphocytes T activés (*calcineurin-nuclear factor of activated T cells* (**NFAT**)) ; La voie des phosphoinositide 3-kinase (**PI3K**) – **AKT** ; et la voie des histones déacétylases (**HDAC**), qui ensemble, sont à l'origine de la stimulation de facteurs de transcription tel que le facteur 2 activateur des myocytes (*myocyte enhancer facteur 2,* **MEF2**), **NFAT** et **GATA4** (*GATA motif binding protein 4*) induisant l'expression de gènes fœtaux normalement non exprimés dans le myocarde adulte. La réexpression du programme fœtal au niveau cardiaque participe à la synthèse de protéines impliquées dans la croissance cellulaire contribuant ainsi au phénomène d'hypertrophie myocardique.

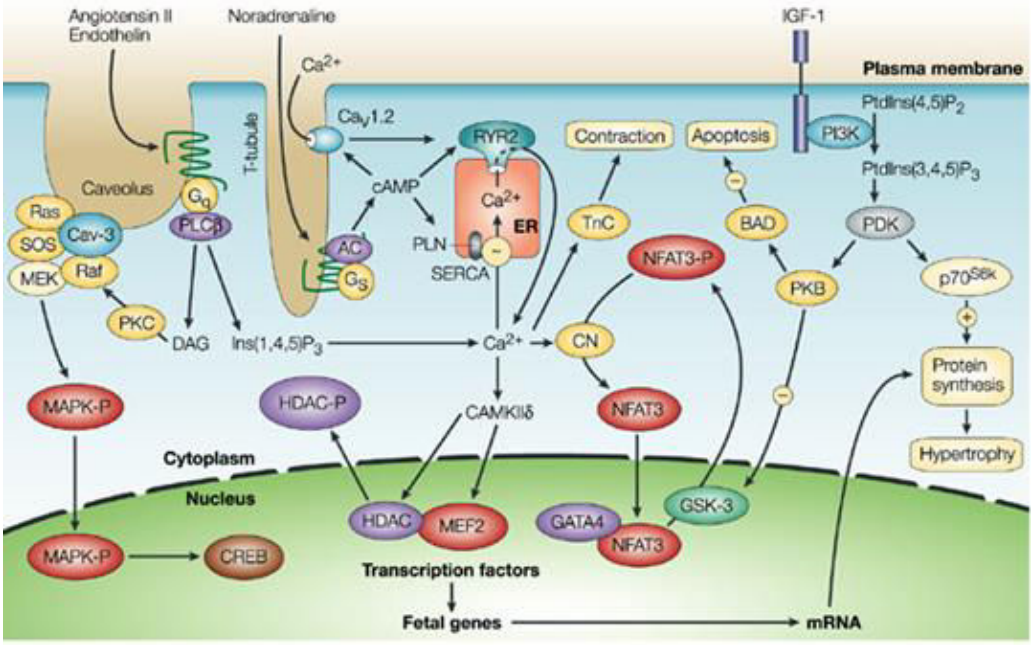


Figure 9 : Principales voies de signalisations impliquées dans les mécanismes d'hypertrophie cardiaque [81]**.** L'activation de ces voies de signalisation converge vers la ré-expression du programme fœtal participant à la synthèse de protéines impliquées dans la croissance cellulaire et donc d'hypertrophie myocardique. Cav-3, caveolin-3; GATA4, zinc-finger transcription factor; HDAC, histone deacetylase; MEF2, myocyte enhancer factor 2; MEK, MAPK kinase; NFAT, nuclear factor of activated T cells; PDK, phosphoinositide-dependent protein kinase; PKB, protein kinase B; PKC, protein kinase C; PtdIns(4,5)P2, phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate; PtdIns(3,4,5)P3, phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate; SOS, Son of sevenless; TnC, troponin C.

En parallèle à l'hypertrophie myocardique, d'importantes modifications de la matrice extracellulaire (**MEC**) sont mises en jeu. Lors du remodelage cardiaque, le **collagène** (I et III), **fibronectine**, **laminine** et **vimentine** envahissent progressivement le myocarde contribuant à la fibrose myocardique. En outre, une famille d'enzymes lytiques du collagène appelées métalloprotéinases matricielles (matrix métalloproteinases, **MMP**) [82] joue un rôle majeur dans le remodelage cardiaque. Une fois activées, les MMP sont capables de dégrader les composants de la MEC (**Figure 10**). Leur activité est sous la régulation des inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases matricielles (**TIMP**) exprimées par les cardiomyocytes et fibroblastes cardiaques. Au cours du remodelage cardiaque accompagnant l'IC, l'activité de la **MMP-2** et de la **MMP-9** est particulièrement augmentée, et celle de la **TIMP-1** est diminuée favorisant alors la protéolyse de la MEC, une fibrose et une dilatation ventriculaire [82]. Cette fibrose contribue à l'augmentation de la rigidité pariétale affectant alors les propriétés de contractilité et de relaxation du myocarde.

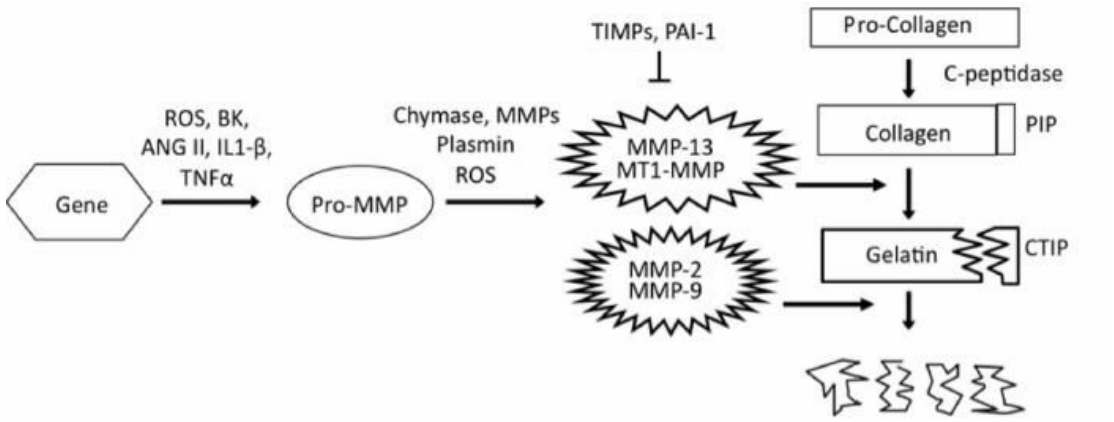


Figure 10 : Schéma présentant le mécanisme d'activation des MMP et leurs actions sur la dégradation de la MEC [83]. ROS=espèces réactives de l'oxygène ; BK=bradykinine ; ANG II=angiotensine II ; IL1-β=Interleukine 1β ; TNFα=facteur tumoral nécrosant α ; MMP=métalloprotéinases matricielle ; TIMP=inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases matricielles.

De la même façon, l'inflammation est un processus majeur impliqué dans le remodelage cardiaque. Ainsi, des cytokines pro-inflammatoires comme **le facteur tumoral nécrosant alpha** (TNF-α) et de **l'interleukine1-β** (IL-1β), sont sécrétées par les cardiomyocytes et fibroblastes cardiaques en réponse à l'altération du myocarde. Leur rôle primaire est de

protéger le myocarde contre les lésions mais leur sécrétion prolongée entraîne l'enclenchement d'une inflammation qui a des effets néfastes sur le tissu matriciel du cœur en activant les MMP.

Les effets conjoints de tous ces mécanismes (neurohumoraux et métaboliques) se renforçant mutuellement (**Figure 11**), conduisent à une perte progressive des cardiomyocytes par nécrose, apoptose et autophagie avec pour résultat ultime une hypertrophie cardiaque et une fibrose conduisant au dysfonctionnement cardiaque.

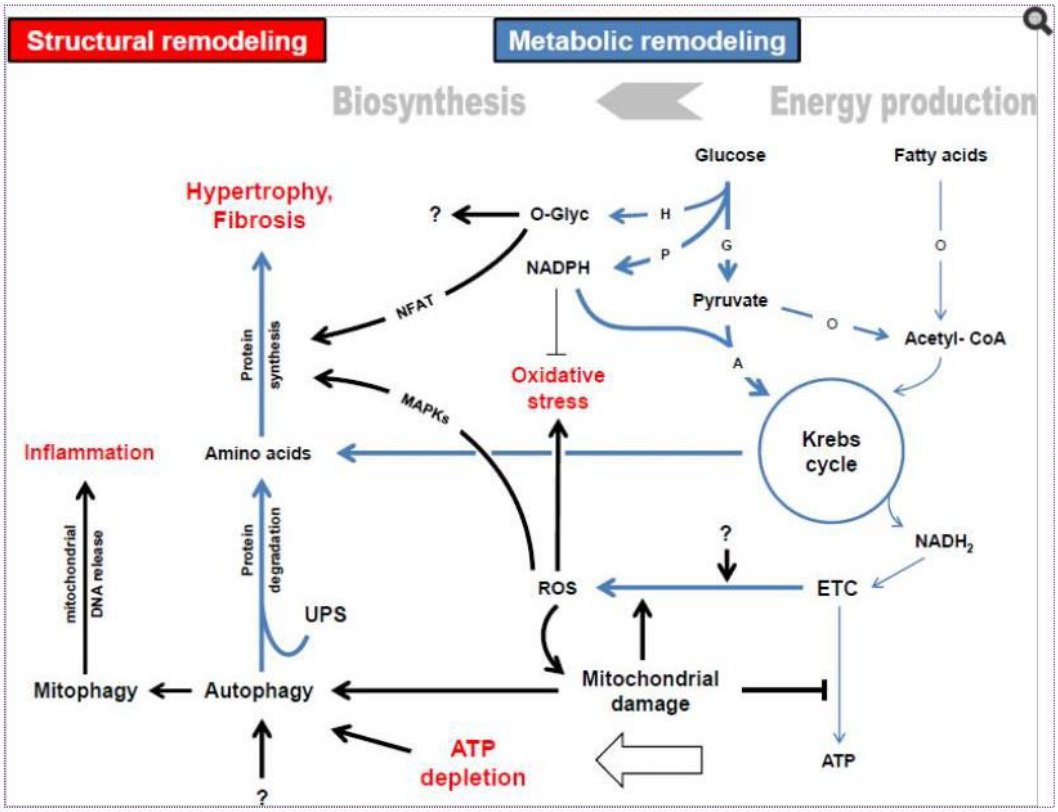


Figure 11 : Relation entre les mécanismes de remodelage cardiaque structurel et le remodelage cardiaque métabolique lié aux altérations d'utilisation du substrat énergétique [61]**.** H= Hexosamine biosynthetic pathway (HBP); P= Pentose phosphate pathway (PPP); G= Glycolysis; A= Anaplerosis; O= Oxidation; ETC= Electron transport chain; ROS= reactive oxygen species; UPS= ubiquitin-proteasome system. Blue=metabolic pathways; bold lines= pathways that are increased; Thin lines= pathways/ processes that are decrease.

Les multiples systèmes neuro-humoraux et molécules intervenant dans divers mécanismes lésionnels sont d'importants **acteurs moléculaires** permettant d'expliquer la

physiopathologie de l'IC. Il n'est donc pas étonnant que la présence de certains d'entre eux au niveau des fluides biologiques (urine, sang) signe la pathologie cardiaque et qu'ils se comportent comme des marqueurs de l'IC. En conséquence, leur détection et leur dosage permettent, notamment, de diagnostiquer l'IC ou de caractériser le stade d'évolution de la pathologie chez les patients.

b. Acteurs moléculaires utilisés dans le diagnostic de l'insuffisance cardiaque

i. Médiateurs neuro-hormonaux:

Parmi les médiateurs neuro-hormonaux évoqués dans les sections précédentes, les peptides natriurétiques, **ANP** et le **BNP** ont été les plus largement utilisés en clinique pour compléter le diagnostic de l'IC. Le BNP qui est libéré par les cardiomyocytes ventriculaires après clivage du pro-BNP en NT-proBNP et BNP s'est révélé être un marqueur très spécifique de la dysfonction ventriculaire et a montré un intérêt diagnostic majeur dans l'ICD (**Tableau 3**).

Myocardial insult	Neurohormonal activation	Remodeling
Myocyte stretch • NT-proBNP, BNP, MR-proANP	**Renin angiotensin system** • Renin, angiotensin II, aldosterone	**Inflammation** • C-reactive protein, tumor necrosis factor α, Fas, interleukins, osteoprotegerin, adiponectin
Myocardial Injury • Troponin T, troponin I	**Sympathetic nervous system** • Norepinephrine, Chromogranin A	**Hypertrophy/Fibrosis** • Matrix metalloproteinases, collagen propeptides, galectin 3, soluble ST2
Oxidative stress • Myeloperoxidase, oxidized low-density lipoproteins, MR-proADM	**Arginine vasopressin system** • Arginine vasopressin	**Apoptosis** • GDF-15

BNP = B-type natriuretic peptide, GDF-15 = growth differentiation factor-15, MR-proADM = mid-regional pro adrenomedullin, MR-proANP = mid-regional pro atrial natriuretic peptide, NT-proBNP = N-terminal pro B-type natriuretic peptide.

Tableau 3 : Principaux acteurs moléculaires utilisés dans le diagnostic de l'IC [84].

Par ailleurs, le BNP s'est également montré capable de stratifier la sévérité de l'IC puisque ses taux circulants sont proportionnels au degré d'IC [85, 86]. De plus, la diminution des taux circulants de BNP observée lors des traitements thérapeutiques témoigne de sa forte corrélation au pronostic de l'IC. Cependant, il est important de noter que certaines pathologies ou comorbidités associées à l'IC influencent les taux circulants de BNP. Par exemple, l'obésité est associée à des taux de BNP diminués [87] (**Tableau 4**).

Factors that decrease BNP or NT-proBNP
• Obesity
Factors that increase BNP or NT-proBNP
Heart muscle disease
• Hypertrophic heart muscle diseases
• Infiltrative myocardiopathies, such as amyloidosis
• Acute cardiomyopathies, such as apical ballooning syndrome
• Inflammatory, including myocarditis and chemotherapy
• Coronary artery disease
Valvular heart disease
• Aortic stenosis and regurgitation
• Mitral stenosis and regurgitation
Arrhythmia
• Atrial fibrillation and flutter
Cardiotoxic drugs
• Anthracyclines and related compounds
Renal dysfunction
Anemia
Critical illness
• Bacterial sepsis
• Burns
• Adult respiratory distress syndrome
Stroke
Pulmonary heart disease
• Sleep apnea
• Pulmonary embolism
• Pulmonary hypertension
• Congenital heart disease

BNP = B-type natriuretic peptide, NT-proBNP = N-terminal pro B-type natriuretic peptide.

Tableau 4: Facteurs influençant l'interprétation clinique des taux de BNP mesurés [84]**.**

Nous avons vu plus haut que parmi les mécanismes compensateurs se mettant en place dans l'IC, le SRAA et le système adrénergique jouent un rôle majeur. Ainsi, des taux augmentés **d'angiotensine II**, une activité accrue de la **rénine plasmatique [88]**, de **l'aldostérone [89],** et de **l'adrénomédulline [57, 90]** et l'augmentation des **catécholamines** circulantes sont des indicateurs pronostiques de l'IC (**Tableau 3**).

ii. Marqueurs du remodelage cardiomyocytaire :

Les mécanismes compensateurs mis en place lors du développement de l'IC font intervenir un processus de remodelage myocardique aboutissant à de la fibrose tissulaire. La mise en place de ce processus se traduit par une perturbation des myocytes ayant pour conséquence le relargage de molécules telle que **la troponine (Troponine T** et **Troponine I)** qui est le marqueur majoritaire de lyse myocytaire, l'élévation de sa concentration dans le sang

circulant étant directement corrélée au statut hémodynamique et au pronostic de la maladie mais également à sa rapidité d'évolution. Parmi les marqueurs du remodelage myocytaire, existe aussi **la protéine de liaison aux AG cardiaques** (heart-type fatty acid binding protein) et **la chaîne légère de type 1 de la myosine** (myosin light chain-1). Ces marqueurs peuvent être utilisés en combinaison avec d'autres biomarqueurs plus puissants tel que le BNP pour permettre une meilleure stratification de l'IC.

Un intérêt très particulier a été porté sur les biomarqueurs du remodelage de la MEC. Parmi les biomarqueurs mis en évidence dans ce contexte, on retrouve les **MMP** et les **peptides de collagène** (procollagène de type I **(PICP),** type I collagène télopeptide **(CITP),** propeptide N-terminal du procollagène de type III **(PIIINP)),** la cardiotrophine-1 **(CT-1)** une cytokine impliquée dans l'hypertrophie cardiaque et le dysfonctionnement des cardiomyocytes dont les concentrations corrèlent avec le stade d'IC [91-93]**.** Un nouveau biomarqueur de remodelage dans l'IC, **la protéine ST2 soluble,** correspondant au récepteur à l'interleukine 33 s'est révélé être un marqueur important de la progression de l'IC puisque les taux plasmatiques de ST2 corrèlent avec plusieurs paramètres de l'IC [94]. Il en va de même pour **la galectine 3**, une glycoprotéine faisant partie de la famille des lectines [95].

iii. Marqueurs de la réponse inflammatoire

Le caractère prédictif des marqueurs de la réponse inflammatoire dans l'IC a été montré dans plusieurs études, mais ces marqueurs n'ont aucune spécificité liée à l'IC *perse* puisqu'ils sont retrouvés dans de nombreuses autres pathologies. Cependant, leur présence renseigne sur l'état inflammatoire du patient. Leur mesure, combinée avec celle de marqueurs plus spécifiques de l'IC, permet d'améliorer leur spécificité. Parmi ces marqueurs, on retrouve les récepteurs des interleukines (IL): **IL-1, IL-2** et **IL-18**, mais également la protéine chémoattractive des monocytes (Monocyte chemoattractant protein-1, **MCP-1**).

5. Traitements de l'insuffisance cardiaque

Le traitement de l'IC repose principalement sur des stratégies visant à réduire l'hyperactivation des systèmes neuro-humoraux devenant délétères à long terme comme vu précédemment. Ils permettent ainsi de soulager les différents symptômes de l'IC, d'éviter les

admissions en hospitalisation et de prolonger la survie du fait d'une meilleure prise en charge des patients. La prise en charge thérapeutique de l'IC s'est sans cesse améliorée au travers de nombreux essais cliniques randomisés et l'arsenal pharmacologique représente aujourd'hui le cœur de la prise en charge des patients atteints d'IC. Si de nombreuses molécules efficaces existent désormais, l'adaptation du traitement à chaque type d'IC reste complexe en raison de la difficulté à diagnostiquer avec précision le type et le stade d'évolution de l'IC chez les patients. Par exemple, très peu d'essais cliniques ont étudiés l'ICD, de ce fait il existe peu de traitement efficace de cette forme d'IC, contrairement à sa forme plus évoluée, l'ICS.

Parmi les systèmes neuro-humoraux, le SRAA et le SNS sont ceux majoritairement impliqués dans la physiopathologie de l'IC. Ainsi, une série d'inhibiteurs et antagonistes pharmacologiques ont démontré leur efficacité dans le traitement de l'IC.

Au cours de ma thèse, nous nous sommes particulièrement intéressés aux effets délétères de l'aldostérone, c'est pourquoi un chapitre particulier est réservé pour le SRAA dans ce manuscrit, mais pour comprendre dans un premier temps l'action des traitements de l'IC, voici une présentation générale de ce système et des traitements pharmacologiques visant à atténuer son activation (**Figure 12**) :

-**Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine II (IEC)**. L'**enzyme de conversion de l'angiotensine II** (ECA) a pour rôle le clivage enzymatique de l'**angiotensine I** en **angiotensine II**. Ce dernier, un peptide vaso-actif se fixe au niveau des **récepteurs de type I de l'angiotensine II** (AT1R) exprimés au niveau des cellules musculaires lisses vasculaires et induit une vasoconstriction pour compenser les effets de baisse de pression artérielle (PA) observée lors de l'IC. Pour potentialiser cet effet, l'angiotensine II se fixe également au niveau des AT1R exprimés au niveau des cellules de la zone glomérulée de la corti-surrénale et induit la sécrétion d'aldostérone impliquée dans la rétention hydro-sodée et l'augmentation de la volémie via son action au niveau des récepteurs aux minéralocorticoïdes. L'aldostérone et l'Angiotensine II exercent également leurs effets via leurs récepteurs respectifs exprimés au niveau des cardiomyocytes en participant aux effets de remodelage ventriculaire. Ainsi, les IEC ont des actions multiples en permettant donc un

effet vasodilatateur, une diminution de la sécrétion d'aldostérone favorisant une réduction de la rétention hydro-sodée et une atténuation du remodelage ventriculaire (**Figure 12**).

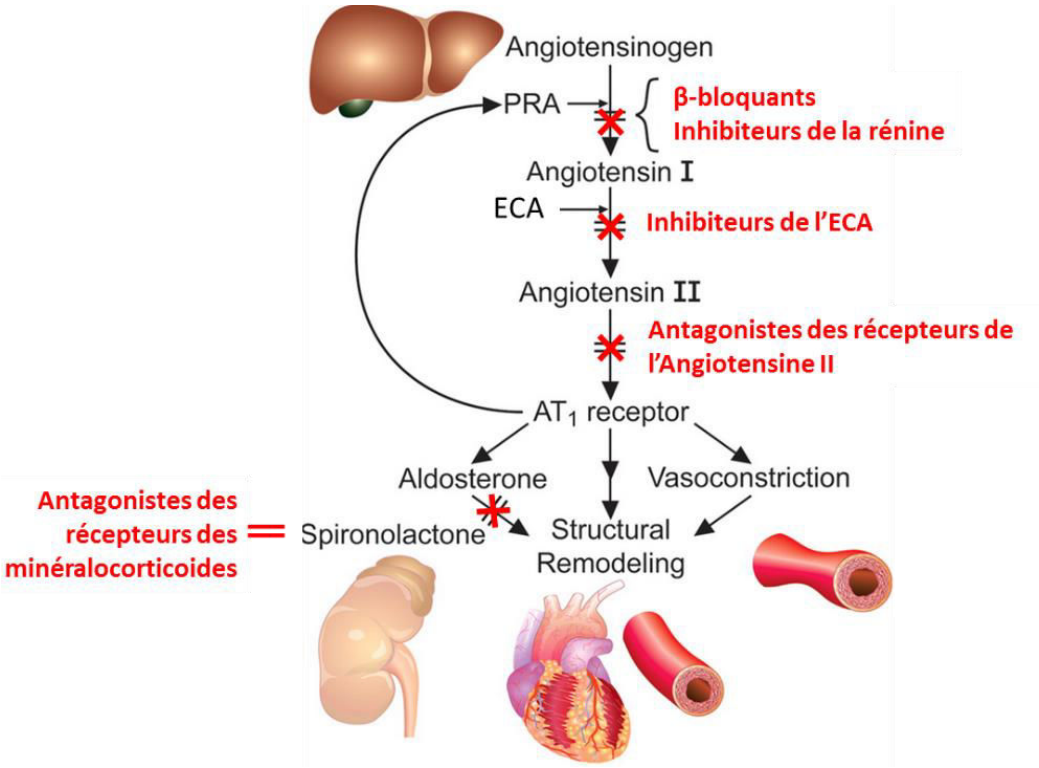


Figure 12 : Présentation du système rénine angiotensine aldostérone et l'action des différents agents pharmacologiques sur cette voie (Adaptée de[96]).
PRA=plasma renin activity ; ECA= enzyme convertizing Angiotensin II I ; AT1 receptor= Angiotensine II type 1 receptor.

Cette classe thérapeutique est recommandée à tous les stades d'IC. Les IEC ont montré leur efficacité dans la réduction de la mortalité, du nombre de ré-hospitalisation et une amélioration des symptômes de l'IC (études cliniques CONSENSUS (*Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study*) et SOLVD (*Studies of left ventricular dysfunction*) [97, 98]. Parmi les IEC, on retrouve principalement le Captopril, le Ramipril et l'Enalapril.

-**les diurétiques.** Ils sont généralement indiqués en présence de manifestations congestives d'IC tels que les œdèmes pulmonaires ou des membres inférieurs du fait qu'ils permettent de réduire la rétention hydro-sodée. Leur prescription est souvent associée à celle des IEC. Il

existe plusieurs types de diurétiques (**Figure 13**) selon leur lieu d'action au niveau du tube distal et collecteur du néphron, ainsi on distingue les **diurétiques de l'anse** (tel que le Furosémide), les **diurétiques thiazidiques** (tel que les Chlorothiazides) et les **diurétiques épargnant le potassium** (tel que la Spironolactone).

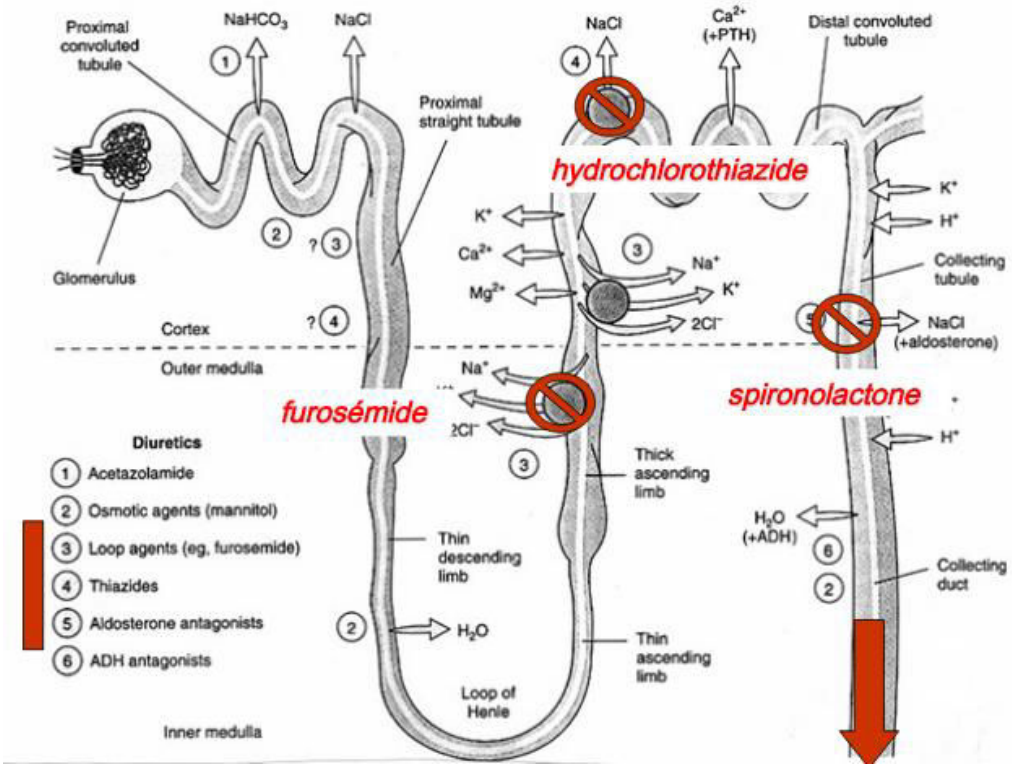


Figure 13 : Mode d'action des diurétiques [99].

Les diurétiques de l'Anse (Furosémide), leur action est rapide et intense en agissent au niveau de la branche ascendante de l'Anse de Henlé où ils bloquent le co-transport $Na^+/K^+/2Cl^-$. Ceci induit une augmentation de l'excrétion de Na^+, Cl^- et K^+, accompagnée d'une forte excrétion d'eau afin de maintenir l'équilibre osmotique. Leurs principaux effets secondaires sont une diminution importante de la volémie impliquant donc une hypotension et une hypokaliémie.

Les diurétiques thiazidiques quant à eux ont une action prolongée et bloquent le cotransport Na^+/Cl^- en agissant au niveau du tube contourné distal. Ainsi, une excrétion importante de

Na^+, de Cl^- et de K^+ est observée. Leurs effets secondaires majoritaires sont une hyponatrémie et une hypokaliémie.

Les diurétiques épargnant le potassium sont en revanche moins natriurétiques mais sont de puissants agents anti-kaliurétiques comme leur nom l'indique, en ce sens ils se distinguent majoritairement des deux précédentes classes de diurétiques. Ces diurétiques agissent au niveau du tube collecteur où ils inhibent les effets œdémateux de l'aldostérone impliquée dans la rétention hydro-sodée. On retrouve dans cette classe la Spironolactone et l'Eplérénone qui sont des antagonistes du récepteur de l'aldostérone (récepteur aux minéralocorticoïdes). Ces agents ne sont efficaces que si le niveau d'aldostérone est élevé (hyperaldostéronisme), leur délai d'action est prolongé mais leur effet diurétique est mineur comparé aux deux autres classes de diurétiques. Leurs effets secondaires possibles sont une hyperkaliémie et une gynécomastie, essentiellement sous Spironolactone.

-**les β-bloquants.** Cette classe thérapeutique en association avec les IEC et les diurétiques constitue le traitement conventionnel de base de l'IC. On retrouve dans cette classe principalement le Carvédiol, Aténolol et Bisoprolol.
Le mode d'action des β-bloquants s'appuie sur l'antagonisation des récepteurs β-adrénergiques du SNS dont l'activité est hyperstimulée lors de l'IC. Ils induisent des effets chronotropes négatifs en réduisant la fréquence cardiaque, inotropes négatifs en diminuant la force de contraction myocardique, lusitropes négatifs en atténuant la relaxation du cœur et dromotropes négatifs en réduisant la vitesse de conduction cardiaque. Les β-bloquants diminuent également la sécrétion de rénine par leur action au niveau de la *macula densa* de l'appareil juxtaglomérulaire rénal. De manière conjointe, ces actions des β-bloquants ont pour conséquence une réduction de la vasoconstriction périphérique ainsi qu'un ralentissement de la fréquence cardiaque. Leurs principaux effets secondaires possibles sont une hypotension artérielle et une bradycardie.

-**Les antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II (ARAII).** Ils sont souvent prescrits comme traitement alternatif en cas d'intolérance aux IEC. Ils présentent une efficacité

d'action comparable aux IEC montrée dans l'étude clinique ELITE II (*The Losartan Heart Failure Survival Study*) [100].

-**les antagonistes du récepteur aux minéralocorticoïdes (ARM)**. Ils sont recommandés dans l'IC avancée et sévère. Dans cette classe thérapeutique on retrouve essentiellement La Spironolactone et l'Eplérénone, cette dernière étant plus sélective du récepteur aux minéralocorticoïdes. Les essais cliniques RALES (*Randomized aldactone evaluation study*) [101] et EPHESUS (*Eplerenone Post-AMI Heart Failure Efficacy and Survival Study*) [102] ont permis de faire valoir à cette classe thérapeutique une recommandation de classe I dans le traitement de l'IC. Ils agissent en antagonisant le récepteur aux minéralocorticoïdes exprimés au niveau des cellules épithéliales rénales ainsi ils permettent de soulager la rétention hydro-sodée. D'autres études expérimentales [103-106] et cliniques [107-109] ont également permis de montrer que les ARM ont un effet local au niveau des cardiomyocytes et des cellules vasculaires coronaires en réduisant les effets pro-hypertrophiques et pro-fibrosants de l'aldostérone et qui contribuent au remodelage cardiaque.

Si les IEC, les diurétiques et les ARAII permettent de réduire de façon importante les effets de l'Angiotensine II et conséquemment de l'aldostérone, un phénomène possible d'échappement au traitement a été mis en évidence avec ces agents pharmacologiques amenant à long terme à une augmentation des taux d'aldostérone [110]. Ce phénomène peut finalement amener à des effets délétères adverses malgré la présence du traitement. Cet effet est prévenu par l'utilisation des ARM du fait qu'ils antagonisent directement le récepteur et empêchent ainsi les actions émanant d'une possible élévation des taux d'aldostérone.

D'autres traitements pharmacologiques sont aussi prescrits en association des traitements principaux de l'IC cités plus hauts pour soulager quelques-uns des symptômes de l'IC. La dissipation rapide de leurs effets, fait de ces traitements une utilisation secondaire et complémentaire uniquement, ils ne peuvent constituer un traitement de base de l'IC :

-les digitaliques

-les dérivés nitrés qui permettent un effet vasodilatateur veineux mais dont l'effet est rapide et s'épuisant en quelques jours. Ils sont dans ce contexte peu utilisés dans l'IC chronique.

-les inhibiteurs calciques. Ils bloquent l'entrée de Ca^{2+} dans les cellules musculaires et participe ainsi à la relaxation. Ces traitements ne sont pas recommandés dans l'ICS du fait du dysfonctionnement de contractilité cardiaque avéré lors de l'ICS. Ils sont plutôt préconisés lors de l'HTA et l'angor associé.

-les agents inotropes positifs

-les agents anticoagulants

-les anti-arythmiques

Si la prise en charge thérapeutique de l'IC est initiée seulement après l'installation du syndrome d'IC et permet dans la majorité des cas d'améliorer la qualité de vie et la survie des patients, ces traitements ne permettent pas d'éliminer la pathologie qui risque à tout moment de s'aggraver spontanément. À long terme, l'efficacité des traitements peut être mise en cause par l'apparition de pathologies liées au vieillissement sur lesquelles il est plus difficile d'agir. Dans ce contexte, agir en amont sur les facteurs de risque de l'IC pour prévenir ou ralentir la progression de la pathologie apparaît être une stratégie plus efficace. Cette démarche préventive est une des orientations actuelles de la prise en charge de l'IC visant à intervenir pharmacologiquement ou en modifiant le style de vie lors des stades I et II (ou A et B) de l'IC [111]. À ces stades précoces, les individus sont dits à risque, mais ne présentent encore aucune symptomatologie liée à une anomalie cardiaque. Le contrôle thérapeutique de l'HTA illustre la pertinence de cette stratégie, puisqu'aujourd'hui les patients bénéficiant d'une prise en charge efficace de leur HTA présentent un risque moindre d'évolution vers une IC. De même, la meilleure prise en charge des cardiomyopathies ischémiques (cause majeure d'évolution vers l'IC) tel que l'infarctus du

myocarde (IDM) ou l'angine de poitrine permet de réduire significativement les risques de survenue d'une IC.

Les pathologies non cardiaques telles que l'obésité, le DT2, la dyslipidémie et l'insulino-résistance, qui sont regroupées sous le terme de syndrome métabolique, sont des facteurs de risque de l'IC constituant des cibles thérapeutiques particulièrement intéressantes. En effet, ces pathologies connaissent aujourd'hui une progression alarmante qui laisse supposer la recrudescence dans l'avenir de problèmes cardiovasculaires associés à ces anomalies. Elles vont non seulement participer à la recrudescence des coronaropathies amenant à l'IDM puis à l'IC, mais vont également agir indépendamment de cette voie pour induire directement des cardiomyopathies elles aussi génératrices d'IC. Ainsi, agir sur ces facteurs de risques représente l'objectif principal de notre stratégie préventive de l'IC dans ce projet.

II. Le Syndrome métabolique : un facteur de risque important pour les maladies cardiovasculaires et l'insuffisance cardiaque

Nous avons mentionné que l'IC est une condition clinique dont l'étiologie est très variée et complexe. L'augmentation actuelle au niveau mondial de la prévalence des troubles métaboliques associés au syndrome métabolique (SMet) présage un fort accroissement du nombre de MCV et d'IC.

1. Définitions:

C'est en 1923 que le médecin suédois Kylin E. évoqua pour la première fois le concept de SMet en décrivant la coexistence de plusieurs symptômes incluant l'HTA, le diabète et l'hyperuricémie (taux élevés d'acides uriques ou la goutte). Il proposa alors qu'un mécanisme commun soit responsable de l'occurrence simultanée de ces trois affections. Par la suite plusieurs définitions du SMet se sont succédées en liaison avec les différents critères de diagnostic associés à chacun des composants du SMet. Ainsi, plusieurs définitions du SMet, résumées dans le Tableau 5, ont été proposées par différentes organisations scientifiques et médicales incluant : **l'OMS** (Organisation mondiale de la santé ou WHO (*World Health Organization*)) en 1999, **l'EGIR** (Groupe Européen d'Etude de la résistance à l'Insuline) en 2002, **La NCEP/ATPIII** (National Cholesterol Education Program/Adult Treatment Panel III) en 2001, et **L'AACE** (American Academy of Clinical Endocrinologist) en 2003 (**Tableau 5**). Afin de définir des critères diagnostiques communs qui seraient utilisables dans tous les pays et qui permettraient une identification rapide des personnes à risque, une définition a été proposée par la **Fédération internationale du diabète** (*International diabetes federation*, **IDF**) en 2005**.** Cette définition considère un tour de taille ≥ 94 cm pour les hommes de race eurasienne et ≥ 80 cm pour les femmes, auquel doivent s'ajouter deux des quatre paramètres suivants : des taux de triglycérides ≥ 1,5 g/l, HDL cholestérol < 0,4 g/l chez les hommes, < 0,5 g/l chez les femmes, une pression artérielle ≥ 130/85 mmHg et une glycémie à jeun ≥ 1,0 g/l [112] (**Tableau 5**). Cette définition de l'IDF est proche de celle de la NCEP/ATPIII.

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

[a]Insulin sensitivity measured under hyperinsulinemic euglycemic conditions, glucose uptake below lowest quartile for background population under investigation.
[b]In 2003, the American Diabetes Association (ADA) changed the criteria for IFG tolerance from >110 mg/dl to >100 mg/dl [10].
[c]Includes family history of type 2 diabetes mellitus, polycystic ovary syndrome, sedentary lifestyle, advancing age, and ethnic groups susceptible to type 2 diabetes mellitus.
BMI: body mass index; HDL-C: high density lipoprotein cholesterol; IFG: impaired fasting glucose; IGT: impaired glucose tolerance; Rx: receiving treatment; TGs: triglycerides; T2DM: type 2 diabetes mellitus; WC: waist circumference.

Tableau 5 : Critères de diagnostic du SMet selon les définitions proposés par différentes organisations scientifiques ou médicales [113]. WHO=World Health Organization (Organisation mondiale de la santé) ; EGIR=European group for the study of insulin resistance (Groupe Européen pour l'étude de la résistance à l'Insuline) ; ATPIII=National Cholesterol Education Program/Adult Treatment Panel III (Programme national d'éducation sur le Cholestérol/ Panel III du traitement chez l'adulte) ; AACE=American Academy of Clinical Endocrinologist (L'académie clinique Américaine des endocrinologistes) ; IDF=International Diabetes Federation (Fédération internationale du diabète).

Bien que dans ces quatre définitions les critères de définition du SMet pris en compte sont plus ou moins identiques, il faut noter que les définitions de l'OMS (ou WHO), de l'EGIR et de l'AACE s'appuient sur la présence obligatoire de l'insulino-résistance. La définition proposée par la NCEP/ATP III ne privilégie quant à elle aucun critère, et est plus orientée vers la recherche de complications cardiovasculaires. En ce sens, elle est plus pratique à appréhender, ce qui explique qu'elle ait été prise en compte dans la plupart des études cliniques menées dans le domaine.

S'il n'existe pas de consensus sur la définition exacte du SMet par les organisations scientifiques et médicales, le consensus vers lequel toutes ces définitions se rejoignent est que la présence du SMet est un facteur de risque majeur des MCV. Plusieurs études

épidémiologiques ont mis en évidence que le risque cardiovasculaire était proportionnel aux nombres de critères du SMet présents chez les patients.

2. Épidémiologie

La prévalence du SMet augmente globalement tant dans les pays pauvres que dans les pays développés. Les mauvaises habitudes alimentaires associées à la sédentarisation sont les causes les plus importantes de l'augmentation de la prévalence du SMet à travers le monde.

La prévalence actuelle du SMet dans le monde varie de moins de 10 % jusque 84% selon les régions du monde et les définitions du SMet utilisées [113]. L'augmentation de cette prévalence est d'ailleurs anticipée au cours des prochaines années compte tenu de la hausse projetée de la prévalence de facteurs de risques comme l'obésité [114] et aussi du fait du vieillissement général de la population dans certaines régions du monde.

3. Morbi-mortalité et risque cardiovasculaire lié au syndrome métabolique

Les études épidémiologiques ont montré que le SMet augmente le risque de développer des MCV mais également le risque de mortalité [112]. En effet, le SMet est associé à environ trois fois plus de risque de maladies cardiovasculaires, à 2,4 fois plus de risque de mortalité suite à des complications cardiovasculaires et à 1,6 fois plus de risque de mortalité de toutes causes [112]. Le SMet augmente de façon importante la prévalence de l'IC [115] (**Figure 14**).

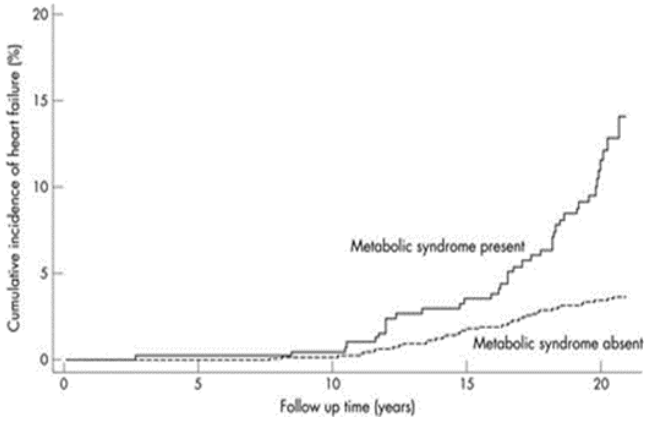


Figure 14: Incidence de l'IC en fonction de la présence ou non du SMet [116].

De façon intéressante, Azevedo *et al*. ont montré que le nombre de composants du SMet est proportionnel à l'altération de la structure et de la fonction cardiaques [117]. De plus, des données épidémiologiques récentes démontrent que la sévérité du SMet est proportionnelle à la prévalence de l'IC [118]. Alors que ces différentes études épidémiologiques mettent en évidence que la présence du SMet est un facteur aggravant de l'IC, l'étude de sa physiopathologie démontre comment les différentes composantes du SMet influencent le risque cardiovasculaire.

4. Physiopathologie du syndrome métabolique

Le SMet est le résultat de plusieurs anomalies qui peuvent être aussi bien d'origine génétiques qu'environnementales. La compréhension de la physiopathologie du SMet représente un préalable important pour l'identification des individus à risque de MCV et permettrait ainsi d'intervenir suffisamment tôt par des stratégies préventives. Bien que certaines études annoncent l'insulino-résistance et l'obésité comme étant à l'origine de la physiopathologie du SMet, ce syndrome à étiologie complexe et dont la définition n'a jusqu'à ce jour fait que très peu d'unanimité est difficilement expliqué par une anomalie particulière. Chaque critère du SMet contribue à l'émergence d'un autre jusqu'à former ce syndrome ayant pour résultat d'augmenter le risque cardiovasculaire.

De façon générale le SMet correspond à un état d'inflammation chronique qui est la conséquence d'une interaction complexe entre les différents composants du SMet: l'insulino-résistance, le DT2, la dyslipidémie, l'obésité et l'HTA.

L'insulino-résistance

Le rôle de l'insuline est de favoriser l'assimilation du glucose par les organes qui vont être impliqués dans son métabolisme tels que le muscle, le tissu adipeux (TA) et le foie principalement (**Figure 15**). Elle contribue ainsi à la normalisation de la glycémie dans l'organisme. L'insuline induit ses effets en se fixant à son **récepteur** (InsR). Ce dernier a une structure hétérotétramérique constituée de deux sous-unités α extracellulaires et deux autres sous-unités β intracellulaires dotées d'une activité tyrosine-kinase. La fixation de l'insuline à son récepteur entraîne l'autophosphorylation des sous-unités β et l'activation de

deux voies de signalisations principales : la **voie PI3K-Akt** et la **voie des MAPK**. L'activation par phosphorylation de la voie PI3K-Akt induit des **effets métaboliques de l'insuline**, où elle participe principalement à la translocation des transporteurs de glucose 4 (GLUT4) vers la membrane plasmique afin de permettre le passage du glucose dans la cellule. L'activation de la voie des MAPK quant à elle induit des **effets mitogéniques** en activant toute une cascade de voie de signalisation et impliquant des facteurs de transcriptions tels que **Ras**, **Raf**, **MEK**, **ERK**, **JNK** qui auront pour rôle la transcription de gènes impliqués dans la croissance cellulaire, la différenciation mais aussi des phénomènes d'inflammation et d'athérosclérose (**Figure 15**).

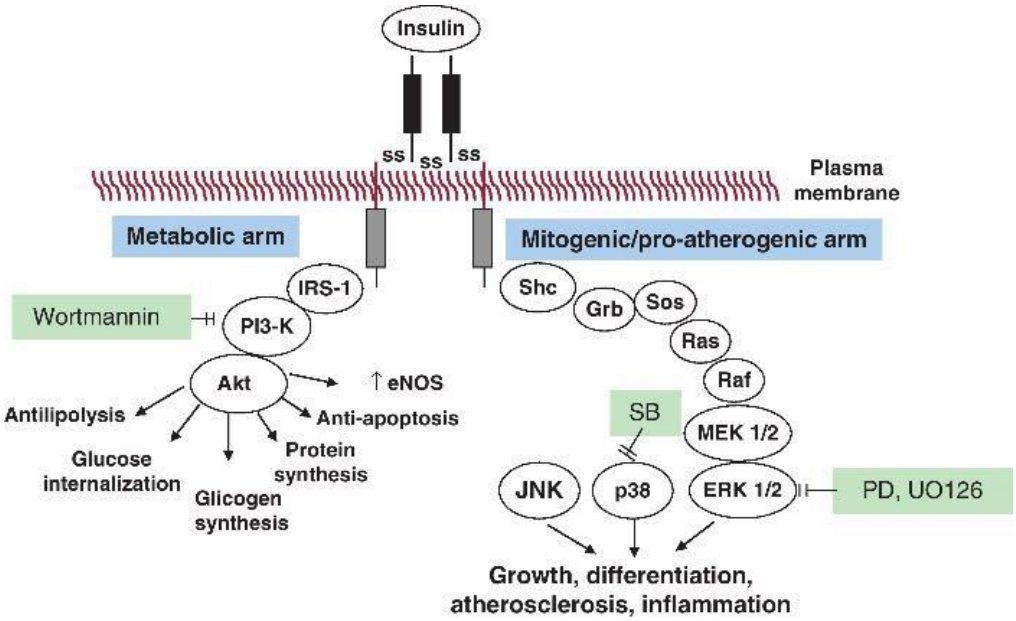


Figure 15: Signalisation intracellulaire de l'insuline [119]. eNOS=endothelial nitric oxide synthase; ERK=extracellular receptor kinase; IRS-1=insulin substrate receptor-1; JNK=c-Jun NH2-1 terminal kinase; MEK=mitogen-activated protein kinase/extracellular receptor kinase; p38= p38 mitogen-activated protein kinase; PD (PD98059) and UO126, extracellular receptor kinase 1/2 inhibitors; PI3-Kinase, phosphatidylinositol(PI)3-kinase; wortmannin, PI3-kinase inhibitor.

Lors de l'insulino-résistance s'opérant au cours du SMet, la voie de signalisation PI3K-Akt est inhibée alors que la voie des MAPK est intacte [120]. Ceci a pour conséquence une dérégulation de l'équilibre d'activation entre ces deux voies de signalisations induisant une diminution de la translocation de GLUT4 à la membrane et une diminution de l'entrée de glucose dans la cellule. L'expression de l'InsR dans des types cellulaires tel que le myocarde

et les cellules endothéliales implique que le phénomène d'insulino-résistance va également contribuer au dysfonctionnement de ces organes dans le contexte du SMet. En effet, il est décrit que l'IR est associée à une dysfonction endothéliale. Ainsi, chez des patients obèses et insulino-résistants, alors que l'insuline induit physiologiquement une vasodilatation par l'activation de la monoxyde d'azote synthase endothéliale (**eNOS**), l'altération de cette voie de signalisation induit une vasoconstriction chez ces individus [121]. Par ailleurs, dans le modèle de rat Zucker, un modèle de SMet, notre groupe a récemment montré que ces rats présentaient une dysfonction endothéliale et une rigidité artérielle se manifestant de manière accélérée avec le vieillissement du fait de leur insulino-résistance et de leur taux élevés d'AG libres [122].

Au niveau cardiomyocytaire, l'insulino-résistance induit une augmentation de l'oxydation du glucose et une diminution de celle des AG, un phénomène qui participe au basculement de l'utilisation de l'énergie au niveau cardiaque et qui contribue à la physiopathologie de l'IC. Une étude récente a permis de montrer que dans un modèle de souris présentant une déficience de l'InsR cardiaque, une fibrose myocardique est accompagnée d'une forte apoptose conduisant à une IC [123].

L'insulino-résistance est associée à d'autres composants du SMet puisque si en participant à la dysfonction endothéliale et à la rigidité artérielle, elle contribue à l'HTA, elle contribue également à l'obésité en altérant la lipolyse (**Figure 16**). En effet, l'insuline permet physiologiquement de contribuer à la différenciation adipocytaire et l'assimilation du glucose par les adipocytes. Il est montré que chez des souris présentant une déficience adipocytaire de **TORC2** (kinase impliquée dans la signalisation de l'insuline), une altération de la lipolyse est observée contribuant donc à l'installation d'une obésité et d'une dyslipidémie [124].

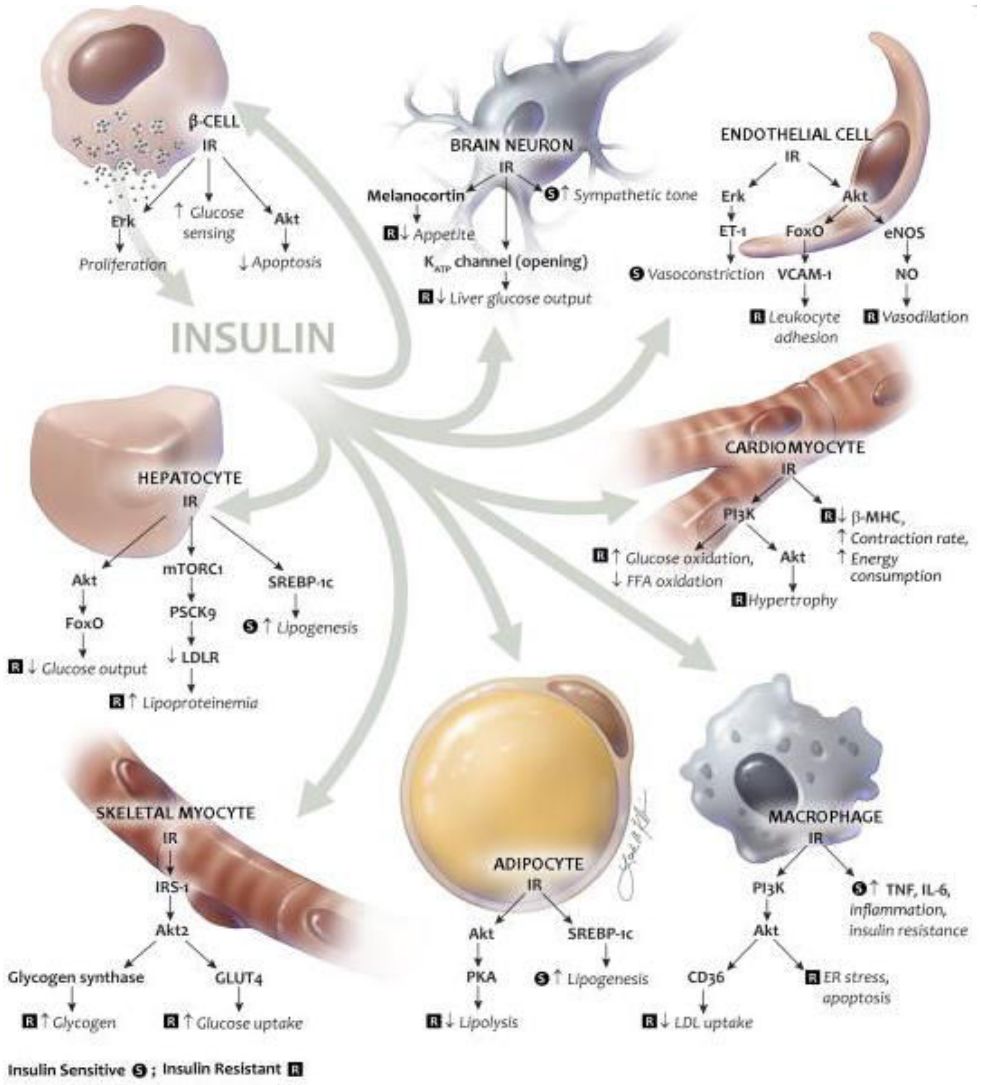


Figure 16: Mécanismes d'actions cellulaires principaux de l'insuline et leurs régulations lors de l'insulino-résistance [125]. IR=insulin receptor; LDLR=low density lipoprotein receptor; MHC=myosin heavy chain; mTORC1=mammalian target of rapamycin complex 1; PCSK9=proprotein convertase subtilisin/kexin type 9; PKA=protein kinase A; TNF=tumor necrosis factor-α.

L'obésité :

L'obésité est décrite comme un état d'inflammation chronique, où l'excès de TA observé est associé à des taux sériques augmentés de marqueurs pro-inflammatoires tels que la protéine C-réactive (**CRP**) et l'IL-6 dont les concentrations diminuent avec la perte de poids [126]. Cet état inflammatoire va contribuer aux complications observées lors du SMet mais également aux pathologies sous-jacentes telles que els MCV et leur forme d'évolution, l'IC.

Classiquement, le TA est considéré comme un organe de stockage d'énergie à long terme pour son utilisation par l'organisme. Ces dernières années, des preuves expérimentales se sont accumulées pour montrer que le TA contribue de façon importante à la sécrétion d'une série de facteurs en plus des AG, appelés **les adipokines**, qui auront d'importants effets systémiques, faisant de lui un véritable organe endocrine [127]. Parmi ces adipokines on retrouve **des hormones** telles que la leptine, visfatine, résistine, adipsine, apeline, omentine, adiponectine ; **des cytokines** tels que le TNFα, IL-6, MCP-1, PAI-1, IL-18, IL-10, CRP ; **des chémokines** tels que CCL2 (chémokine ligand 2), CCL5 (chémokine ligand 5) ;**des facteurs de croissance** : VEGF (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire), NGF (facteur de croissance nerveux) ; **des prostaglandines** telles que PGE2 ; **des corticoïdes** : glucocorticoïdes (cortisol), minéralocorticoïdes (aldostérone). Ainsi, le TA peut participer à beaucoup d'effets à distance sur différents organes cibles et contribuer à divers effets physiologiques. C'est également un organe assez hétérogène composé d'autres types cellulaires que les **adipocytes** qui sont majoritaires, il comprend en effet : des **pré-adipocytes**, des **fibroblastes** qui vont participer à la production de MEC, des cellules inflammatoires tels que des **macrophages** (majoritairement) et les **cellules T**, des **cellules endothéliales** et des **cellules musculaires lisse vasculaires** car le TA est un organe très vascularisé (**Figure 17**).

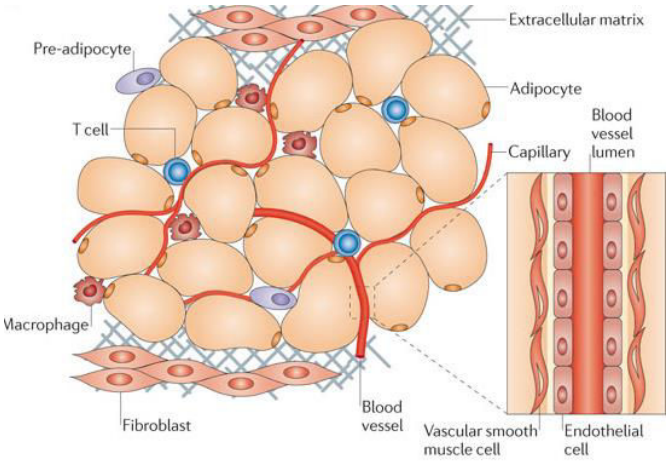


Figure 17: Composition du tissu adipeux [128].

Au cours de l'obésité, la composition du TA est modifiée et la sécrétion des différentes adipokines en est impactée. En effet il est décrit expérimentalement dans des modèles d'obésité mais également chez l'Homme que le TA obèse présente une infiltration importante par les macrophages et que ce phénomène participe non seulement à une inflammation systémique [129] mais aussi à l'insulino-résistance [130]. Cette accumulation de macrophages est proportionnelle à l'accumulation graisseuse et est diminuée par la perte de poids [131] (**Figure 18**). De plus, au cours de l'obésité une production massive de MEC est induite par les fibroblastes présents au sein du TA, afin de permettre dans un premier temps l'expansion du tissu, mais ce phénomène aussi décrit dans les travaux de Khan T. *et al*. montre qu'il contribue par la suite à la fibrose et au dysfonctionnement métabolique du TA [132].

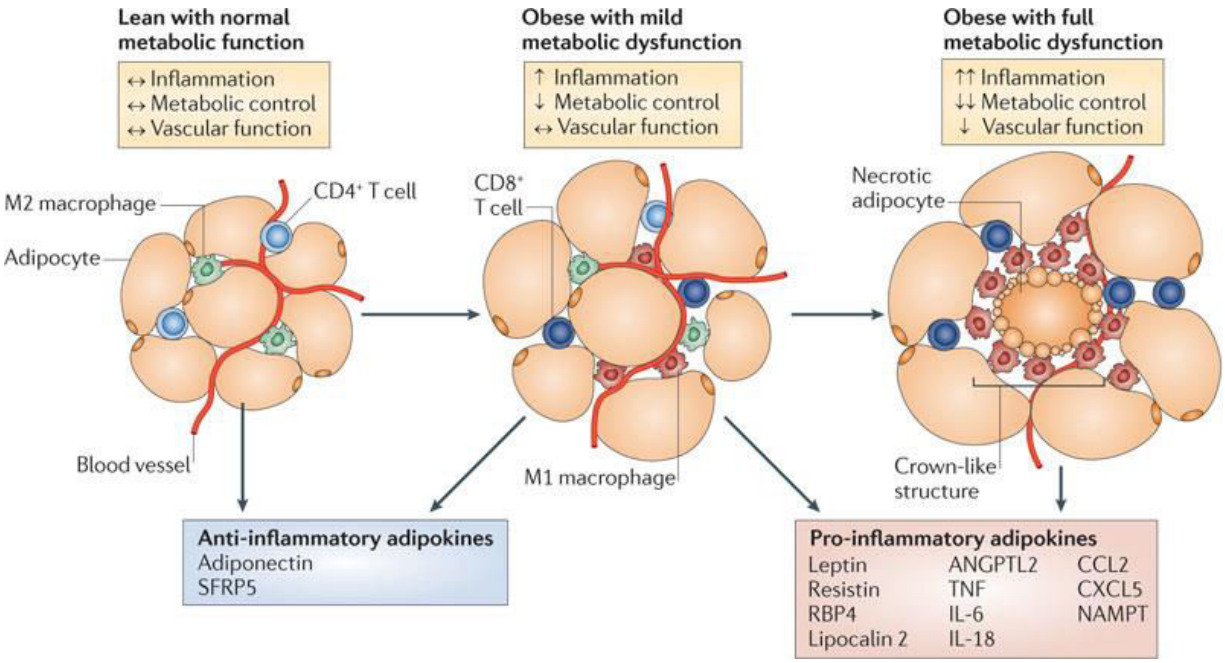


Figure 18: Modulation phénotypique du tissu adipeux au cours de l'obésité[128]. SFRP5=secreted frizzled-related protein 5 ; RBP4=retinol-binding protein 4;ANGPTL2=angiopoietin-like protein 2 ;TNF=tumour necrosis factor ;IL-6=interleukin-6 ; IL-18= interleukin-18 ; CCL2=CC-chemokine ligand 2; CXCL5= CXC-chemokine ligand 5; NAMPT=nicotinamide phosphoribosyltransferase.

La sécrétion anormale d'adipokines par le TA au cours de l'obésité participe de façon importante aux effets délétères sur le système cardiovasculaire. Ainsi, la leptine qui est la première adipokine caractérisée au niveau des adipocytes et qui est hypersecrétée au cours

de l'obésité (hyperleptinémie) est montrée induire des effets directs néfastes au niveau cardiaque en modulant la contractilité cardiaque [133] mais également en modulant le métabolisme [134] et la production de matrice extracellulaire par les cardiomyocytes [135, 136]. À côté de ces effets délétères, d'autres études expérimentales ont montré que la leptine est impliquée dans des effets bénéfiques particulièrement au cours de l'ischémie-reperfusion où elle permet de réduire la taille de l'infarctus [137] lors de post-conditionnement pharmacologique. Ces effets opposés de la leptine, sont aussi observés en clinique, où ils s'expriment notamment par le phénomène appelé « **paradoxe de l'obésité** » chez des individus ayant un indice de masse corporel élevé et qui présentent une moindre incidence de morbidité et mortalité face aux MCV [138, 139]. Par ailleurs, il est montré que l'adiponectine dont les sécrétions sont fortement diminuées au cours de l'obésité permet d'atténuer le remodelage cardiaque en limitant l'hypertrophie cardiaque dans des modèles expérimentaux [140, 141]. Par ailleurs, chez la souris, il est montré qu'après un IDM, l'injection d'adiponectine permet de protéger contre la dysfonction systolique [142]. Chez l'Homme, il a été montré que les taux d'adiponectine sont inversement corrélés au risque d'IDM [143].

Tout comme l'IC, le SMet est associé à l'activation de système neuro-humoraux incluant notamment le SRAA et le SNS. Plusieurs travaux expérimentaux et cliniques ont montré que le SMet est associé à des taux excessifs d'aldostérone participant à l'aggravation des composants du SMet mais aussi aux effets délétères du SMet sur le système cardiovasculaire [144]. Ainsi, l'hyperaldostéronisme associé au SMet, et commun dans la physiopathologie de l'IC, semble jouer un rôle important dans la survenue de l'IC. Il pourrait dès lors être une cible thérapeutique intéressante pour contrôler les facteurs de risques de l'IC se manifestant dans le SMet.

III. L'aldostérone et le récepteur des minéralocorticoïdes: des acteurs importants dans la physiopathologie de l'insuffisance cardiaque et du syndrome métabolique

1. Physiologie du système rénine-angiotensine-aldostérone

Physiologiquement, le système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA) rénal participe au maintien de la PA à moyen et long terme dans l'organisme. À côté de ce rôle majeur mis en évidence dès 1898 [145], le SRAA est également impliqué dans d'autres fonctions et ses constituants sont exprimés localement au niveau de plusieurs organes (cœur, vaisseaux, cerveau, tractus digestif, TA) [146-149].

Suite à une baisse de la PA systémique comme celle observée lors de l'IC, les stimuli d'hypoperfusion rénale ainsi que la stimulation du SNS rénal vont induire la sécrétion de rénine par la *macula densa* de l'appareil juxta-glomérulaire. La **rénine** ainsi libérée dans la circulation sanguine clive **l'angiotensinogène (AGT)** majoritairement produit par le foie en **angiotensine I (Ang I)**. Ce décapeptide subit ensuite l'action de **l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA)** pour produire **l'angiotensine II (Ang II)**, un octapeptide biologiquement actif. L'Ang II exerce ces effets en se liant à des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) que sont les récepteurs à **l'angiotensine de type 1 (AT1R)** et les récepteurs de **l'angiotensine de type 2 (AT2R)**. L'activation des AT1R majoritairement localisés au niveau des cellules musculaires lisses de la paroi artérielle induit une augmentation du calcium intracellulaire, une vasoconstriction et contribue ainsi à l'augmentation de la PA (**Figure 19**).

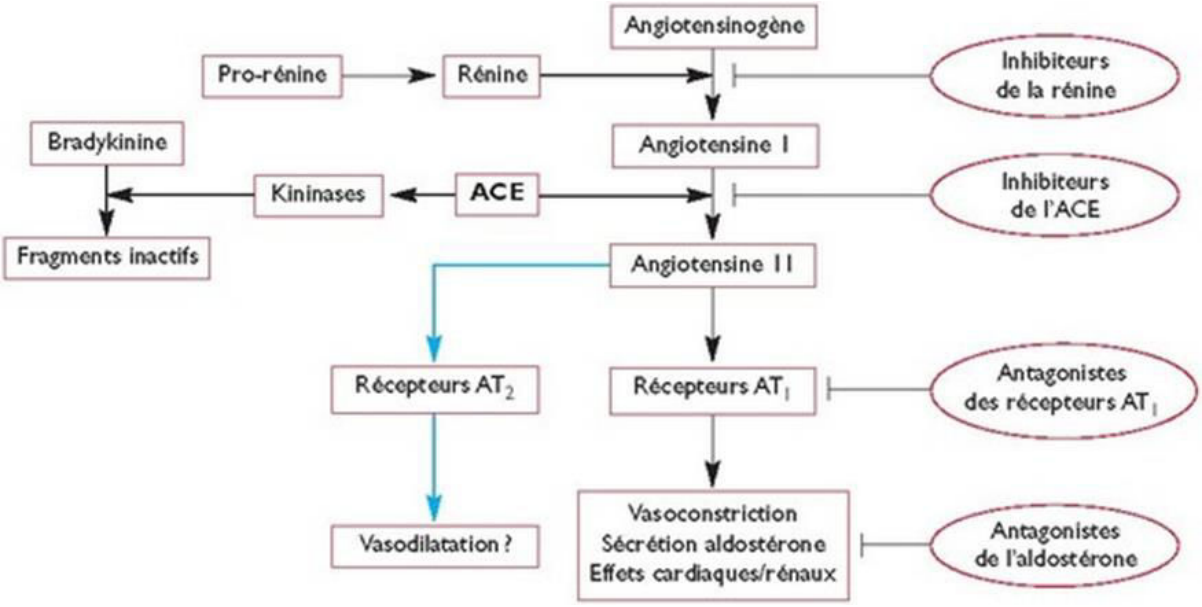


Figure 19 : Le Système Rénine-Angiotensine-Aldostérone. ACE=enzyme de conversion de l'angiotensine II, AT1= récepteurs de type 1 de l'angiotensine II, AT2=récepteurs de type 2 de l'angiotensine II.

La fixation de l'Ang II au niveau des AT1R exprimés au niveau des cellules de la zone glomérulée de la cortico-surrénale induit la stimulation de la sécrétion **d'aldostérone (Aldo)**, une hormone minéralocorticoïdes qui participe également à la régulation de la PA via la balance hydro-sodée et la volémie [150]. En effet, La liaison de l'Ang II à l'AT1R au niveau de la surrénale provoque l'activation de la voie de la voie de la phospholipase C (**PLC**) à l'origine d'une libération d'inositol triphosphate (**IP_3**) intracellulaire et d'une mobilisation de Ca^{2+} intracellulaire. Ce dernier est un facteur important dans les mécanismes contribuant à la biosynthèse d'Aldo par sa capacité à activer la calmoduline (**CaM**). L'activation de la CaM stimule la protéine kinases Ca^{2+}-calmoduline dépendante (**CaMK**) qui induit ensuite la phosphorylation de **CREB** (protéine se fixant aux éléments de réponse à l'AMPc). Ce dernier est un facteur de transcription qui a pour rôle de se fixer au niveau de promoteurs de gènes cibles de l'Ang II. Ici, la liaison de CREB au niveau du promoteur du gène de l'Aldo synthase (**AS**) induit l'expression de cette enzyme qui permet les dernières étapes de biosynthèse de l'Aldo (**Figure 20**). L'Aldo ainsi produite et sécrétée par la zone glomérulée de la cortico-surrénale agit au niveau des cellules épithéliales du tube collecteur rénal qui expriment son récepteur spécifique : **le récepteur aux minéralocorticoïdes (RM)**. Ce dernier est un récepteur nucléaire agissant comme facteur de transcription qui une fois lié par l'Aldo au

niveau du cytosol devient actif, entre dans le noyau cellulaire et induit la transcription de gènes cibles de l'hormone (**Figure 20**).

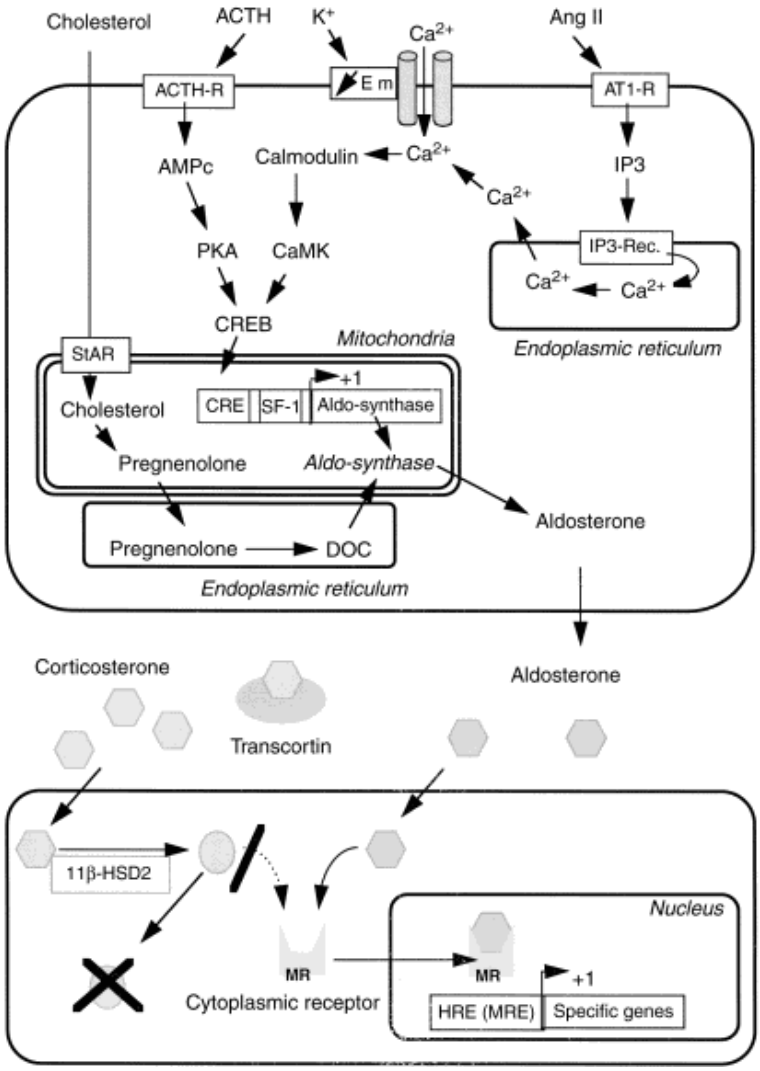


Figure 20 : Mécanismes intervenant dans la production et action de l'aldostérone au niveau rénal [151]. ACTH=hormone adrénocorticotropique ; DOC=déoxycorticostérone ; SF-1=Facteur stéroidogénique 1; PLC=phospholipase C; PKC=protéine kinase C; PKA=protéine kinase A; PIP=phosphatidylinositol diphosphate; IP3=inositol triphosphate; CaMK=Kinase calmoduline; StAR=régulateur stéroidogénique ; MR=récepteur aux minéralocorticoïdes.

Ce mécanisme est caractéristique des effets dit «**génomiques**» de l'Aldo car il fait intervenir la transcription de gènes via le RM et se distingue des effets «**non génomiques**» de l'hormone ne faisant pas intervenir le RM. Les effets génomiques et non génomiques de l'Aldo seront présentés dans une section ultérieure de ce chapitre. Les gènes cibles de l'Aldo

impliqués dans la régulation de la balance hydro-sodée, incluent particulièrement la pompe Na^+/K^+ ATPase, le transporteur sodique épithélial (**ENaC**) et le canal à potassium de la *medulla* externe (**ROMK**). L'expression de la pompe Na^+/K^+ ATPase ainsi que celle de ENaC participent ainsi à la réabsorption de sodium Na^+ s'accompagnant d'une entrée d'eau pour conserver l'équilibre osmotique au niveau cellulaire et une excrétion urinaire de potassium K^+ par ROMK et la pompe Na^+/K^+ ATPase. Cette réabsorption hydro-sodée contribue alors à l'augmentation de la volémie et à la régulation de la PA (**Figure 21**).

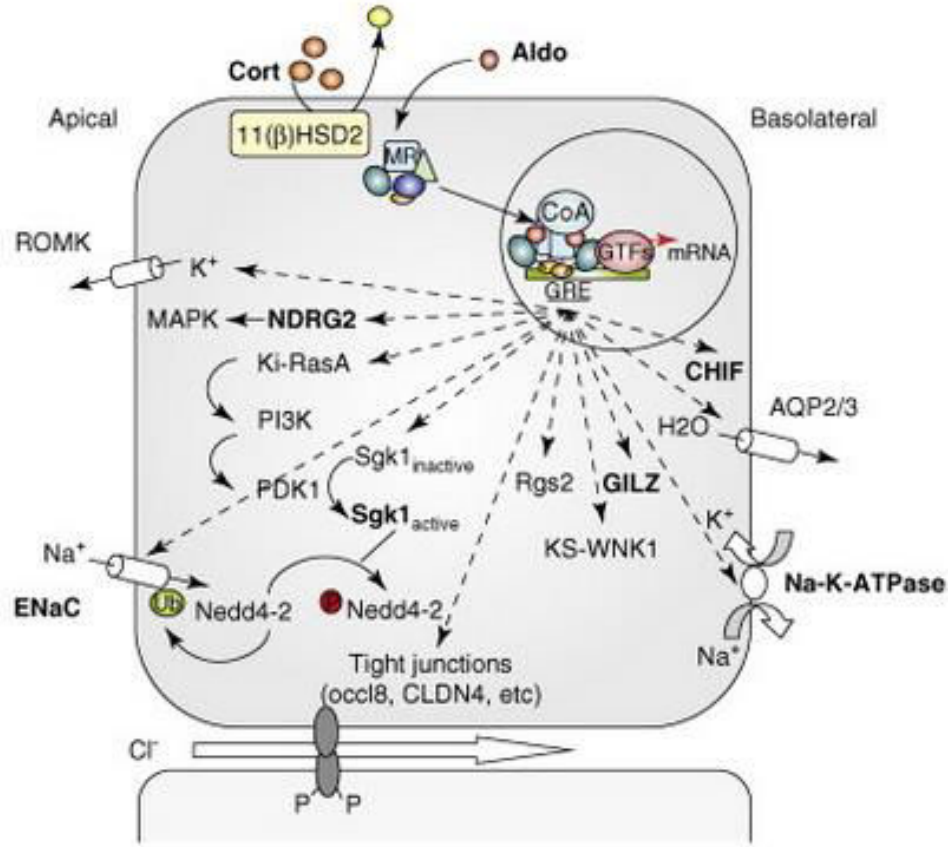


Figure 21 : Mécanismes intervenant dans la régulation de l'équilibre hydro-sodé au niveau rénal [152]. ENaC=transporteur épithélial de sodium

Alors que le rôle principal de l'Aldo est le maintien de l'homéostasie hydro-sodée dans l'organisme, et de ce fait le maintien de la PA, des observations expérimentales et cliniques ont révélé un rôle extra-rénal important de l'hormone et du RM, notamment dans la physiopathologie des MCV et des maladies métaboliques.

2. L'aldostérone et le récepteur des minéralocorticoïdes dans la physiopathologie des maladies cardiovasculaires, de l'insuffisance cardiaque et du syndrome métabolique

a. Généralités sur le récepteur des minéralocorticoïdes

Structure génomique

Le RM appartient à la famille des récepteurs nucléaires et est codé par le gène ***NR3C2***. Chez l'Homme, ce gène a été cloné pour la première fois en 1987 par Arriza JL *et al.* [153], et sa localisation chromosomique a été identifiée en 1989 au niveau des cytobandes q31.1-q31.2 du chromosome 4 [154]. Le gène du RM humain s'étend sur près de 450 kilobases, et est constitué de dix exons (**Figure 22**). Parmi eux, huit codent pour la structure protéique complète du RM comprenant 984 acides-aminés, alors que les deux autres exons correspondent à des exons 5' non codants. Les travaux de Zennaro MC. *et al.* en 1995 ont permis d'identifier deux variants transcriptionnels du RM humain dont la partie 5' terminale est différente, hRM1α et hRM1β. Ceci a permis aux auteurs de suggérer la mise en place d'un épissage alternatif au sein de l'exon N°1 contrôlé par deux promoteurs différents mais donnant naissance à une séquence protéique similaire [155]. Par la suite, un nouveau variant transcriptionnel du RM a été identifié par la même équipe, hRM5,6δ, codant pour une protéine tronquée de 75kDa [156].

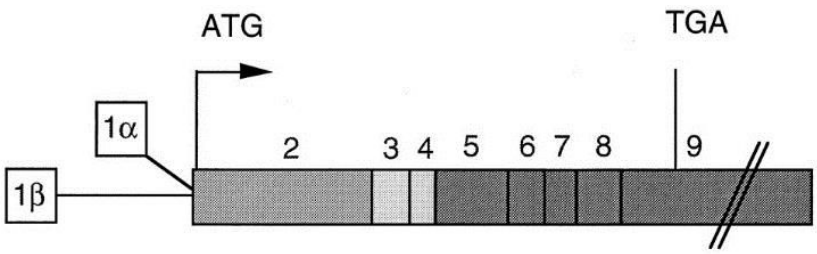


Figure 22 : Structure génomique du RM humain [155]. ATG= codon d'initiation de la traduction ; TGA= codon-stop de fin de traduction ; les chiffres représentent les différents exons du gène du RM.

Chez le rat et la souris, le gène *NR3C2* est localisé au niveau de la cytobande q12 du chromosome 19, présente 10 exons comme chez l'Homme, et code pour trois variants transcriptionnels du RM : hRM1α, hRM1β et hRM1γ [157].

Structure protéique

La structure du RM est constituée de 4 régions distinctes incluant un **domaine amino-terminal de transactivation (NTD)** liant des co-facteurs (co-activateurs ou co-represseurs), suivi d'un **domaine central de liaison à l'ADN (DBD)**, puis d'un domaine constituant la **séquence de localisation nucléaire,** et enfin, d'un **domaine C-terminal de liaison au ligand (LBD)** (**Figure 23**).

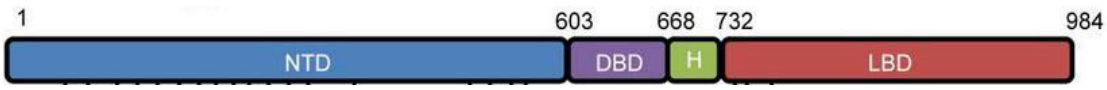


Figure 23 : Les différents domaines présents dans la structure du récepteur aux minéralocorticoïdes (Adapté de [158]). ER=estrogen receptor ;α, β= isoforms of ER ; GR= glucocorticoid receptor ; PR= progesteron receptor ; AR= androgen receptor ; RM= mineralocorticoid receptor ; NTD = N-terminal domain, DBD = DNA binding domain. LBD = ligand binding domain AF1=transcription activation function-1, AF2= transcription activation function-2.

Fonction biologique

Initialement, le RM est présent au niveau du cytosol où il est lié à des protéines chaperonnes appelées protéines de choc thermiques (*heat shock proteins*, **HSP**), et plus particulièrement les HSP90 et HSP70 (respectivement de 90 et 70 kDa), qui le maintiennent dans une conformation lui permettant d'avoir une forte affinité pour son ligand. D'autres protéines sont également liées au RM dans le cytoplasme telles que les protéines de liaison au FK506 (FKBP51 et FKBP52) ou les cyclophilines. La liaison du RM avec l'aldostérone ou le cortisol induit une libération des HSP et des autres protéines liées au récepteur. Le couple RM-Aldo entre ensuite dans le noyau pour induire des effets génomiques correspondant, soit à la transcription, soit à la répression d'expression de gènes cibles, selon que, respectivement, le

RM est lié avec des co-activateurs ou des co-répresseurs de la transcription (**Figure 24**). Il existe plusieurs co-activateurs et co-répresseurs du RM qui sont présentés dans le **Tableau 6**.

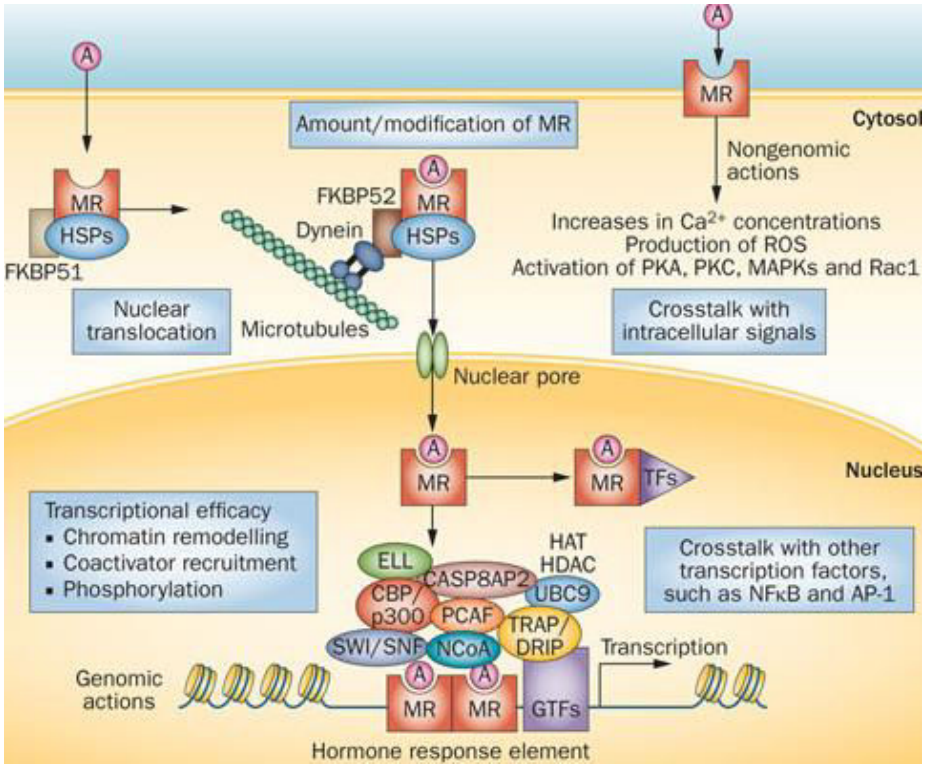


Figure 24 : Mécanisme d'activation du RM au niveau cellulaire [159]. A=aldostérone; CASP8AP= protéine 2 associée à la caspase 8 ; CBP/p300=protéine de liaison aux élément de réponse de l'adénosine monophosphate cyclique/p300 ; ELL=facteur d'élongation de l'ARN polymérase II ; FKBP=protéine de liaison au FK506 ; GTFs=facteur de transcription général; HAT=histone acétyltransférase ; HDAC=histone déacetylase; HSPs=protéine de choc thermique ; MR=récepteur des minéralocorticoïdes ; NCoA=coactivateurs des récepteurs nucléaires ; PCAF=facteur associé au P300/CBP; ROS=espèce réactive de l'oxygène ; SWI/SNF=switch/sucrose nonfermentable; TFs=facteur de transcription ; TRAP/DRIP, protéines/protéines interagissant avec le récepteur de la vitamine D associées au récepteur de l'hormone thyroïdienne; UBC9, SUMO-conjugating enzyme UBC9.

Les types de co-régulateurs (co-activateurs ou co-répresseurs) recrutés au niveau de la région de transactivation du RM sont déterminés par la nature du ligand se liant au récepteur [160]. Le RM est capable de lier l'Aldo mais aussi le cortisol. Au niveau cellulaire le RM est majoritairement occupé par les glucocorticoïdes tels que le cortisol dont le récepteur naturel est le **récepteur aux glucocorticoïdes** (RG). En effet les concentrations circulantes de cortisol sont 1000 fois plus importantes que celle de l'Aldo impliquant une occupation

majoritaire du RM par le cortisol. L'expression d'une enzyme appelée **11β2-hydroxysteroide déshydrogénase** (11β-HSD2) permet de réguler ce phénomène au niveau cellulaire car cette dernière est capable de convertir le cortisol en cortisone qui n'est alors plus capable de lier le RM (**Figure 18**). L'expression de la 11β-HSD2 est tissu spécifique, impliquant que, dans les tissus ne l'exprimant pas tel que les cardiomyocytes et les macrophages, le RM lie de façon majoritaire le cortisol [161].

Coregulator	Sites of interaction with the MR	Known functions	References
SRC-1	AF-2; AF-1 by SRC-1e isoform	Recruits histone acetylation complex to initiate transcription; weak intrinsic histone acetyltransferase activity.	(Hultman et al., 2005; Meijer et al., 2005; Wang et al., 2004; Zennaro et al., 2001)
SRC-2, TIF2, GRIP1	AF-1, AF-2	Enhances transactivation.	(Fuse et al., 2000; Hong et al., 1997; Wang et al., 2004)
p300/CBP	AF-1, AF-2	Exerts histone acetyltransferase activity; recruits RNA polymerase II to target gene promoter	(Fuse et al., 2000)
PGC-1α	AF-2	Recruits histone acetyltransferase complex; facilitates binding of NR to transcription initiation complex	(Hultman et al., 2005; Knutti et al., 2000)
RHA	AF-1a	Component of RNA polymerase II complex ; recruits CBP	(Kitagawa et al., 2002)
ELL	AF-1b	RNA polymerase II elongation factor; prevents premature arrest and transient pausing of polymerase II	(Pascual- Le Tallec et al., 2005)
FLASH	AF-1	Regulates cell apoptosis	(Obradovic et al., 2004)
FAF-1	AF-1	Regulates cell apoptosis	(Obradovic et al., 2004)
Ubc9	NTD	SUMO E2-conjugating enzyme; forms coactivation complex with SRC-1	(Yokota et al., 2007)
TIF1α	NTD	Transcriptional coactivator / corepressor	(Zennaro et al., 2001)
RIP140	NTD	NR coactivator	(Zennaro et al., 2001)
SMRT	LBD	Recruits histone deacetylase	(Wang et al., 2004)
NCoR	LBD	Recruits histone deacetylase	(Wang et al., 2004)
DAXX	NTD	Regulates cell apoptosis; represses MR transactivation in some cell lines	(Obradovic et al., 2004)
PIAS1	NTD ? LBD	SUMO E3 ligase; exact mechanism of repressive action unclear	(Pascual-Le Tallec et al., 2003)
NF-YC	AF-1	Inhibits aldosterone-induced MR N-C interaction	(Murai-Takeda et al., 2010)

AF, activation function; CBP, cAMP response element binding protein-binding protein; DAXX, death-associated protein; DBD, DNA-binding domain; ELL, eleven-nineteen lysine-rich leukemia; FLASH, Fas-associated death domain-like IL-1β-converting enzyme-associated huge; FAF-1, Fas-associated factor 1; GRIP1, glucocorticoid receptor-interacting protein 1; LBD, ligand binding domain; MR, Mineralocorticoid receptor; NCoR, nuclear receptor corepressor; NTD, N-terminal domain; PGC1, peroxisome proliferators activated receptor gamma coactivator 1; PIAS, protein inhibitor of activated signal transducer and activator of transcription; RHA, RNA helicase A; RIP140, receptor interacting protein 140; SMRT, silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptor; SRC-1, steroid receptor coactivator 1; SUMO-1, small ubiquitin-related modifier-1; TIF1α, transcriptional intermediary factor 1α; TIF2, transcriptional intermediary factor 2; Ubc9, Ubiquitin-like protein SUMO-1 conjugating enzyme

Tableau 6 : Les principaux co-activateurs et co-répresseurs du RM au niveau cellulaire [162].

Par ce mécanisme d'action, le RM induit des effets **génomiques** qui impliquent la transcription de gènes cibles de l'aldostérone, et qui génomiques sont mis en place tardivement, dans un délai de 30 min à 1h. Ces effets se distinguent de effets **non génomiques** qui n'impliquent aucune activité transcriptionnelle par le RM, et qui correspondent à des processus rapides et précoces observables en quelques secondes à quelques minutes [163]. Parmi les effets non génomiques de l'Aldo, on trouve par exemple l'activation du récepteur du facteur de croissance épidermique (**EGFR**). Ainsi, Grossmann C. *et al.* ont par exemple montré que la transfection de cellules rénales embryonnaires humaines avec le RM et son ligand l'Aldo induisait une phosphorylation des kinases ERK1/2 dépendant de l'EGFR, et que cet effet était réduit par l'ajout d'antagonistes du RM (Spironolactone) [164] (**Figure 25**).

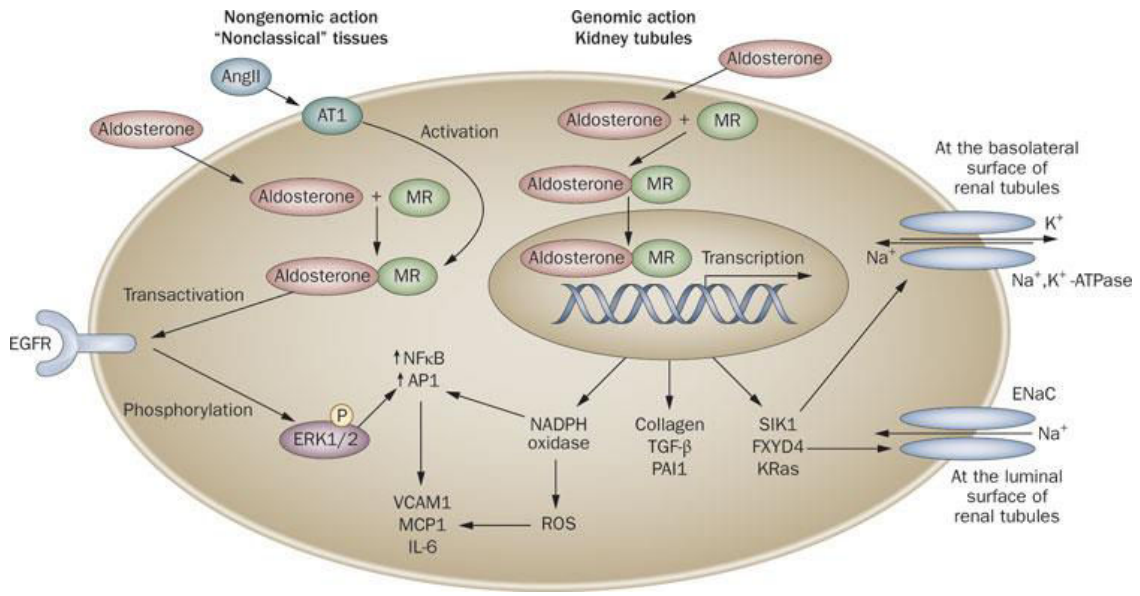


Figure 25 : Effets non génomiques et génomiques de l'aldostérone [163].
EGFR=récepteur du facteur de croissance épidermique ; ERK=kinases régulant la signalisation extracellulaire ; NFκB=facteur nucléaire κB ; Ang II=angiotensine II; AP1=facteur de transcription AP1 ; AT1=récepteur de type 1 de l'Angiotensine II ; ENaC=canal épithélial sodique ; FXYD4=domaine contenant le régulateur du transport d'ions; IL-6=interleukine 6 ; MCP1=protéine 1 chémoattractive des monocytes ; MR=récepteur des minéralocorticoïdes ; P=phosphate; PAI1=inhibiteur de l'activateur du plasminogène ; ROS=espèce réactive de l'oxygène ; SIK1=protéine sérine/thréonine kinase SIK1; TGF-β=facteur de croissance transformant β ; VCAM1=protéine d'adhésion vasculaire 1.

Si les effets de l'Aldo au niveau de la cellule épithéliale rénale a permis de mettre en évidence son rôle dans la régulation de la balance hydro-sodée et l'homéostasie de la PA, la

mise en évidence de l'expression du RM dans d'autres tissus non épithéliaux tels que le cœur, les vaisseaux et le TA a permis de montrer l'implication de l'Aldo dans des de nombreux autres mécanismes physiopathologiques incluant: la fibrose cardiaque, les arythmies, l'inflammation et le remodelage vasculaire, la dysfonction endothéliale, mais également la dysfonction du TA et son inflammation (**Figure 26**). Ainsi, l'Aldo participe de manière locale à des processus qui vont contribuer à la physiopathologie de l'IC et du SMet.

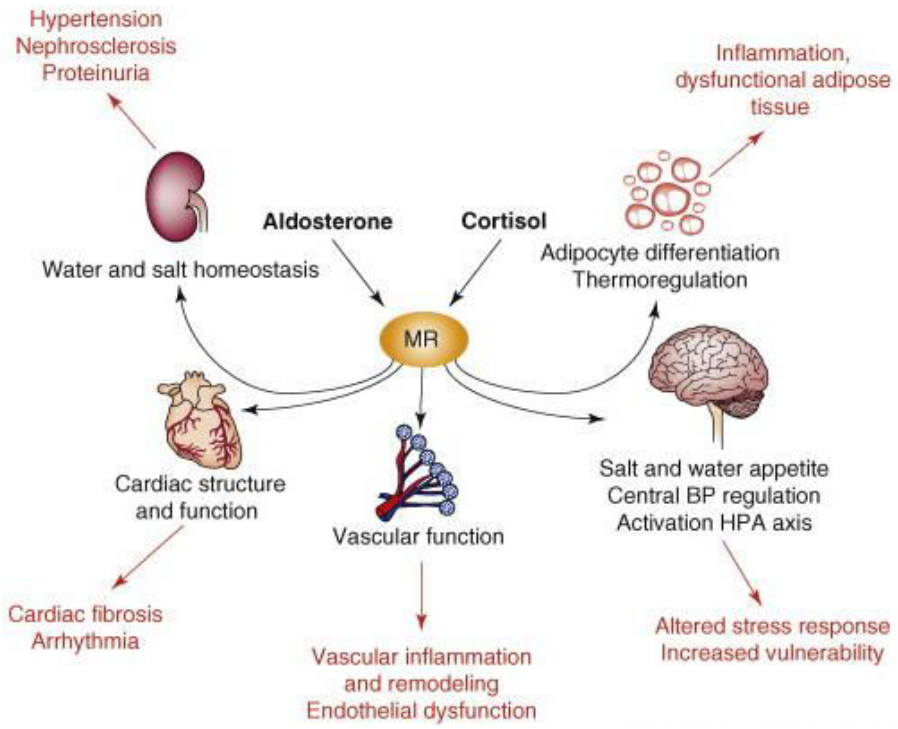


Figure 26 : Implication de l'aldostérone et du RM dans diverses fonctions dans l'organisme [152].

b. Rôle physiopathologique de l'aldostérone dans le système cardiovasculaire et son rôle dans l'insuffisance cardiaque

Les travaux expérimentaux de Brilla CG. *et al.* ont montré que l'incubation de cardiomyocytes de rats adultes avec de l'Aldo stimule la synthèse de collagène participant à

la fibrose myocardique et que ces effets sont atténués par l'ajout d'ARM (Spironolactone) [165]. Par ailleurs, Robert V. *et al.* ont aussi montré que le traitement de rats avec de l'Aldo et du sel induit une fibrose myocardique aussi bien au niveau du VG que du VD montrant une action pro-fibrosante directe de l'Aldo indépendante des effets hémodynamiques d'augmentation de la PA [166]. De plus, au niveau vasculaire, les travaux de Lacolley P. *et al.* ont également montré qu'un régime Aldo/sel administré chez des rats Sprague Dawley uninephrectomisés est capable d'induire une rigidité artérielle atténuée par l'utilisation d'ARM [167]. Ces observations permettent de mettre en évidence des effets directs de l'Aldo via le RM au niveau cardiaque et vasculaire.

Alors que l'Aldo semble induire ces effets pro-fibrosants en augmentant l'expression de molécules pro-inflammatoires tels que **MCP-1**, **PAI-1** [168] ou de remodelage de la MEC tel que **TGFβ**, **CTGF** [169], l'ostéopontine et la galectine-3 [23, 170-174], un stress oxydatif important est également mis en évidence comme facteur accélérant ces processus. En effet, il a été montré dans un modèle murin d'IC provoquée par la ligature de la coronaire [175], l'adjonction d'un traitement ARM (Spironolactone) a un ARAII chez ces rats permet d'obtenir un effet cardioprotecteur supplémentaire en diminuant davantage le stress oxydatif.

De la même façon, l'Aldo est montrée impliquée dans les arythmies cardiaques, un phénomène important conduisant à la mort subite dans l'IC [176]. En effet, les travaux d'Ouvrard-Pascaud A. *et al.* ont permis de montrer dans un modèle de souris surexprimant au niveau cardiaque le RM humain, une augmentation d'expression des canaux ioniques calciques induisant une prolongation de la durée de repolarisation ventriculaire et des arythmies cardiaques responsables d'une mortalité plus importante chez ces souris [177].

Les effets délétères que peut avoir l'Aldo sur le système cardiovasculaire ont également été mis en évidence chez l'Homme. En particulier, dans les études cliniques RALES (*Randomized Aldactone Evaluation Study*) et EPHESUS (*Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study*), dans lesquelles les auteurs ont montré que l'administration d'un ARM en complément de la thérapie standard de l'IC permet de réduire la mortalité des patients de façon importante [101], et que ces effets bénéfiques sont associés à une diminution de l'expression de protéines impliquées dans le renouvellement de la MEC [107, 178].

Au total, il apparait que l'Aldo et le RM sont des acteurs contribuant à la physiopathologie des MCV et conséquemment de l'IC en favorisant les phénomènes d'hypertrophie, de fibrose, d'inflammation et de remodelage cardiaque.

c. Rôle physiopathologique de l'aldostérone dans le syndrome métabolique

Le SMet et ces différents constituants sont associés à une activation de systèmes neuro-humoraux tels le SRAA et le SNS, et de nombreuses études expérimentales et cliniques ont montré qu'ils donnaient lieu à une augmentation de production d'Aldo et une activation excessive du RM.

Kidambi S *et al.* ont montré, dans une étude menée chez des patients sains et des patients présentant un SMet, que les taux plasmatiques d'Aldo chez ces derniers sont plus élevés [179]. Ces données indiquent que le SMet est associé à une activation du SRAA. Par ailleurs, il est montré que le TA chez des individus obèses produit des facteurs stimulant la sécrétion d'Aldo au niveau surrénalien [180], et qu'il est lui-même le siège d'une production et d'une sécrétion d'Aldo et de certains constituants du SRAA (AGT, Angiotensine II, rénine) [181]. Le mécanisme par lequel l'Aldo est produite au niveau des adipocytes est encore inconnu. Une étude récente indique un mécanisme dépendant de la calcineurine [181]. Hirata *et al.* ont mis en évidence que l'antagonisation du RM par l'Eplérénone dans un modèle de souris obèses (souris ob/ob et db/db) permet de prévenir l'insulino-résistance liée à l'obésité par la diminution de la production d'espèces réactives de l'oxygène au niveau du TA et de l'inflammation [182]. Par ailleurs, Caprio M. et Zennaro MC. ont montré l'implication importante du RM dans l'adipogenèse par sa capacité à stimuler l'expression de gènes pro-adipogéniques. Il a été rapporté que la présence d'ARM permet de ralentir l'adipogenèse dans des adipocytes en culture, et qu'elle permet également de moduler les processus inflammatoires initiés par les macrophages au sein du TA [183-185].

L'ensemble de ces données expérimentales démontre la présence excessive d'Aldo lors du SMet et son implication dans le développement et la progression de cette maladie. Compte tenu du rôle moteur important de l'hyperaldostéronisme dans les MCV et dans l'IC, il est donc évident que les effets délétères du SMet se répercutent sur le système cardiovasculaire et concourent à l'accélération de la progression vers l'IC.

Par quels mécanismes l'hyperaldostéronisme et l'hyperactivation du RM observés lors du SMet participent-ils précisément aux altérations fonctionnelles et structurelles cardiaques faisant progresser plus rapidement vers une IC ? Pour répondre à cette question, une analyse au niveau moléculaire par une approche « omique » des mécanismes sous-jacents à l'activation pathologique du RM, ou alternativement, à son antagonisation, peut apporter des réponses.

IV. L'apport des approches « omiques » dans la connaissance de la physiopathologie de l'insuffisance cardiaque et du syndrome métabolique

1. Généralités

Définition de l'approche « omique »

L'approche dite des « omiques » a émergé en parallèle du développement du projet de séquençage du génome humain dans les années 1990. Elle consiste à étudier de manière systématique et globale les différents niveaux de complexité des systèmes biologiques qui jusqu'alors étaient appréhendés de façon plus limitée. Cette approche s'appuie sur des technologies à très haut débit qui permettent l'analyse simultanée d'un très grand nombre de variables : les gènes (**génomique**), leurs produits de transcription et leur régulation (**transcriptomique**), les protéines (**protéomique**) et le métabolisme (**métabolomique**). Ces technologies fournissent un niveau d'information jusqu'alors inégalé, tant sur le plan qualitatif que quantitatif. L'intégration des niveaux d'information et leur exploration bioinformatique permettent d'appréhender la **biologie des systèmes** dans sa globalité en donnant accès aux mécanismes biologiques, aux interactions moléculaires, et à leur régulation à l'échelle de la cellule, des tissus et organes, voire même de l'organisme (**Figure 27**).

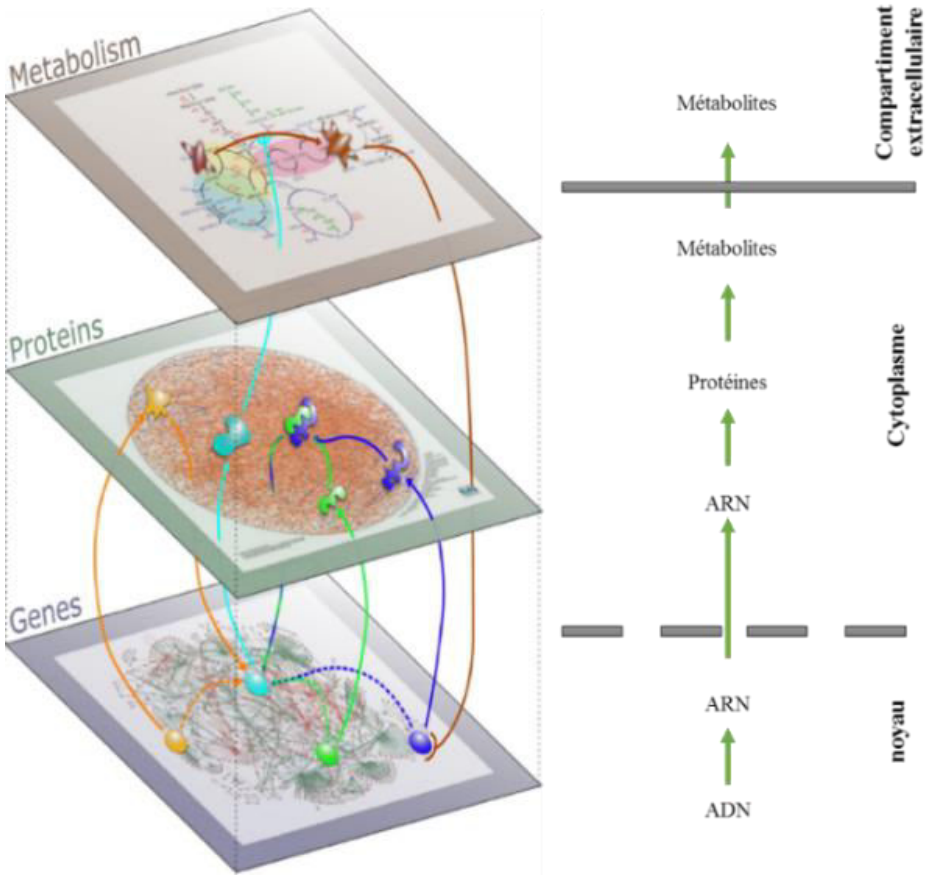


Figure 27 : La biologie des systèmes permet l'intégration des données obtenues à différents niveaux de complexité (adapté de Michaut *et al.* 2008).

Il est ainsi possible d'étudier les différents niveaux de complexité d'une pathologie et d'intégrer les données obtenues pour avoir une meilleure vue d'ensemble des mécanismes physiopathologiques qui sont en cause. Au cours de ces dernières années, les approches omiques ont ainsi permis des progrès considérables dans la compréhension de nombreuses maladies et dans leur prise en charge. En effet, elles fournissent des informations précieuses qui permettent d'améliorer leur diagnostic et de mieux stratifier leurs stades d'évolution sur des critères de causalité et non plus simplement symptomatologiques. Elles permettent ainsi de définir de nouvelles cibles thérapeutiques et d'évaluer l'efficacité des traitements. Il est désormais envisageable d'adapter la stratégie thérapeutique au profil de chaque patient. C'est l'objectif ambitieux que se propose d'attendre dans le futur proche la médecine personnalisée.

Dans le contexte particulier de l'IC et du SMet, les études basées sur les technologies omiques sont nombreuses. Elles ont essentiellement été focalisées sur l'analyse du transcriptome dans des systèmes modèles ou chez l'Homme, et leur apport dans la connaissance et la prise en charge de ces pathologies est tout à fait déterminant.

Le transcriptome et le miRNome

Le transcriptome est défini par l'ensemble des produits de transcription du génome (transcrits) présents dans une cellule à un temps donné. Il s'agit d'une image fixe de l'état du génome. Parmi les transcrits d'une cellule on distingue différents types appartenant à deux grandes familles **les ARNs codants** comprenant les ARN messagers (ARNm) et **les ARNs non codants** incluant toute une série d'ARNs : **les ARNs impliqués dans les processus de transcriptions** (ARN de transfert (ARNt), ARN ribosomaux (ARNr)), **les petits ARNs** (les ARN interférants (siARN), les microARNs (miARN), les ARN nucléolaires (snoARN), les ARN nucléaires (snARN)) **et les ARNs longs non-codants** (lncARN) (**Figure 28**) [186].

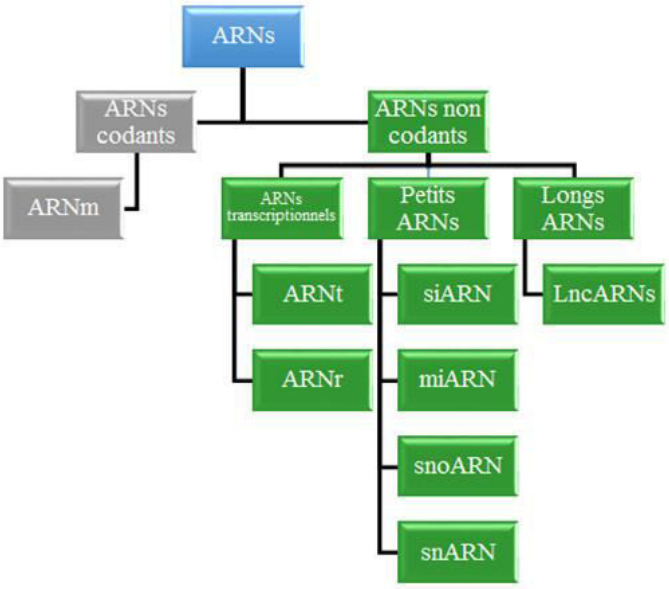


Figure 28 : Les différentes familles d'ARNs cellulaires. ARNm=ARN messager; ARNt=ARN de transfert; ARNr=ARN ribosomaux; siARN=small interfering ARN (ou ARN inteférent); miARN=microARN: snoARN=small nucleolar ARN (ou petit ARN nucléolaire); ARNsn=small nuclear RNA (ou petit ARN nucléaire).

Les classes d'ARN ciblés par les techniques d'analyse transcriptomique sont essentiellement les ARNm en tant qu'intermédiaires dans les processus d'expression des gènes conduisant à la synthèse des protéines. Par ailleurs, les miARNs constituent également des cibles d'intérêt en raison de leur rôle de régulateur de l'expression génique.

Les microARNs (miRs) ont été découvert pour la première fois chez Caenorhabditis elegans [187], il 'agit de petits ARNs simple brin non codants de 18 à 22 nucléotides, dont le rôle est d'inhiber l'expression protéique des gènes en s'appariant avec les ARNm cibles [188]. Si des progrès importants ont été réalisés depuis lors dans la connaissance de leur biogenèse et de leur mode d'action, ces derniers restent à ce jour incomplètement élucidés (**Figure 29**). Les miRs peuvent être exprimés à partir de régions codantes du génome, mais aussi à partir des régions non codantes ou de gènes polycistroniques [189]. Les miRs sont transcrits dans une première étape en pri-miARNs et subissent ensuite une étape de clivage pour donner naissance à des pré-miARNs grâce à l'action de l'endonucléase Drosha et son cofacteur DGCR8 (*Di-george syndrome critical region gene 8*). Via l'exportine 5, ils sont ensuite exporté dans le cytoplasme où l'endonucléase Dicer permet d'obtenir un duplex de miRs qui sera ensuite séparé en deux brins d'ARNs matures indépendants désignés par convention **miR-3p** et **miR-5p**. Un des deux brins est sélectionné préférentiellement et constitue la forme active principale qui agit sur l'expression des gènes cibles, alors que l'autre brin n'a qu'un rôle mineur. Le miR actif s'apparie ensuite à l'ARNm cible, conduisant soit à la répression traductionnelle de l'ARNm ou à sa dégradation. Il est important de préciser qu'un seul miARN peut cibler plus d'une centaine d'ARNm et qu'un seul ARNm peut être ciblé par plusieurs miRs. Par ailleurs, les profils d'expression des miRs et leur modalité d'action semble être étroitement liés à la nature du tissu ou de l'organe où ils opèrent. La régulation de l'expression génique par le **miRNome** est donc très complexe, mais est un phénomène global qui affecte environ 60% des gènes codants [190]. La base de données publique « miRBase » référençant l'ensemble des miRs connus, contient actuellement plus de 35828 miRs matures identifiés dans 223 espèces différentes [191]. On dénombre aujourd'hui chez l'Homme, 1881 séquences pré-miRs (précurseurs) et 2588 séquences miRs matures identifiées [191]. Chez le rat, espèce-modèle utilisée dans le présent projet, 495 pré-miRs et 765 miRs matures sont identifiés.

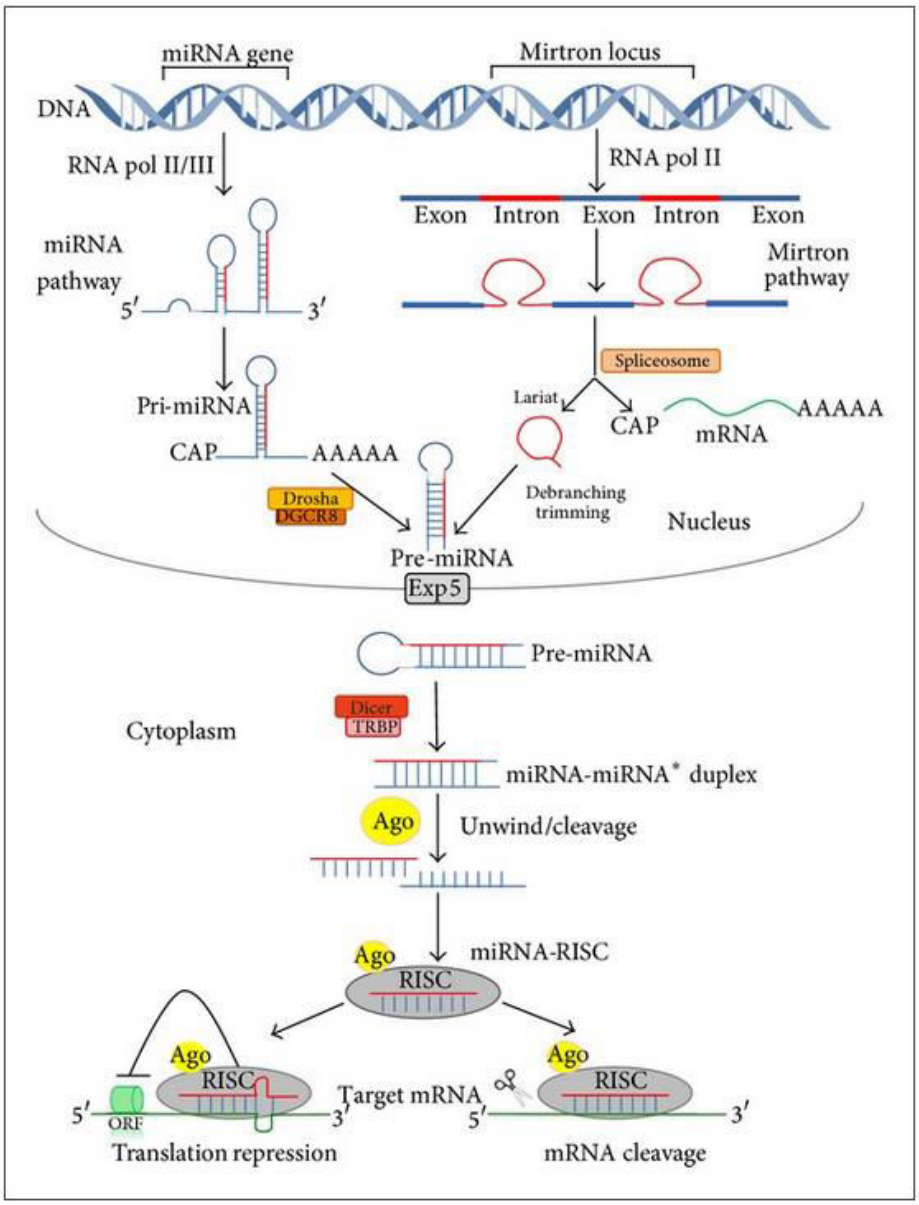


Figure 29 : Biogenèse des microARNs et leurs mécanismes d'action sur l'expression génique [192].

Technologies d'études du transcriptome et miRNome

Les technologies spécifiques pour l'étude à haut débit du transcriptome et du miRNome sont **les puces à ADN** ou *microarrays* et le **séquençage haut-débit**. Ces deux technologies permettent d'étudier de façon rapide l'ensemble du transcriptome et du miRNome.

La technologie des *microarrays* qui a été mise en œuvre dans le cadre du présent projet permet d'analyser l'expression de l'ensemble des gènes constituant le génome d'une espèce donnée (**Figure 25**). Cette technique est aujourd'hui parfaitement maîtrisée, et ses performances et limites sont bien connues [193]. Contrairement au séquençage haut débit, qui permet l'identification de séquences *de novo*, les *microarrays* n'autorisent pas la détection de transcrits non référencés, et leur sensibilité et leur rangée dynamique sont plus limitées. Cependant, pour l'étude du transcriptome, les *microarrays* montrent une efficacité comparable à celle du RNA-Seq réalisé avec une profondeur d'analyse classique (10-20 millions de *reads*) [194]. En outre, ils sont capables de détecter des transcrits très faiblement exprimés dans des conditions opératoires normales, alors que le séquençage nécessite, pour atteindre la même sensibilité, une profondeur d'analyse très importante (> 200 millions de *reads*). Enfin, la technique des *microarrays* présente l'avantage d'être une technologie peu gourmande en échantillon et peu coûteuse comparée au séquençage haut-débit, et les procédures associées pour l'analyse de données sont plus rapides et sont standardisées. Au total, cette technologie nous est apparue parfaitement adaptée aux objectifs et aux exigences du projet.

2. Étude du transcriptome pour la compréhension de la physiopathologie de l'insuffisance cardiaque et du syndrome métabolique

Les études transcriptomiques dans le domaine de la recherche cardiovasculaire sont nombreuses [195-197] et ont permis de mettre en évidence de nombreux gènes et mécanismes associés qui participent à la physiopathologie de l'IC. La plupart des gènes identifiés sont impliqués dans les mécanismes de remodelage cardiaque, notamment avec la surexpression de gènes codant pour des protéines sarcomériques, du cytosquelette et de la MEC [198]. D'autres gènes codant pour des protéines ribosomales sont également souvent trouvés en état de surexpression, témoignant de l'activation de la biosynthèse des protéines, un processus impliqués dans l'hypertrophie cardiaque [199]. De façon intéressante, une expression altérée de gènes impliqués dans le métabolisme énergétique cardiaque est fréquemment observée. Alors que la source principale d'énergie utilisée par le cœur est la transformation des AG par la β-oxydation mitochondriale [200], l'étude du transcriptome cardiaque de patients atteints d'IC montre une altération de l'expression de gènes engagés

dans la respiration mitochondriale et une surexpression des gènes associés à la glycolyse [201]. Ces résultats témoignent du phénomène de « *switch* » de substrat énergétique au niveau cardiaque, des AG vers le glucose observé lors des cardiomyopathies. Il faut noter que le contexte pathologique de l'IC modifie de façon importante le sens de régulation des gènes altérés lors des pathologies cardiaques. En effet, les cardiomyopathies naissant dans un contexte par exemple d'HTA, et celles apparaissant dans un contexte de SMet ou d'obésité, impliquent des mécanismes différents de régulation de l'expression génique [202, 203]. Dans un contexte d'obésité et de dyslipidémie, l'augmentation des AG libres au niveau sérique, implique une augmentation de leur transport au sein des cardiomyocytes et une surexpression des gènes liés au métabolisme des lipides. Ce phénomène n'est pas observé dans le cas de cardiomyopathies uniquement reliées à une HTA [204, 205].

Un intérêt s'est également porté à l'étude des profils d'expression des miRs dans la physiopathologie des maladies cardiaques [206]. Dans les maladies cardiovasculaires et l'insuffisance cardiaque, les miR-133, -1, et -21 ont été les premiers à être identifiés. De nombreuses études ont pu montrer l'implication majeure de ces miRs, notamment dans les arythmies cardiaques lors de l'IC [207], ainsi que dans l'hypertrophie myocardique [208]. Il a également été mis en évidence que les miRs -208a et -199 sont impliqués dans l'hypertrophie cardiaque, mais essentiellement dans les processus de reprogrammation fœtale visible dans l'IC [209, 210]. Par ailleurs, il a été montré que les perturbations du métabolisme énergétique cardiaque associé à l'IC sont sous le contrôle du couple miRs-378-3p et 378-5p [211].

Les approches omiques ont également été abordées pour l'étude de la physiopathologie du SMet. Cependant, aucune étude n'a analysée de manière simultanée l'ensemble des organes impliqués dans la physiopathologie du SMet, tels que le foie, le pancréas, le TA et les vaisseaux. Dans la littérature, la majorité des études expérimentales ont été focalisées sur le TA du fait de sa contribution importante dans la physiopathologie du SMet, mais également du fait qu'il exerce une multitude d'effets physiologiques par son rôle endocrine.
Les différents travaux expérimentaux et cliniques d'analyse du transcriptome adipeux dans un contexte d'obésité seule ou dans un contexte de SMet révèlent que la plupart des gènes dont l'expression est altérée sont impliqués dans des fonctions telles que l'inflammation, le

métabolisme des lipides et du glucose, l'adipogenèse et de la réorganisation du cytosquelette [212], des fonctions biologiques caractéristiques de la physiologie de ce tissu. Les profils d'expression génique du TA sont modifiés en parallèle de l'installation de l'obésité, indiquant que ce processus ne consiste pas en une simple augmentation de masse graisseuse, mais qu'il implique des modifications fonctionnelles et structurales profondes au niveau du TA. L'obésité est associée à une infiltration importante du TA par les macrophages [129], une observation qui a été rapportée aussi bien chez l'animal, dans les modèles génétiques d'obésité ou les modèles d'induction de l'obésité par un régime gras, que chez l'Homme. Les macrophages présents au niveau du TA sécrètent une série de cytokines inflammatoires telles que TNFa, IL-1, IL-6 qui d'une part contribue à l'inflammation du TA, mais aussi à l'insulino-résistance fréquemment associée à l'obésité [213]. À long terme, ces mécanismes concourent à l'altération de l'adipogenèse et à l'augmentation de la libération d'AG par le TA, mais aussi au remodelage de ce dernier qui s'accompagne d'une surexpression de gènes tels que les MMP (MMP1, MMP3, MMP9, MM10, MMP12, MMP19) [214]. Au cours de l'obésité, les adipocytes subissent une hypertrophie importante qui résulte d'un défaut de prolifération et de différenciation des préadipocytes et des cellules souches mésenchymateuses en adipocytes matures. Au cœur de ces processus, les facteurs de transcriptions PPARG et CEBPα jouent un rôle important en association avec le *Kruppel-like factor 4* (Klf4), de même que les facteurs de transcription Egr2 et Nur77 qui sont activés très tôt au cours de l'adipogenèse [215]. Dans le contexte du SMet, un certain nombre de miRs montrant des profils d'expression spécifiquement altérés a pu être identifié (**Tableau 7**). Parmi ces miRs, certains comme les miRs-27a, -143, -103/-107, -378/378*, -130 semblent jouer un rôle prépondérant dans l'adipogenèse et l'émergence de l'obésité.

miRNA	Target tissue(s)	Function
miR-103/107	Adipose, liver	Insulin/glucose homeostasis Adipogenesis
miR-122	Liver	Hepatic lipid metabolism
miR-124a	Pancreas	Pancreatic islet development
miR-143	Adipose Liver Pancreas	Adipocyte differentiation Insulin resistance
miR-223	Muscle	Glucose uptake, insulin resistance
miR-27a	Adipose	Adipogenesis
miR-29	Muscle, Adipose Liver	Glucose transport
miR-33a/b	Liver Macrophage	Cholesterol/lipid/energy homeostasis
miR-335	Pancreas Liver Adipose	Insulin production Fatty acid and TGA biosynthesis
miR-34a	Liver, Pancreas	Lipid metabolism, B-cell exocytosis
miR-375	Pancreas	insulin secretion, pancreatic islet development
miR-378/378*	Adipose	Adipocyte differentiation lipid synthesis
miR-9	Pancreas	Insulin secretion
miR-130	Adipose	Adipogenesis
let-7	Muscle Adipose	Insulin sensitivity

Tableau 7 : Principaux miRs impliqués dans la physiopathologie du SMet [216].

Les miRs sont initialement exprimés au niveau des tissus, mais peuvent être secrétés dans les fluides biologiques tels que le sang, les urines ou la salive où leur association avec des complexes protéiques ou leur incorporation dans des vésicules de transport permet de les protéger de l'activité des RNAses, les rendant ainsi particulièrement stables [217]. Dans la circulation sanguine plus particulièrement, les miRs circulent soit, pour une fraction mineure (10 à 20%), sous une forme encapsulée dans des microparticules [218] ou des exosomes [219], soit, pour la majorité des miRs (80 à 90%), en association avec des complexes protéiques, des lipides ou des HDL [220] (**Figure 30**). Il a été suggéré que les miRs circulants pourraient agir comme des facteurs paracrine [221] exerçant leur action à distance de leur site de production après un transport via la circulation sanguine, ou, au sein d'un même organe, par transfert entre cellules voisines.

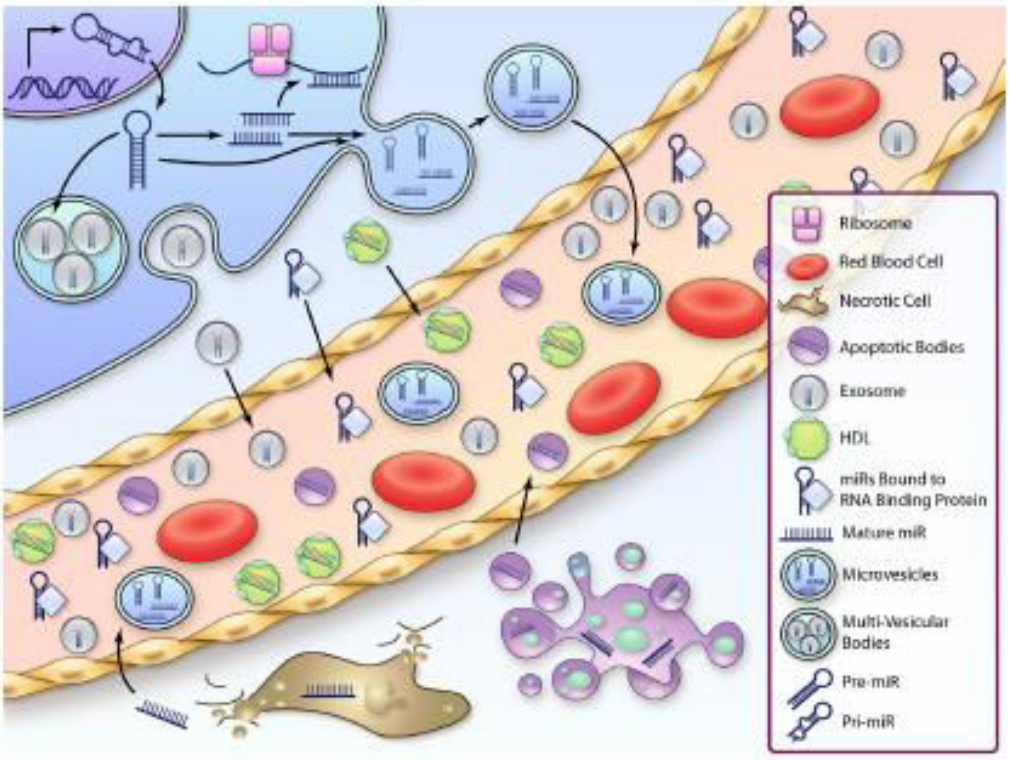


Figure 30 : Origines des miRs circulants présents dans le sang [222].

Les miRs circulants ont suscité un grand intérêt en tant que biomarqueurs car les altérations de leurs profils d'expression sont souvent étroitement associées à l'état physiopathologique. En outre, leur grande stabilité naturelle, leur accessibilité aisée de manière non invasive (contrairement aux biopsies) et l'existence de technologies simples et sensibles permettant leur détection (qPCR), en font des candidats biomarqueurs tout à fait attrayants. Dans le contexte des MCV, de l'IC et du Smet, un certains nombres de miRs circulants ont été proposés comme biomarqueurs potentiels :

-Dans l'insuffisance cardiaque : comme nous l'avons vu précédemment, cette condition correspond à l'évolution de toutes les maladies cardiaques. Dans une étude expérimentale récente réalisée chez le rat Dahl Salt-sensitive développant une IC, une augmentation des taux plasmatiques des miR-15a, -15b, -20a, -103, -130a, -130b, -195, -210, -301b, -451 et -494 a été caractérisée [223]. Chez l'Homme, au cours du stade final de l'IC, une augmentation de l'expression des miR-21, -129 et 212 a été mise en évidence. Il a été montré que ces miRs sont capables d'induire une hypertrophie et une réexpression du

programme génique fœtal lorsqu'ils sont transfectés dans des cardiomyocytes primaires de rats [224]. Dans l'IC terminale idiopathique, des analyses par *Northern blot* du myocarde de patients a révélé une augmentation de l'expression des miR-24 -125b, -195, -199a et -124 [225]. Par ailleurs, il est montré que chez des patients présentant une ICS, des taux élevés sériques des miR-423-5p, -320a, -22, et -92b sont retrouvés et sont corrélés à des paramètres de pronostic clinique tels que les taux de BNP, la dilatation du VG et de l'oreillette gauche [226]. Par ailleurs, il est montré que miR-126 est diminué chez les patients en IC comparés à des patients sains et que ces taux sont inversement corrélés aux concentrations plasmatiques de BNP [227] (**Tableau 8**).

Heart failure	
↑ Serum miR-423-5p	Chronic HF
↑ Plasma miR-499	HF
↑ Plasma miR-423-5p	DCM severity
↑ Plasma miR-210	HF; differentiate NYHA classes
↑ Heart miR-21, -129, -212, -100, -195	HF; FGP
↑ LVB miR-21, -133a	AS
↑ LVB miR-214	DCM; AS
↓ LVB miR-19	DCM; AS
↓ EMB miR-122	AS with SF
↓ EOCs miR-126, -130a	DCM; ICM
↓ PBMCs miR-107, -139, -142-5p	DCM; NIDCM

Tableau 8 : miRs d'intérêt récemment identifiés dans l'insuffisance cardiaque (Adapté de [192]). DCM=dilated cardiomyopathy; AS=Aortic stenosis; EMB=endomyocardial biopsy; EOCs=early outgrowth cells ; FGP=fetal gene program; HF=heart failure ; ICM= ischemic cardiomyopathy ; LV=left ventricle ; LVB=left ventricle biopsy; NYHA=New York heart association ; PBMCs=peripheral blood mononuclear cells ; SF severe fibrosis.

-Dans l'obésité et le SMet: Une étude récente menée chez des patients atteints d'un SMet (DT2, hypercholestérolémie et HTA) a permis d'identifier chez eux plusieurs miRs impliqués dans les différentes composantes du SMet. Ainsi, il a été montré que les miR-197, -23a et -509-5p sont corrélés avec la dyslipidémie chez ces patients. Les miR-130a and miR-195 sont

quant à eux reliés à l'HTA. Enfin, les miR-27a and miR-320a sont associés au DT2 [228]. Par ailleurs, des données expérimentales montrent que les miRs-103, -107 sont augmentés dans des modèles de souris obèses [229], révélant l'implication de ces miRs dans l'obésité. Chez des patients obèses, ce sont les miR-97, -23a, et -509-5p qui ont été trouvés en état de surexpression [230]. Enfin, une étude translationnelle récente portant sur l'expression des miRs plasmatiques dans divers modèles de murins d'obésité et chez l'homme a permis d'identifier le miR-130b comme biomarqueur reflétant le degré de sévérité de l'obésité, d'hypertriglycéridémie et de SMet [231].

Les données de la littérature indiquent que l'expression des miRs est modulée de manière spatio-temporelle, puisque leur expression varie selon les pathologies cardiaques, leur stade et leur évolution. De façon intéressante, la recherche bioinformatique des gènes-cibles de ces miRs répertoriés dans les MCV et l'IC montre qu'il s'agit essentiellement de gènes impliqués dans le développement [232]. Ainsi, les miRs représentent de puissants vecteurs des pathologies cardiaques, et par la même constituent des cibles thérapeutiques et des biomarqueurs potentiels de grand intérêt.

HYPOTHESE ET OBJECTIFS DE L'ETUDE

La littérature scientifique fournit de nombreuses preuves expérimentales et cliniques suggérant que la production excessive d'Aldo participe à la physiopathologie de l'IC, et que son rôle est exacerbé lorsque plusieurs facteurs de risque de l'IC s'expriment simultanément comme c'est le cas dans le SMet. Si le traitement des patients souffrant d'une IC déclarée a beaucoup bénéficié de l'utilisation d'ARM, les moyens de prévention du développement de l'IC chez des patients asymptomatiques ou à des stades précoces de la maladie restent encore insuffisamment développés ou efficaces, ouvrant des perspectives pour le développement de stratégies innovantes.

Considérant le rôle clef, dans la survenue et la progression de l'HTA, de l'adipogenèse et possiblement du SMet, joué par l'activation excessive du récepteur aux minéralocorticoïdes liée à hyperaldostéronisme observé dans ces pathologies, nous avons émis l'hypothèse que l'antagonisation du MR pourrait avoir des effets bénéfiques si elle était mise en place chez des sujets à risque d'IC, à des stades précoces et asymptomatiques. En ciblant les facteurs aggravant l'IC avant l'apparition des premiers signes cliniques de la maladie cardiaque, cette approche devrait être en mesure de prévenir, ou tout au moins de ralentir, la progression vers une IC constituée.

La présente étude a pour objectif d'évaluer sur le plan expérimental la pertinence d'un traitement par ARM (Eplérénone) en monothérapie précoce et à long terme des constituants du SMet, pour la prévention subséquente de l'IC.

Pour ce faire, une première phase de l'étude a été consacrée à la définition des conditions expérimentales adaptées à nos attentes. Les mécanismes physiopathologiques à l'œuvre dans ces conditions étant complexes et variés, il était particulièrement important d'identifier un modèle expérimental animal adéquat, et de caractériser chez ce dernier les différentes étapes de progression de l'IC sous l'influence d'un SMet par un phénotypage cardiaque, rénal et métabolique le plus complet possible. Cette étape était nécessaire notamment pour déterminer le moment le plus opportun pour le démarrage du traitement

ARM afin qu'il offre une efficacité maximale dans la prévention de l'IC, la seconde partie de mon travail de thèse a consisté à établir l'intérêt du concept de traitement préventif par ARM donné en monothérapie chez les animaux modèles au cours d'une étude longitudinale ayant pour objectifs d'établir l'impact du traitement ARM sur le phénome des animaux, et de déterminer son empreinte au niveau du transcriptome et du miRNome de deux organes ciblés par l'ARM et importants dans la physiopathologie du SMet et de l'IC : le cœur et le TA viscéral. L'objectif ultime de notre étude était de préciser, par le biais d'une analyse fonctionnelle intégrative des données phénotypiques et génomiques, les mécanismes moléculaires impliqués dans la progression de l'IC et ceux impactés par l'ARM, en identifiant les fonctions biologiques, les circuits transcriptionnels et leur régulation, et les éléments génomiques clefs associés à chaque condition.

METHODOLOGIE :

CHOIX DU MODELE ET DES CONDITIONS EXPERIMENTALES

METHODOLOGIE : CHOIX DU MODELE ET DES CONDITIONS EXPERIMENTALES

L'étude au niveau fondamental de pathologies complexes et multifactorielles comme celle de l'IC ou le SMet est facilitée par l'utilisation de modèles expérimentaux mimant la physiopathologie de ces maladies. Dans le domaine des cardiomyopathies et des anomalies du SMet, de nombreux modèles animaux existent avec des caractéristiques très variées et qui présentent des avantages et des inconvénients respectifs qu'il convient de prendre en compte lors de la sélection d'un modèle correspondant au mieux à l'hypothèse de travail à valider. La revue « ***Hypertension, hypercoagulability and the metabolic syndrome: a cluster of risk factors for cardiovascular disease*** » (présentée à la fin de cette section du manuscrit) à laquelle j'ai pu participer au début de ma thèse expose les caractéristiques phénotypiques d'une série de modèles animaux pouvant être utilisés dans l'étude du SMet en association avec une HTA et/ou la coagulation [233]. Ce premier travail m'a permis de passer en revue de manière critique les divers modèles animaux disponibles et d'évaluer leurs pertinences dans le contexte de notre étude.

Pour être adapté à l'étude de l'impact de l'activation excessive du RM dans la progression du SMet et l'IC, le modèle animal sélectionné devait développer en parallèle :

- un hyperaldostéronisme
- les composants du SMet : obésité, insulino-résistance, DT2, HTA et dyslipidémie, ainsi qu'une IC dont la sévérité est augmentée par la présence du SMet.

La majorité des modèles expérimentaux de SMet sont des souches d'animaux présentant une mutation spontanée au niveau du gène de la leptine (Ob) ou de son récepteur (LepR). Dans les deux situations, une déficience de la signalisation intracellulaire de la leptine est à la base des troubles métaboliques observés qui sont alors secondaire à une hyperphagie : obésité, dyslipidémie, insulino-résistance et DT2 (**Figure 31**).

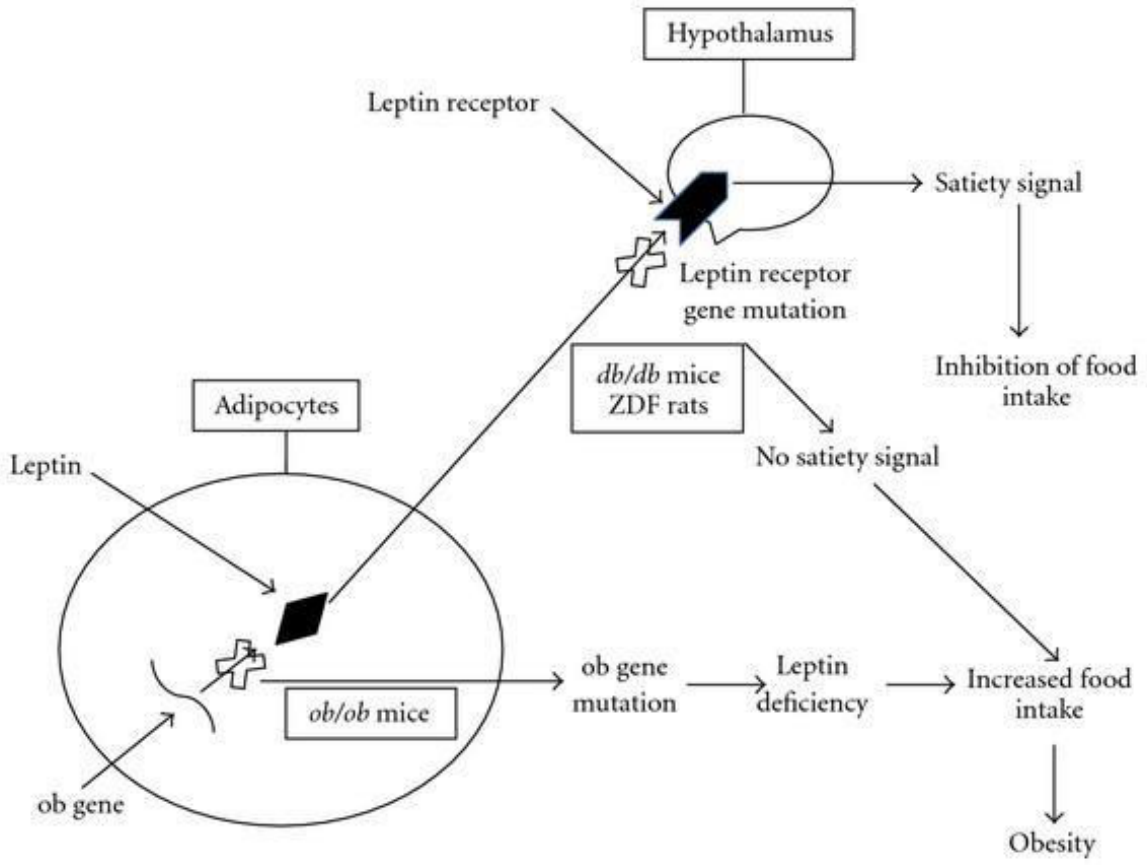


Figure 31 : Mécanismes d'actions de la leptine et de son récepteur sur la satiété ainsi que les effets de leurs déficiences [234].

Si les modèles murins de rats Zucker Obese,SHR-SP obese, SHR Obese (ou rats koletsky), SHR/N-cp, ZDF, JCR:LA-cp, ZSF- 1 et souris ob/ob, souris db/db sont potentiellement intéressants pour l'étude du SMet par le fait qu'ils présentent les critères du SMet, ces derniers ne développent pas tous un hyperaldostéronisme et une IC dont la sévérité serait liée à la présence du SMet (**Tableau 9**) [235]. Certains de ces modèles développent éventuellement quelques signes de cardiomyopathies (hypertrophie, fibrose, lésion myocardique) mais ne présentent pas d'évolution spontanée vers une IC.

Modèle	Génotype	Critères du Syndrome métabolique					Hyperaldostéronisme	Développement d'une insuffisance cardiaque
		HTA	Obésité	Dyslipidémie	Insulino-résistance	Diabète de type 2		
Rat Zucker Obese	$Lepr^{fa/fa}$	mitigée dans la littérature, mais souvent décrite apparaissant avec l'âge des animaux	Oui	Oui	Oui	Oui	Non	Apparition d'une hypertrophie cardiaque et d'une fibrose avec l'âge mais pas d'IC
Rat SHR-SP fatty	$Lepr^{fa/fa}$	Hypertension sévère	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Apparition d'une hypertrophie cardiaque avec l'âge mais pas d'IC
Souris ob/ob	$Lep^{ob/ob}$	Non	Oui	Oui	Oui	Oui	Non	Apparition d'une hypertrophie cardiaque avec l'âge mais pas d'IC
Souris db/db	$Lepr^{db/db}$	Non	Oui	Oui	Oui	Oui	Non	Apparition d'une hypertrophie cardiaque avec l'âge mais pas d'IC
Rat SHROB	$Lepr^{cp/cp}$	Hypertension sévère	Oui	Oui	Oui	Oui	Non	hypertrophie cardiaque, fibrose, dysfonction myocardique mais pas d'IC
Rat JCR :LA-cp	$Lepr^{cp/cp}$	Non	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Lésions myocardique: fibrose, inflammation mais pas d'IC
Rat ZDF	$Lepr^{fa/fa}$	Non	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Apparition d'une hypertrophie cardiaque et d'une fibrose avec l'âge mais pas d'IC
Rat SHR/N-cp	$Lepr^{cp/cp}$	Hypertension sévère	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Susceptibilité aux lésions myocardique mais pas d'IC
Rat ZSF-1	$Lepr^{cp/fa}$	Hypertension sévère	Oui	Oui	Oui	Oui	Non	IC congestive
Rat SHHF	$Lepr^{cp/cp}$	Hypertension sévère	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	IC congestive

Tableau 9 : Caractéristiques phénotypiques des principaux modèles murins d'études du SMet. HTA= hypertension artérielle, IC= insuffisance cardiaque, SHR= rat spontanément hypertendu, ZDF= Zucker fatty diabetic, SHHF= Spontaneously Hypertensive Heart Failure, cp= nomination de la mutation « corpulent » du gène du récepteur de la leptine, fa= nomination de la mutation « fatty » du gène du récepteur de la leptine, Lepr=récepteur de la leptine, ob= nomination de la mutation du gène de la leptine.

Comme présenté dans le **Tableau 9**, parmi les différents principaux modèles murins de SMet, les seuls évoluant vers une IC sont les modèles ZSF-1 et SHHF. Ces modèles paraissaient potentiellement intéressants pour notre étude. La souche ZSF-1 développe en effet une HTA, une obésité, un DT2, une dyslipidémie, une insulino-résistance et une IC congestive. Cependant, plusieurs études montrent que cette souche est surtout étudiée pour son phénotype d'insuffisance rénale qui est sa cause principale de mortalité prématurée [236-240]. Dans ces conditions, elle n'apparaissait pas adaptée au contexte et aux objectifs de notre étude. À l'inverse, le modèle SHHF (*Spontaneously Hypertensive Heart*

Failure, SHHF/MccGmiCrl- Lepr^{cp}), dérivé des travaux de McCune et Radin J., nous a semblé correspondre à nos attentes. Cette souche congénique provenant du croisement entre le rat SHR et le rat obèse SHR/N-cp [241] se décline sous 3 génotype : les rats SHHF$^{+/+}$, les SHHF$^{cp/+}$ et les SHHF$^{cp/cp}$ développant tous systématiquement une HTA et une IC visible par une réduction des performance cardiaque, une cardiomégalie et une dilatation ventriculaire gauche (**Figure 32**) associés à une congestion (œdèmes pulmonaires importants, ascites et gonflement des membres inférieurs), une cyanose et une dyspnée.

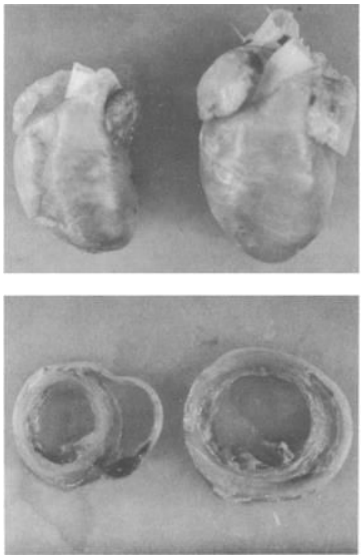


Figure 32 : Morphologie des cœurs des rats SHHF (droite) au stade d'IC terminale en comparaison avec un cœur de rat sain normal de Wistar (gauche)[242].

Les rats SHHF$^{cp/cp}$ présentent un SMet liés à la présence d'une mutation homozygote dominante dite « cp » (=corpulent) au niveau du gène du récepteur de la leptine (Lepr) étant apparue spontanément dans la souche SHR/N-cp. La présence de cette mutation introduit un codon stop lors de la traduction de la protéine du Lepr ayant pour conséquence la production d'une protéine tronquée non fonctionnelle dont les parties transmembranaires et intracellulaire sont inexistantes (**Figure 28**).

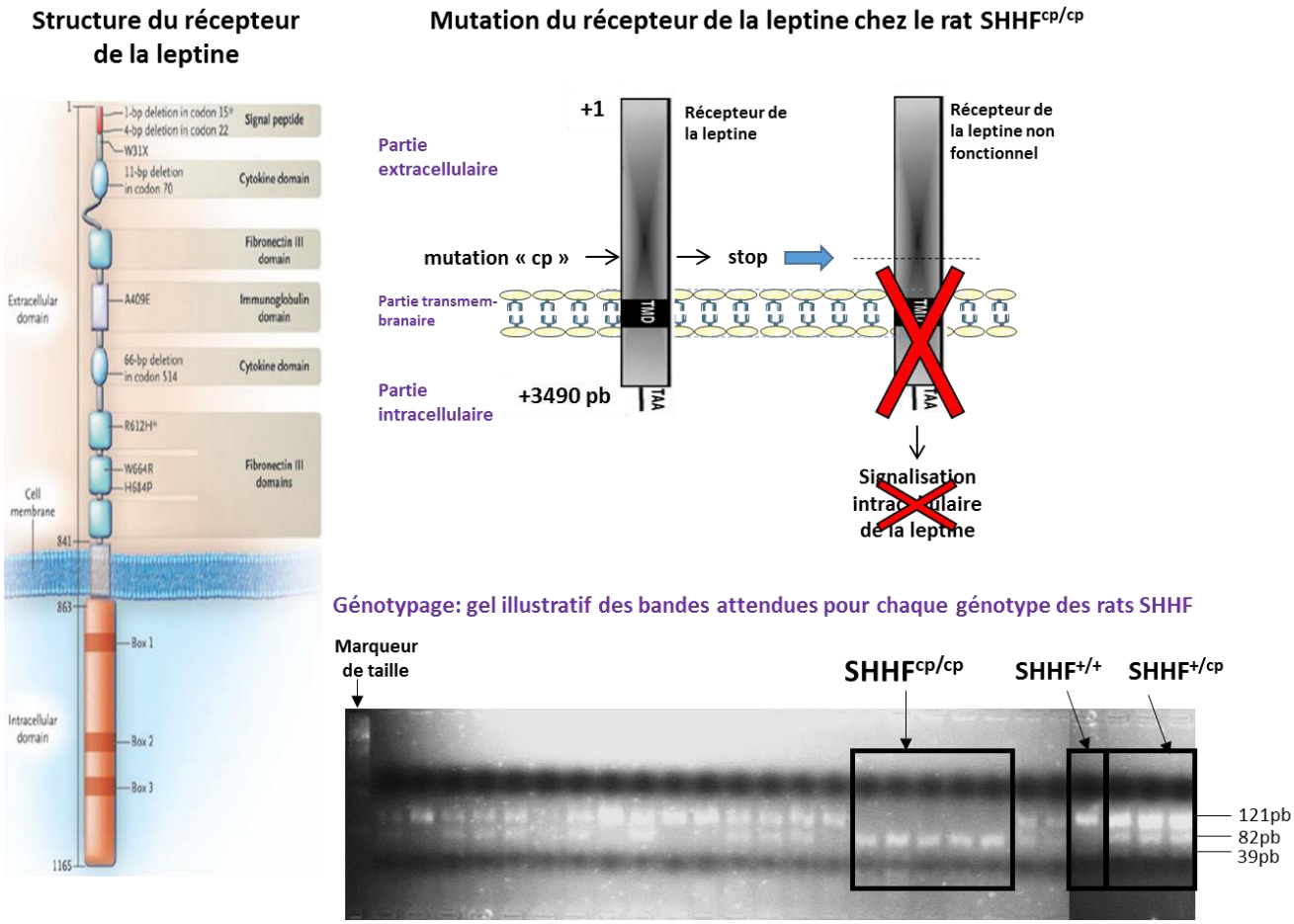


Figure 33 : Mutation du récepteur de la leptine chez le rat SHHF$^{cp/cp}$ à l'origine de leur SMet (Adapte de [243]). cp= désignation de la mutation du gène du récepteur de la leptine.

Les SHHF$^{cp/cp}$ présentent ainsi une déficience de la signalisation de la leptine conduisant à une hyperphagie et des troubles métaboliques [244] comprenant une obésité sévère (**Figure 34**), une dyslipidémie, une insulino-résistance et un DT2, ils développent également une HTA sévère et une IC plus aggravée comparés à leurs frères de litières SHHF$^{cp/+}$ et SHHF$^{+/+}$ si bien que leur espérance de vie est presque divisée par deux (**Figure 35**) **[241]**. Les animaux de génotype SHHF$^{cp/+}$ et SHHF$^{+/+}$ (regroupés sous la désignation SHHF$^{+/?}$) sont phénotypiquement non distinguables ainsi leur génotypage est nécessaire afin de les distinguer (**Figure 33**).

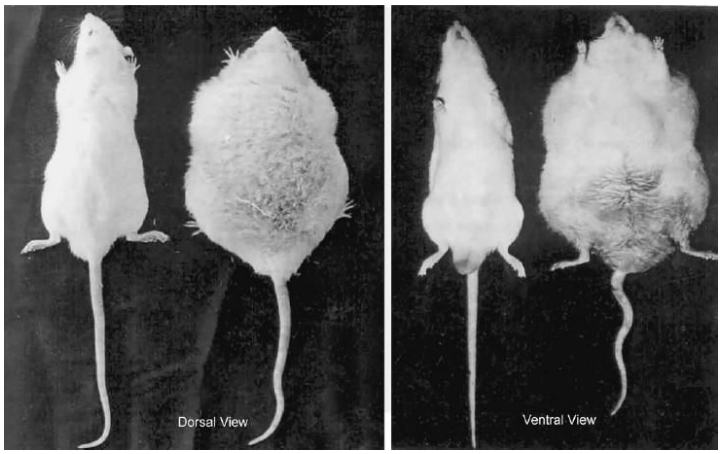


Figure 34 : Morphologie corporelle des rats SHHF$^{cp/cp}$ présentant un SMet en comparaison avec leurs frères de litières normaux les rats SHHF$^{+/+}$.

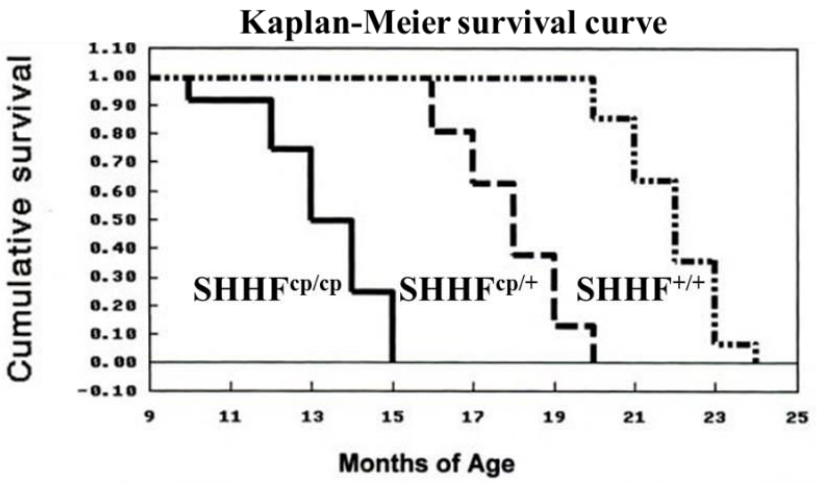


Figure 35 : Courbe de Kaplan Meier représentant le taux de survie des rats SHHF selon leur génotype [241].

Aussi, il est montré que cette souche développait un hyperaldostéronisme [245] dont l'importance augmentait avec la progression des animaux SHHF$^{+/+}$vers l'IC mais également avec le SMet [246].

Ainsi, au vue de ces différentes preuves expérimentales, le rat SHHF apparaissait comme le modèle le plus adéquat pour répondre aux objectifs de notre projet.

Après la sélection du modèle pertinent pour l'étude, il était nécessaire de sélectionner une souche d'animaux de contrôle permettant, par comparaison directe avec les rats SHHF$^{cp/cp}$, de distinguer les aspects spécifiquement associés au SMet, à l'hyperaldostéronisme et à l'IC, à l'exclusion par exemple de l'HTA du fait qu'elle se manifeste chez tous les animaux. Ce sont les rats SHHF$^{+/+}$ qui nous ont apparus les mieux adaptés dans ce contexte. En effet, ces animaux présentent les mêmes caractéristiques phénotypiques que les rats SHHF$^{cp/cp}$ à l'exception du SMet. Par ailleurs, ils ont un fond génétique proche de celui des rats SHHF$^{cp/cp}$, ce qui était primordial en vue des analyses du transcriptome au niveau d'organes d'intérêt (tissu adipeux et cardiaque) telles qu'elles étaient prévues dans notre étude.

Afin de permettre la standardisation des conditions expérimentales dans lesquelles l'étude a été menée, un ensemble de critères accompagnant le choix du modèle expérimental ont été déterminé tels que le choix du sexe des animaux, la prise en compte d'une période d'acclimatation des animaux à leur réception et avant le début du protocole, leur génotypage afin de les assigner de manière randomisée aux différents groupes d'étude, leur régime alimentaire, les conditions d'élevage en animalerie pendant toute la durée du protocole expérimental, ainsi que la standardisation des moyens de prise de mesures lors du phénotypage et des prélèvements biologiques (heure fixe de mesure, par le même expérimentateur, mesures en aveugle).

Dans le présent projet, les animaux SHHF ont été choisis de **sexe mâle** compte tenu de la différence d'activation du système rénine-angiotensine-aldostérone chez les SHHF femelles. En effet, les données de la littérature montrent que les rats SHHF femelles présentent une activation du système rénine-angiotensine plus tardive que les mâles, ce qui induit chez elles une certaine résistance basale aux traitements antihypertenseurs [247, 248]. Ce biais ne nous aurait pas permis de mettre en évidence de façon exhaustive les effets de l'antagonisation du RM.

Par ailleurs, nous avons veillé à obtenir les rats dans leurs plus jeunes âges possible (1 mois d'âge) afin de permettre une **période d'acclimatation** d'une quinzaine de jours avant de

débuter notre protocole et le phénotypage des différents paramètres. En effet, le stress des animaux suite à leurs transports constitue un biais important pour l'analyse des paramètres biologiques si une période d'acclimatation n'est pas accordée avant le début des mesures.

Nous avons également procédé au **génotypage des rats** afin de déterminer leur zygotie pour la mutation du gène Lepr et pouvoir ainsi les assigner aux différents groupes d'études. Il faut noter que les animaux $SHHF^{+/+}$ et $SHHF^{+/cp}$ sont phénotypiquement non distinguables. Seuls les animaux présentant la mutation à l'état homozygote ($SHHF^{cp/cp}$) sont distinguable phénotypiquement par leur corpulence à partir de l'âge de 2 mois.

La recommandation d'un **régime alimentaire** spécial par l'éleveur Charles River afin de favoriser le développement du SMet a été aussi prise en compte dans l'étude. Ainsi tous les animaux, aussi bien ceux devant développer un SMet que les animaux contrôles ont été maintenus sous régime enrichi en graisse : Purina 5008 dont voici la composition en comparaison avec une alimentation standard :

Purina 5008:
23% protéines, 58.5% carbohydrates, 6.5% graisse, 4.0% fibres
Calories délivrées: approximativemment 16.7% à partir des graisses
, 26.8% à partir des protéines et 56.4% à partir des carbohydrates.

standard diet; M20 SDS
23% protéines, 58.5% carbohydrate, 3.15% graisse, 4.0% fibres
, 26.8% à partir des protéines et 56.4% à partir des carbohydrates.

Tout au long du protocole et jusque sa fin, les animaux ont été maintenus dans des **conditions expérimentales fixes** afin de limiter les biais liés au stress des animaux et pouvant impacter de manière importante leurs physiologies. Ainsi, les animaux ont été maintenus dans un cycle jour/nuit de 12h:12h, à température et humidité régulée en animalerie ainsi qu'un accès libre à la nourriture et à la boisson. De même, les différents types analyses de leurs paramètres métaboliques, rénaux, cardiaques et vasculaires ont constamment été réalisés par les mêmes expérimentateurs et les mêmes appareils de mesure (pléthysmographie, cages à métabolisme, échocardiographie). Il était également important que lors de la mise à mort des animaux, les séquences de prélèvements des différents organes soient établies dans le même ordre chronologique pour chaque animal. Les différents organes ont été disséqués (reins, cœur, TA, foie, carotide, aorte, surrénales)

par le même expérimentateur et prélevés avec attention afin de les préserver de toute dégradation, notamment pour les échantillons dédiés à **l'analyse transcriptomique** compte tenu de la fragilité des ARNs, les tissus en question ont été prélevés, rincés et congelés le plus rapidement possible. Pour l'analyse des données d'expression, la méthode des *microarrays* a été choisie. Cette techniqueprésente l'avantage d'être une technologie peu coûteuse comparée au séquençage haut-débit, les analyses en découlant sont standardisées et leur obtention est plus rapide. Ainsi, elle nous est apparue adaptée aux objectifs d'étude du projet.

L'analyse des données d'expression génique obtenues par le biais des *microarrays* repose sur une série d'étapes qui ont été définies par le consortium MAQC (*Microarray Quality Control Project*) récemment lancée aux Etats-Unis visant à définir des outils de contrôle-qualité et des références pour les plateformes de *microarrays* les plus communes (Affymterix®, Illumina® et Agilent®) [193]. En effet, pour ces différentes plateformes de criblages, les méthodologies et principes sont différents et la variabilité dans la reproduction des résultats augmente lorsque les expériences sont nombreuses et répétées. Ainsi, la nécessité d'une standardisation des conditions expérimentales et des analyses biostatistiques et bioinformatiques qui y font suite semble cruciale pour l'harmonisation des résultats. La démarche que nous avons adoptée au cours de cette étude repose principalement sur les critères d'analyses dictés par le MAQC. Ainsi, à l'issue de l'étape expérimentale des *microarrays*, nous avons procéder dans un premier temps à une **analyse biostatistique**. Cette étape est primordiale pour la normalisation des données. En effet, compte tenu de la quantité massive de données obtenues (détection de l'expression de plusieurs milliers de gènes en une fois), elle a pour but dans un premier temps d'éliminer le bruit de fond lié à la variabilité expérimentale issue des différences de traitements entre les biopuces. Elle permet par la suite d'éliminer également le signal dû à des gènes non annotés ou dont le niveau d'expression est très faible. Enfin, elle permet de déterminer les différences d'expression géniques entre les conditions comparées en se basant sur des tests spécifiques de significativité. À l'issue de cette étape, une liste de gènes ou miRs candidats est générée mettant en évidence les différences d'expression génique dans les conditions expérimentales comparées. Les données générées étant très volumineuses, leur exploitation se fait à l'aide **d'outils bioinformatiques**. Ces outils mettent à profit des bases de données

regroupant des informations concernant les fonctions biologiques des gènes, les interactions entre biomolécules telles qu'elles sont décrites dans la littérature ou déduite par comparaison avec des homologues ou des orthologues par exemple (Exemples de bases de données : The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID), Ingenuity Pathway Analysis (IPA)) Il est ainsi possible d'étudier l'enrichissement des gènes candidats obtenus dans des fonctions biologiques afin d'en comprendre le sens (**Figure 36**).

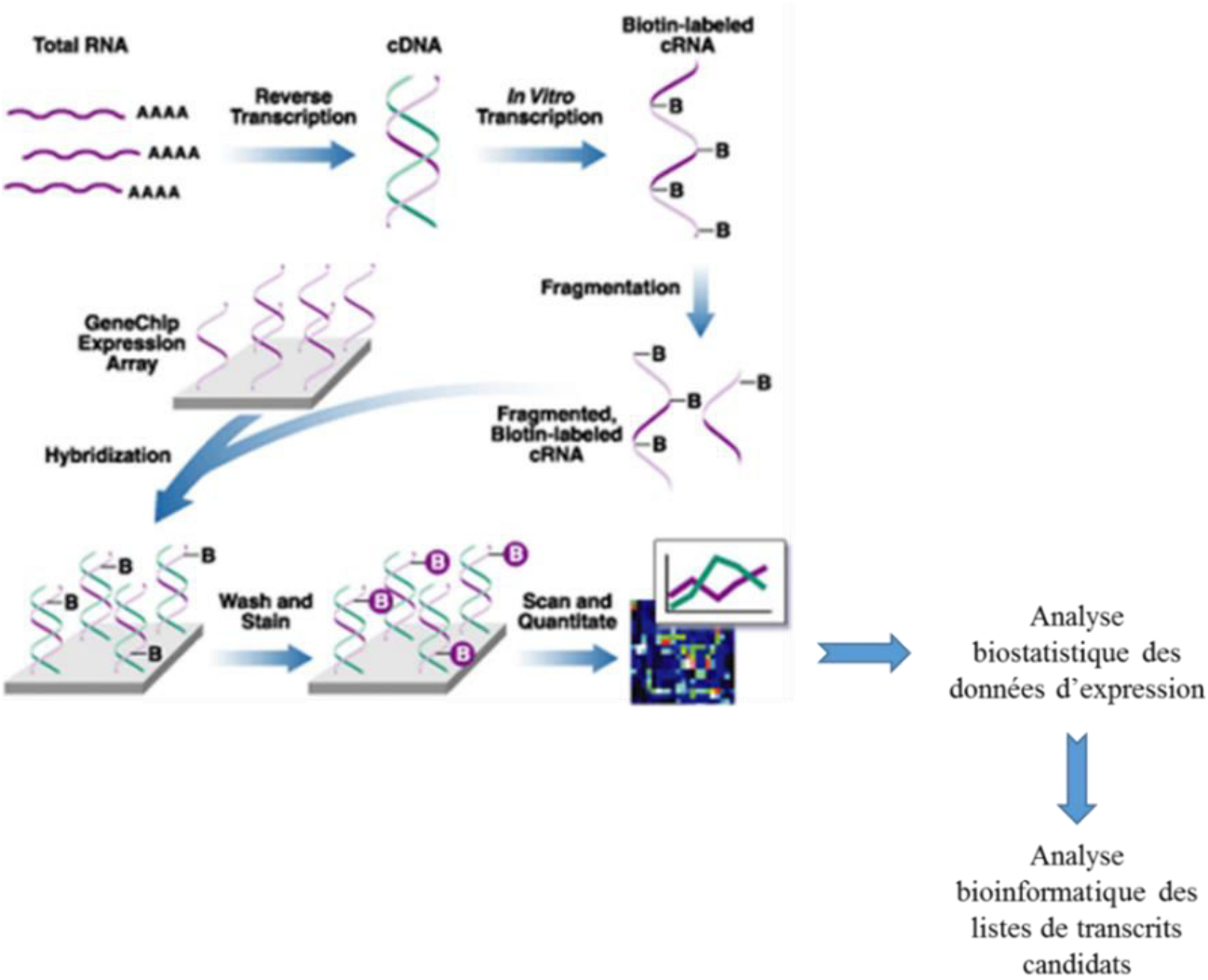


Figure 36 : Principe général d'étude du transcriptome basée sur la technologie des microarrays Affymetrix (Adapté de [249]).

Bio-Medical Materials and Engineering 22 (2012) 35–48
DOI 10.3233/BME-2012-0688
IOS Press

Hypertension, hypercoagulability and the metabolic syndrome: A cluster of risk factors for cardiovascular disease

Xianqing Mao, Karima Ait-Aissa, Jeremy Lagrange, Gina Youcef and Huguette Louis *
INSERM, U961, Vandoeuvre-les-Nancy, France
Nancy Université, Nancy, France

Abstract. Cardiovascular disease (CVD) is one of the main causes of mortality in the world representing around 30% of all deaths. It constitutes also an important factor in morbidity and incapacity. There are several related CVD risk factors such as hypertension, metabolic syndrome (MetS) and hypercoagulability. The exact mechanisms that underlie the relation between those factors and CVD are not sufficiently known yet; pathogenic explanations are lacking also for the mechanisms relating metabolic factors to insulin resistance (IR) and the association with the development of atherosclerosis and thrombosis. The possible links between hypertension, hemostasis alterations and MetS are examined in this report.

Keywords: Hypertension, hypercoagulability, metabolic syndrome, animal model

1. Introduction

There is increasing evidence for an association between atherothrombosis and the MetS, a cluster of risk factors for cardiovascular disease [1]. One of the most widely used definitions of the MetS is based on the presence of at least three of the 5 following conditions [2]: abdominal obesity (waist circumference: men, >40 inches; women, >35 inches), hypertriglyceridaemia (>150 mg/dl), low levels of HDL (high density lipoprotein) cholesterol (c-HDL) (<40 mg/dl), arterial hypertension (>130/85 mmHg), and hyperglycaemia (>100 mg/dl). Besides these conditions, the MetS is frequently accompanied by a prothrombotic state. This includes elevated plasma levels of PAI-1, thrombin activatable fibrinolysis inhibitor, von Willebrand factor, coagulation factors VIII, VII, XIII and fibrinogen, tissue factor (TF), increased release of endothelial cell microparticles and decreased protein C levels. Furthermore, patients with the MetS exhibit endothelial dysfunction (mainly decreased production of nitric oxide and prostacyclin) and heightened platelet reactivity [3]. Hypertension has been shown to be one of the most prominent features of the MetS present in up to 85% of patients. The establishment of hypertension as a component of the MetS has enabled better insight into the condition and allowed for its early detection and treatment. This review focuses specifically on the link between hypertension, hemostasis and MetS.

*Address for correspondence: Huguette Louis, Inserm U961, Faculté de Médecine, 9 avenue de la Forêt de Haye, 54500 Vandoeuvre-les-Nancy, France. Tel.: +33 3 83683631; Fax: +33 3 83683639; E-mail: huguette.louis@inserm.fr.

0959-2989/12/$27.50 © 2012 – IOS Press and the authors. All rights reserved

2. Hypertension and the metabolic syndrome

Akintunde et al. [4] reported that MetS is present in at least one third of newly diagnosed, non-diabetic, hypertensive subjects. A higher prevalence of the MetS has been described in uncontrolled hypertensives as compared to subjects with blood pressure (BP) under control [5]. In contrast, strict control of BP reduces substantially the risk of coronary events in patients with MetS [6]. In a study of Taiwanese Type 2 diabetic patients, hypertension was shown to be the most important component of MetS in association with ischemic heart disease compared to other risk factors, such as dyslipidaemia, obesity and microalbuminuria [7]. Furthermore, MetS is increasingly recognized as an important cardiovascular risk factor in hypertension, the presence of MetS seems to aggravate the severity of hypertension and to reduce the capacity of people to respond to specific treatments [8]. Hypertriglyceridaemia and low levels of high density lipoprotein (HDL) cholesterol are likely to be associated with this poor response to antihypertensive treatment in hypertensive patients with MetS [9].

Transgenic skinny mice and obese KKAy mice are both hyperleptinaemic and hypertensive due to chronic elevations in leptin resulting in enhanced sympathetic activity, which contributes to hypertension [10]. However, not all individuals with MetS have hypertension. Genetically obese leptin-deficient ob/ob mice ($Lep^{ob/ob}$) are described as hypotensive [11]. However, results of Silvani et al. [12] suggest that, in the absence of leptin, obesity may entail hypertensive derangements of BP, which are substantially modulated by cardiovascular effects of the sleep-wake cycle. Moreover, leptin receptor-deficient db/db mice ($LepR^{db/db}$) are reported to be both hypotensive and hypertensive as measured by telemetry in each of the two studies [13,14].

Despite a close association between MetS components and high BP, understanding of individual contributions of some of the MetS components to the increment in BP is still complex. As one of the main causes of the MetS visceral obesity induces development of hypertension via production of various adipocytokines, such as leptin, TNF-α, IL-6 (Inter Leukin 6), angiotensinogen, and non-esterified fatty acids (NEFA) [15]. IR as another important pathophysiological feature of the MetS is related to an increased anti-natriuretic effect contributing to the development of hypertension in the MetS [16]. In IR individuals, high serum insulin levels are associated with increased levels of circulating endothelin-1 (ET-1) [17]. In another separate experiment, insulin infusion induced an increase in arterial ET-1 content, hypertension and subsequent plasma ET-1 elevation in rats [18]. Further studies showed that ET-1 receptor antagonism effectively reduced BP in animal models of IR and hypertension [19]. Furukawa et al. [20] reported that increased oxidative stress in accumulated fat is an early instigator of MetS. In MetS rats fed a high-fat and refined-carbohydrate diet, hypertension has been associated with endothelial dysfunction and oxidative stress by depressing Nitric Oxide Sythase (NOS) protein expression [21]. Moreover, a variety of studies have reported activation of the Renin–Angiotensin–Aldosterone System (RAAS) in obesity related hypertension [22]. Accumulating data indicate that Angiotensin II (AngII), which was known initially as a key factor involved in increasing central PP and aortic stiffness [23], inhibits the action of insulin via AngII type 1 (AT1) receptors in vascular muscle by interfering with insulin signaling through PI3K (Phosphoinositide 3-Kinase) and PKB (Protein Kinase B) signaling pathways [24]. AngII receptor blockers (ARBs) with the ability to selectively modulate activity of peroxisome proliferator-activated receptor-γ (PPAR-γ), can increase adiponectin, decrease body weight and improve insulin sensitivity in patients with hypertension and the MetS [25,26]. Furthermore, interesting evidence supports the existence of a local and specific adipocyte RAAS [27] which has the capacity to impact the systemic RAAS and thus disturb BP. Indeed, adipose tissue expresses all the constituents of the RAAS needed for the production of AngII, including angiotensinogen (AGT) [28]

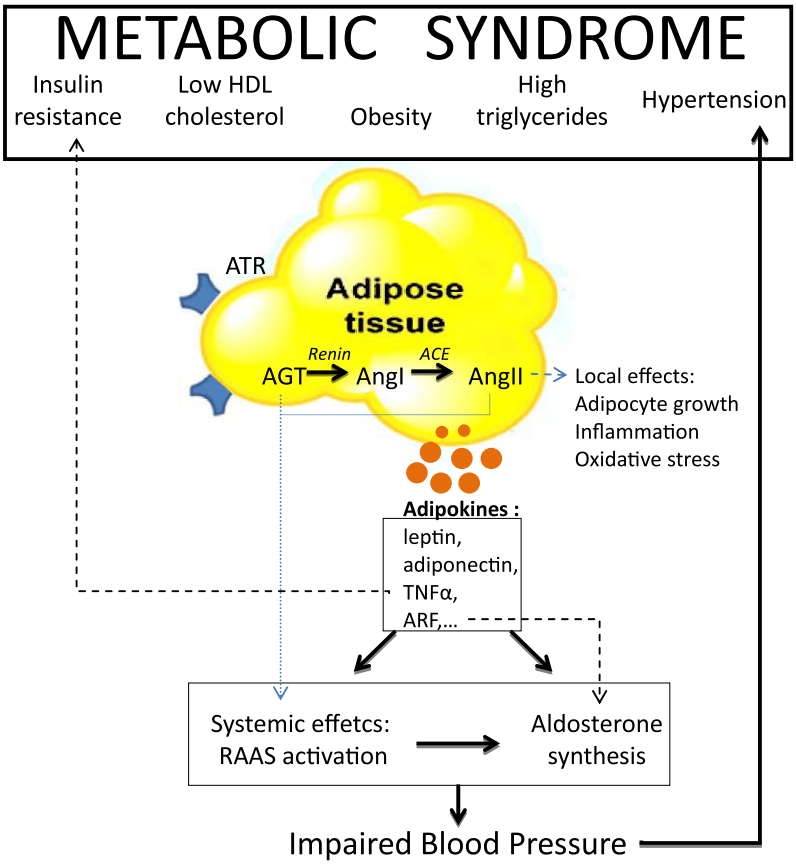


Fig. 1. Proposed relation between metabolic syndrome and obesity-related-hypertension. Ang: angiotensin; ACE: angiotensin converting enzyme; ATR: angiotensin receptor; AGT: angiotensinogen; TNF-α: tumor necrotic factor-alpha. (Colors are visible in the online version of the article; http://dx.doi.org/10.3233/BME-2012-0688.)

which contributes to approximately 30% of the systemic AGT levels in rodents, angiotensin-converting-enzyme (ACE) [29], a renin-like activity [30] and the AngII type 1 and 2 receptors (AT1R and AT2R) [31]. These components exert local effects by regulating adipose tissue growth and systemic effects by inducing production of high levels of circulating aldosterone which promotes development of impaired insulin metabolic signaling and endothelial function, which in turn contributes to hypertension (Fig. 1) and associated cardiovascular and renal structural and functional abnormalities [32]. Thus, briefly, visceral obesity, IR, oxidative stress, endothelial dysfunction, activated RAAS and increased inflammatory mediators might be the main factors in the development of hypertension in the MetS.

3. Hemostasis and metabolic syndrome

It is well established that adipose tissue plays the role of an endocrine organ which releases factors known as adipokines. Studies have suggested that adipokines such as leptin, adiponectin or ghrelin might contribute directly to the coexistence of IR and endothelial dysfunction [33] as described above. Adiponectin diminishes also platelet aggregation, epinephrine-, ADP- (Adenosine Di-Phosphate) or

collagen-induced, and dose-dependently decreases soluble CD40L (Cluster of Differentiation 40 Ligand) release of a pro-inflammatory mediator of atherothrombosis [34,35]. Serum leptin concentrations are correlated with the homeostatic index of IR which reflects the degree of IR [36]. Adiponectin, which is inversely correlated with abdominal fat, has very favorable cardiovascular effects [34,37]. Tumour necrosis factor (TNF-α)-induced Nuclear factor κ B (NF-κB) p65 subunit, a major regulator of TF expression in endothelial cells or monocytes [38,39], is inhibited by adiponectin, which enhances tissue factor pathway inhibitor (TFPI) expression and activity [40]. Ghrelin, the gut hormone, predominantly produced by the stomach is related to adipokine with respect to its food intake and energy metabolism functions. Ghrelin, through its anti-oxidative and anti-inflammatory effects, could protect against hepatotoxic agents such as carbon tetrachloride and restore activated partial thromboplastin time or fibrinogen plasma levels [41].

The prothrombotic state found in MetS is linked to hypercoagulability [42,43]. The TF-VIIa complex catalyzes the conversion of factor X to Xa which, along with factor Va, leads to the conversion of prothrombin to thrombin. Amplification loops of the coagulation cascade comprise activation of essential cofactors V and VIII by thrombin. Increased plasma levels of any of those factors leads to a hypercoagulable state. Chronic inflammation induced by obesity is associated with increased TF [39] through the NF-κB pathway [44]. In the presence of MetS increased levels of factor VII and von Willebrand factor [45], which carries factor VIII [46] are found. Very low-density lipoproteins (VLDL) that are increased in MetS support activation of factor VII by the Xa/Va complex [47]. On the other hand HDL, which are decreased in MetS, enhance the protein C pathway, the principal inducible anticoagulant pathway [48].

Hypofibrinolysis, shown by increased clot lysis times [43], is one of the best-documented parts of MetS-induced abnormalities. The physiological role of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) is to inhibit plasminogen activators such as tissue plasminogen-activator (t-PA) and to control the rate of fibrin degradation produced after thrombin generation. Plasma PAI-1 concentration is increased in subjects with MetS [49,50]. Increased cardiovascular risk [51] and free fatty acids (FFAs) catalyze the induction of PAI-1 gene expression and PAI-1 protein expression [52]. Chronic inflammation, abdominal obesity, IR, all increase PAI-1 production [49,53] and result in attenuated plasminogen conversion leading to a hypofibrinolytic state [54,55].

The same factors that modifies endothelial function or clotting in MetS have been shown to impair also platelet function. Dyslipidaemia contributes to increased platelet activation [56], triglycerides increase platelet aggregability and the incidence of venous thromboembolism; these effects are reversed by HDL cholesterol [57]. Under physiological conditions, insulin decreases platelets responses to ADP and thrombin [58,59]. Insulin resistant subjects have been linked to reduced platelet sensitivity to insulin related to loss of insulin-mediated suppression of ADP-induced P2y12 signaling [60]. Elevated FFA concentrations and hypertriglyceridaemia exert a proaggregating effect *in vitro* [61]. FFA levels are correlated with CD36 (Cluster of differentiation 36) mRNA expression [62] and the CD36 ligand facilitates the supply of FFAs for platelet thromboxane production which stimulates collagen-induced platelet aggregation [63].

Microparticles (MPs) must now be added to the MetS equation. MPs are fragments released from stimulated or apoptotic cells after plasma membrane remodeling. MPs are increased in MetS and could bind cells via specific receptors and induce cellular activation with the liberation of TF, cytokines [64] and increased endothelial dysfunction [65]. TF could be exposed at MP surfaces and is a major factor for MP thrombogenicity [66]. It has been reported that MPs are associated with CD36 which is found to be increased in obese and diabetic patients [67] and could participate in impaired platelet function.

MP release is associated with inflammation and by transporting molecules such as TF or CD36 could participate in the increased coagulation and thrombogenicity found in MetS.

4. Animal models

There are many, different, naturally occurring and gene-targeted mutations in rodents that lead to obesity and other metabolic defects associated with human MetS. Care should be taken when choosing an animal model for MetS studies, taking into account the diet used, as well as the degree to which they develop obesity, hyperlipidaemia, IR and hypertension. Although there is no perfect animal model of the human disease, each of the animal models described have specific attributes that make them useful for studying both the mechanisms of development and the link between hypertension, hemostasis and MetS (Table 1).

5. Rat models

Obese Zucker rats are the best known and most widely used animal model of genetic obesity. These animals present a mutation (fa) in the leptin receptor [68]. The *fa/fa* Zucker rats become noticeably obese between the third and the fifth week of the life. Obese Zucker rats present increased plasma glucose levels with an initial IR, followed by an insulin-deficient state associated with a body-weight plateau. This strain presents dysplipidemia and hyperinsulinaemia which is detectable at 3 weeks of age and persists throughout the animal's life. These disorders, which are all major specifications of the metabolic syndrome, should have contributed to arterial hypertension, as observed in humans. The increase in arterial BP in these animals may be explained, at least in part, by endothelial dysfunction observed in some studies on older obese Zucker rats [69]. However, it was shown that, during development, sympathovagal modulation could play a major role in the lack of increase in arterial stiffness in obese Zucker rats, despite their IR, obesity, diabetes and dysplipidemia [70]. Indeed, alteration in sympathovagal balance could lead to a reduction in heart rate that in turn, could decrease arterial stiffness in obese Zucker rats.

Spontaneous hypertensive-stroke prone fatty rats were derived by replacing the *fa* locus of chromosome 5 of SHR-SP from Zucker fatty (*fa/fa*) rats [71]. SHR-SP fatty are unique in that they develop severe hypertension and present a good model of the IR syndrome [72]. SHR-SP fatty rats are characterised by the spontaneous development of fibrotic cardiac atria and ventricles, reduced heart rate and ventricular diastolic dysfunction, obesity, hyperleptinaemia and several metabolic disorders [73]. The SBP of these rats was significantly decreased compared with their lean controls, SHRSP/Izm rats. Then, the reduction of SBP in SHR-SP fatty rats may be related to the mutation of the leptin receptor gene. Plasma leptin levels are increased in this strain compared with their lean hypertensive controls [71]. Elsewhere it has been documented that leptin resistance induces hyperinsulinaemia and IR in humans and animals [74]. The SHR-SP fatty rats may develop IR because of failure to respond to leptin due to a mutation of the leptin receptor gene.

SHR-SP, are known for their severity of lesions and high rate of stroke onset. The main lesions in SHR-SP were fibrinoid necrosis and fibrocellular proliferative lesions. These lesions were accompanied by endothelial injury and macrophage accumulation [75] suggesting that blood coagulation would be activated in SHR-SP because of the deteriorated endothelial anti-coagulant function and the expression of TF by activated endothelial cells and/or macrophages. However, hemorrhagic lesions rather than thrombotic lesions were easily found in the affected organs of SHR-SP. In addition, low levels

Table 1

Main abnormalities that characterise the different rat and mouse strains that could be used as an animal model of MetS and its interactions with hypertension and/or coagulation

	Model	Description	Hyperlipidemia	IR	Hypertension	Hypercoagulability	Model for studying	References
Rat	Obese Zucker	Leptin receptor-/-	Yes	Yes	Yes	Prothrombotic state	MetS and interactions with hypertension	[69,70,107–109]
	SHR-SP	Spontaneous Hypertension	No	Yes	Yes	Hemorrhagic lesions, hypocoagulative state	Hypertension and interaction with coagulation	[72,75,76]
	SHR-SP fatty	Spontaneous Hypertension Leptin receptor-/-	Yes	Yes	Yes	ND	Obesity, hyperlipidemia and interaction with hypertension	[71–73]
	Obese SHR	Spontaneous Hypertension	Yes	Yes	Yes	ND	Hypertension and interaction with MetS	[79,110]
	SHHR	Spontaneous Hypertension Hyperlipideamic	Yes	Yes	Yes	Hyperfibrinogenemia, hypercoagulation	Hypertension, hyperlipidemia and theirs interactions with coagulation	[42,80,99]
Mice	$Lep^{ob/ob}$	Leptin-deficient mice	Yes	Yes	Yes	Less thrombosis	Hypertension, coagulation and their interaction with MetS	[82,83,87,89]
	$LepR^{db/db}$	Leptin receptor-deficient mice	Yes	Yes	Yes	Less thrombotic following onset of vascular injury hypertensive	Hypertension, coagulation and their interaction with MetS	[13,14,83,90]
	Ldlr-/-$Lep^{ob/ob}$ Apob48-/-$Lep^{ob/ob}$ mice	Leptin and Leptin receptor deficient mice	Yes	Yes	Yes	ND	MetS and its interactions with hypertension	[92]
	New Zealand obese mice	Leptin receptor-mutant mice	Yes	Yes	Yes	ND	MetS, hyperlipidemia and their interactions with hypertension	[93,94]

of Thrombin–Antithrombin III complex (TAT) and fibrin/fibrinogen degeneration products (FDP) are found in SHR-SP compared with their normotensive, Wistar Kyoto rat controls, indicating that thrombin production was maintained at a low level in the plasma [76]. Thus, the SHR-SP rats fall into a hypocoagulable state which is quite different from the results of studies on haemostatic parameters in human hypertensives.

Obese spontaneously hypertensive rats, usually named Koletsky, have monogenetic obesity superimposed on a hypertensive genetic background [77]. This strain was derived by mating a spontaneously hypertensive (SHR) female rats of the Wistar Kyoto strain with normotensive Sprague–Dawley males [78]. This model presents obesity, hypertension, hyperinsulinaemia, hyperlipidaemia and nephropathy superimposed on the background of SHR [78,79]

Spontaneously hypertensive and hyperlipidaemic rats (SHHR) are a combination of the hypertension and hyperlipidaemia model which is the result of mating of SHR and spontaneously hyperlipidaemia rats (HLR) [80]. SHHR rats exhibit hypertension which may be related to elevated sympathetic nervous system tone that has been proposed as the cause of hypertension in SHR [81]. Otherwise, lesions in the endothelium and lipid deposition under the endothelium are observed in the aorta of 24 month old female SHHR, despite a normal diet. In parallel, increases in plasma levels of fibrinogen, TAT and α2-PI (α2-Plasmin Inhibitor) are observed in this strain [42] and suggest an hypercoagulative state.

6. Mouse models

Leptin-deficient mice ($Lep^{ob/ob}$) which cannot produce leptin due to an inactivating mutation in the leptin gene, arose from a spontaneous mutation at the Jackson Laboratory [82]. The genetic background is an extremely important consideration for the use of $Lep^{ob/ob}$ mice in studying the MetS. These mice are visually obese by 4 weeks of age, and their growth curves do not plateau even at 12 months of age. Leptin deficiency results in hyperphagia, reduced energy expenditure and extreme obesity. In addition, this strain presents mild hyperglycaemia that is apparent transiently from 8 to 12 weeks of age. At this point, pancreatic β-cell compensation occurs and increased insulin levels bring glucose homeostasis under control [83]. In addition, these mice express increased HDL levels with a catabolic pathway which is down-regulated in this strain and suggest that HDL apolipoprotein turnover may be regulated by obesity and leptin signalling [84,85]. In salt-sensitive hypertension, these obese mice express renal injury due to their obesity that induces renal oxidative stress [86]. Studies on BP in $Lep^{ob/ob}$ mice have yielded contrasting results, evidence of hypotension [87], no significant differences in BP [88] or hypertension limited to the light period [89] compared with their lean controls. However, because of their obesity, $Lep^{ob/ob}$ mice have shown hypertensive derangements of BP that appear to be modulated by cardiovascular effects of the sleep-wake cycle [12]. Otherwise, studies on vascular injury have shown that leptin-deficient and leptin receptor-deficient mice thromboses less than their controls. Leptin administration increased occlusion in these two mutant mice [90].

Leptin receptor-deficient mice ($LepR^{db/db}$) do not have leptin receptors. As with $Lep^{ob/ob}$ mice, the obese and insulin-resistant phenotype of $LepR^{db/db}$ mice depends upon their genetic background. The metabolic profiles of $LepR^{db/db}$ and $Lep^{ob/ob}$ mice are nearly identical. Both models are obese, hyperinsulinaemic, hyperglycaemic (depending on the age and strain), have elevated total cholesterol levels [83] and less thrombosis following onset of vascular injury. The primary difference between the two models is that the $LepR^{db/db}$ mice have dramatic elevations in circulating leptin concentrations that are

proportional to their degree of adiposity, whereas the $Lep^{ob/ob}$ mice do not have circulating leptin [90, 91]. Bodary et al. [13] have reported reduced arterial pressure in $LepR^{db/db}$ compared with wild-type mice with leptin. However, studies have demonstrated that *db/db* mice are hypertensive with a disrupted BP, heart rate, and locomotor activity circadian rhythms [14].

Ldlr-/-$Lep^{ob/ob}$/Apob48-/-$Lep^{ob/ob}$ mice were derived by crossing of $Lep^{ob/ob}$ with Ldlr-/- and $Lep^{ob/ob}$ with Apob48-/-, respectively [92]. These two mice models present phenotypes of the MetS combining obesity, hyperglycaemia, hyperinsulinaemia, hyperlipidaemia, and hypertension. The two lines have different lipid profiles and thus can be used for different purposes. Interestingly, Apob48-/-$Lep^{ob/ob}$ mice are diabetic by 9–10 weeks whereas Ldlr-/- $Lep^{ob/ob}$ mice are not. This may be because of their respective genotypes.

The New Zealand obese (NZO) mouse model exhibits a polygenic obesity associated with hyperinsulinaemia and hyperglycaemia. It has been shown that this strain presents additional features of the MetS, elevated BP, serum cholesterol and serum triglyceride levels [93]. In addition, studies have shown that these mice exhibit endothelial dysfunction attributed to eNOS uncoupling and increased reactive oxygen species (ROS) production [94]. Indeed, this strain presents traits of the human MetS and is therefore an ideal model for the study of the pathophysiology of a MetS, and for the identification of the responsible genes.

7. Links between hypertension and hypercoagulability in the metabolic syndrome

Hypertension is one of the factors which cause the most damage in the vascular wall and its main complications (stroke and myocardial infarction) are paradoxically thrombotic rather than haemorrhagic. Early in 1995, Miller et al. [95] had already demonstrated that hypertensive patients exhibited a relatively hypercoagulative state because of enhanced TF expression. TF plays a significant role in both thrombus formation and in the progression of atherosclerosis in patients with MetS [96]. Recent studies have shown that up-regulation of monocyte TF activity is significantly associated with carotid intima-media thickness in MetS patients, characterized by higher BP and procoagulant activity compared with control subjects [38]. The vascular wall as a natural anticoagulant blood container requires the maintenance of a certain level of various procoagulant or anticoagulant components. The balance between TF and TFPI acts as an important regulator of blood coagulation activity. Regnault et al. [97] reported that in postmenopausal women, in which an increase in arterial stiffness is associated with both changes in vascular wall status and the presence of a hypercoagulative state, free TFPI increased as the vascular wall function deteriorated and pulse pressure (PP) increased. Furthermore, their findings are supported by an increase of TFPI synthesized by VSMCs (Vascular Smooth Muscle Cells) in response to cyclic stress *in vitro*.

A number of studies have shown that rheological, haemostatic, endothelial and platelet abnormalities play a key role in the thrombotic complications of hypertension. Ajayi et al. [98] reported that fatty Zucker diabetic rats exhibited a more severe hypertension than their lean controls; moreover, as compared with the female rats, the male group presented a greater prothrombotic activity and a worse impairment of endothelial reactivity. In spontaneously hypertensive and hyperlipidaemic rats (SHHR), hypertension and its related-hyperlipidaemia caused vascular damage that lead to a hypercoagulative state, due to increased plasma levels of fibrinogen [42,99]. The hypercoagulative state in hypertension may further contribute to the increased risk and severity of target organ damage [100]. Anand et al. [101]

showed that individuals with the MetS suffer an excess of CVD explained by an excess of atherosclerosis and impaired fibrinolysis. Nevertheless, the relation between hypertension and hypercoagulability is still controversial. For example, Abumiya et al. [76] reported that the stroke-prone spontaneously hypertensive rat (SHR-SP) gets into a hypocoagulable state rather than a hypercoagulative state, and that the reduction of factor Xa activity in SHR-SP may be related to the elevation of C1 inhibitor activity. Thus, the links between increased artery pressure and hypercoagulability still remain to be investigated.

The precise mechanisms that drive the hypercoagulable state associated with hypertension may be still uncertain, but the RAAS seems to be a good possibility. A significant relation between plasma renin activity (PRA) and plasma aldosterone with markers of activated coagulation and decreased fibrinolytic activity was demonstrated in patients with essential hypertension [100]. AngII accelerates arterial thrombosis in renovascular hypertensive rats via its AT1 receptor, probably due to fibrinolysis inhibition [102]. The formation of the t-PA and PAI-1 complex reduces fibrinolytic activity through inhibition of plasminogen activation. Moreover, the levels of PAI-1 and t-PA were positively related to systolic and diastolic blood pressures (SBP and DBP) in a large cohort (>2500 person) of essentially healthy middle-aged men and woman [50]. Since both of t-PA and PAI-1 are synthesized in the vascular endothelium, endothelium dysfunction induces an imbalance in fibrinolysis [103]. Hypertensive patients with MetS have higher levels of free PAI-1 and t-PA antigen, which will increase the risk of CVD [100]. AngII has been shown to oppose the effect of NO, stimulate the production of adhesion factors, PAI-1 and decrease the level of t-PA, promoting thus the risk of thrombosis. Moreover, AngII and aldosterone interact synergistically to increase PAI-1 production in humans, and only dual AT1 and aldosterone receptor antagonism can prevent the effect of activation of the RAAS on circulating PAI-1 antigen [104]. In therapy-resistant hypertensive patients, the AT1 receptor blocker (AT1RB) eprosartan, inhibited fibrinolytic function as reflected by decreased PAI-1 antigen, PAI-1 activity and t-PA antigen [105]. Additionally, agonistic AT1 receptor auto-antibodies (AT1-AA) and AngII can cause monocytes to produce TF, and both of them induced significantly higher expression of TF in monocytes from hypertensive patients compared to control subjects [106].

8. Conclusion

Hypertension and hypercoagulability are strongly correlated in most cases of MetS probably due to an activated RAAS system coupled with a vascular damage, endothelial dysfunction, an excess of procoagulant factors and relative fibrinolysis inhibition (Fig. 2).

We have described the case in human with the problem of interconnectability between the cardiovascular events and obesity diabetes as well as the thrombotic condition. But it is difficult to find an ideal animal model (as we have shown) that covers all the conditions.

It would appear then that research will continue for some time using these animal models to investigate aspects of the global problem. Future treatments will have to take into account this complexity trying to unravel in humans why so many symptoms are associated with obesity diabetes and cardiovascular pathology. Not to forget to mention that the current association of these systems with the state of coagulation is also a risk factor in cardiovascular disease.

Acknowledgement

We thank Prof. Simon N. Thornton, INSERM U961, for editing and correcting English.

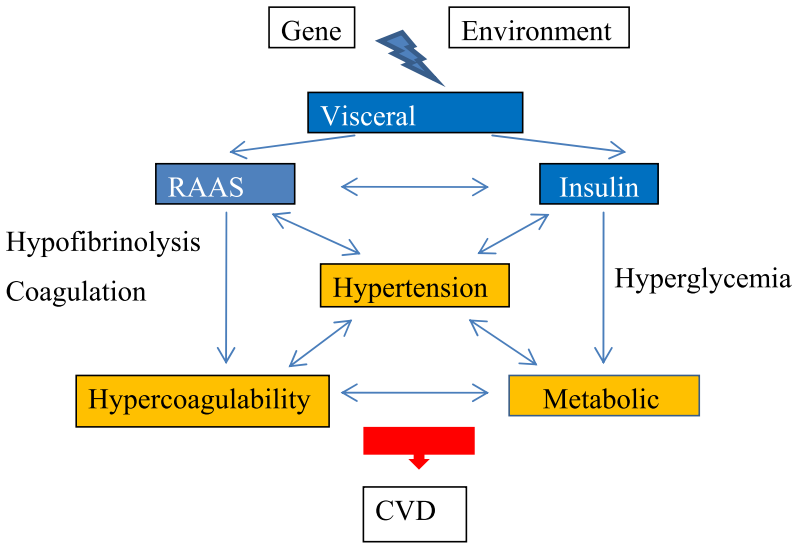


Fig. 2. Involvement of hypertension, hypercoagulability and metabolic syndrome in cardiovascular disease. CVD: cardiovascular disease; RAAS: renin angiotensin aldosterone system. (Colors are visible in the online version of the article; http://dx.doi.org/10.3233/BME-2012-0688.)

References

[1] I. Palomo, R. Moore-Carrasco, M. Alarcon, A. Rojas, F. Espana, V. Andres and H. Gonzalez-Navarro, Pathophysiology of the proatherothrombotic state in the metabolic syndrome, *Front. Biosci. (Schol. Ed.)* **2** (2010), 194–208.

[2] NCEP, Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III) final report, *Circulation* **106** (2002), 3143–3421.

[3] M. Franchini, G. Targher, M. Montagnana and G. Lippi, The metabolic syndrome and the risk of arterial and venous thrombosis, *Thromb. Res.* **122** (2008), 727–735.

[4] A.A. Akintunde, O.E. Ayodele, P.O. Akinwusi and G.O. Opadijo, Metabolic syndrome: comparison of occurrence using three definitions in hypertensive patients, *Clin. Med. Res.* **9** (2010), 26–31.

[5] E. Bog-Hansen, U. Lindblad, B. Gullberg, A. Melander and L. Rastam, Metabolic disorders associated with uncontrolled hypertension, *Diabetes Obes. Metab.* **5** (2003), 379–387.

[6] N.D. Wong, J.R. Pio, S.S. Franklin, G.J. L'Italien, T.V. Kamath and G.R. Williams, Preventing coronary events by optimal control of blood pressure and lipids in patients with the metabolic syndrome, *Am. J. Cardiol.* **91** (2003), 1421–1426.

[7] C.H. Tseng, C.K. Chong, C.P. Tseng, W.Y. Shau and T.Y. Tai, Hypertension is the most important component of metabolic syndrome in the association with ischemic heart disease in Taiwanese type 2 diabetic patients, *Circ. J.* **72** (2008), 1419–1424.

[8] R. Rossi, A. Nuzzo, G. Origliani and M.G. Modena, Metabolic syndrome affects cardiovascular risk profile and response to treatment in hypertensive postmenopausal women, *Hypertension* **52** (2008), 865–872.

[9] W. Zidek, L. Naditch-Brule, S. Perlini, C. Farsang and S.E. Kjeldsen, Blood pressure control and components of the metabolic syndrome: the GOOD survey, *Cardiovasc. Diabetol.* **8** (2009), 51.

[10] M. Aizawa-Abe, Y. Ogawa, H. Masuzaki, K. Ebihara, N. Satoh, H. Iwai, N. Matsuoka, T. Hayashi, K. Hosoda, G. Inoue, Y. Yoshimasa and K. Nakao, Pathophysiological role of leptin in obesity-related hypertension, *J. Clin. Invest.* **105** (2000), 1243–1252.

[11] A.L. Mark, R.A. Shaffer, M.L. Correia, D.A. Morgan, C.D. Sigmund and W.G. Haynes, Contrasting blood pressure effects of obesity in leptin-deficient ob/ob mice and agouti yellow obese mice, *J. Hypertens.* **17** (1999), 1949–1953.

[12] A. Silvani, S. Bastianini, C. Berteotti, C. Franzini, P. Lenzi, V. Lo Martire and G. Zoccoli, Sleep modulates hypertension in leptin-deficient obese mice, *Hypertension* **53** (2009), 251–255.

[13] P.F. Bodary, Y. Shen, M. Ohman, K.L. Bahrou, F.B. Vargas, S.S. Cudney, K.J. Wickenheiser, M.G. Myers Jr. and D.T. Eitzman, Leptin regulates neointima formation after arterial injury through mechanisms independent of blood pressure and the leptin receptor/STAT3 signaling pathways involved in energy balance, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **27** (2007), 70–76.

[14] W. Su, Z. Guo, D.C. Randall, L. Cassis, D.R. Brown and M.C. Gong, Hypertension and disrupted blood pressure circadian rhythm in type 2 diabetic db/db mice, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **295** (2008), H1634–H1641.
[15] H. Katagiri, T. Yamada and Y. Oka, Adiposity and cardiovascular disorders: disturbance of the regulatory system consisting of humoral and neuronal signals, *Circ. Res.* **101** (2007), 27–39.
[16] L.A. Sechi, Mechanisms of insulin resistance in rat models of hypertension and their relationships with salt sensitivity, *J. Hypertens.* **17** (1999), 1229–1237.
[17] P.A. Sarafidis and G.L. Bakris, Review: insulin and endothelin: an interplay contributing to hypertension development?, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **92** (2007), 379–385.
[18] C.C. Juan, Y.W. Shen, Y. Chien, Y.J. Lin, S.F. Chang and L.T. Ho, Insulin infusion induces endothelin-1-dependent hypertension in rats, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **287** (2004), E948–E954.
[19] S. DeLoach, Y. Huan, C. Daskalakis and B. Falkner, Endothelin-1 response to glucose and insulin among African Americans, *J. Am. Soc. Hypertens.* **4** (2010), 227–235.
[20] S. Furukawa, T. Fujita, M. Shimabukuro, M. Iwaki, Y. Yamada, Y. Nakajima, O. Nakayama, M. Makishima, M. Matsuda and I. Shimomura, Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome, *J. Clin. Invest.* **114** (2004), 1752–1761.
[21] C.K. Roberts, R.J. Barnard, R.K. Sindhu, M. Jurczak, A. Ehdaie and N.D. Vaziri, A high-fat, refined-carbohydrate diet induces endothelial dysfunction and oxidant/antioxidant imbalance and depresses NOS protein expression, *J. Appl. Physiol.* **98** (2005), 203–210.
[22] J.E. Hall, Pathophysiology of obesity hypertension, *Curr. Hypertens. Rep.* **2** (2000), 139–147.
[23] P. Lacolley, M.E. Safar, V. Regnault and E.D. Frohlich, Angiotensin II, mechanotransduction, and pulsatile arterial hemodynamics in hypertension, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **297** (2009), H1567–H1575.
[24] J.R. Sowers, Insulin resistance and hypertension, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **286** (2004), H1597–H1602.
[25] M. Pravenec and T.W. Kurtz, Molecular genetics of experimental hypertension and the metabolic syndrome: from gene pathways to new therapies, *Hypertension* **49** (2007), 941–952.
[26] S. Makita, A. Abiko, Y. Naganuma, Y. Moriai and M. Nakamura, Effects of telmisartan on adiponectin levels and body weight in hypertensive patients with glucose intolerance, *Metabolism* **57** (2008), 1473–1478.
[27] S. Engeli, R. Negrel and A.M. Sharma, Physiology and pathophysiology of the adipose tissue renin–angiotensin system, *Hypertension* **35** (2000), 1270–1277.
[28] L.A. Cassis, J. Saye and M.J. Peach, Location and regulation of rat angiotensinogen messenger RNA, *Hypertension* **11** (1988), 591–596.
[29] P. Schling, H. Mallow, A. Trindl and G. Loffler, Evidence for a local renin angiotensin system in primary cultured human preadipocytes, *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **23** (1999), 336–341.
[30] U. Shenoy and L. Cassis, Characterization of renin activity in brown adipose tissue, *Am. J. Physiol.* **272** (1997), C989–C999.
[31] L.A. Cassis, M.J. Fettinger, A.L. Roe, U.R. Shenoy and G. Howard, Characterization and regulation of angiotensin II receptors in rat adipose tissue. Angiotensin receptors in adipose tissue, *Adv. Exp. Med. Biol.* **396** (1996), 39–47.
[32] A. Whaley-Connell, M.S. Johnson and J.R. Sowers, Aldosterone: role in the cardiometabolic syndrome and resistant hypertension, *Prog. Cardiovasc. Dis.* **52** (2010), 401–409.
[33] A.E. Schutte, H.W. Huisman, R. Schutte, J.M. van Rooyen, L. Malan, C.M. Fourie and N.T. Malan, Adipokines and cardiometabolic function: how are they interlinked?, *Regul. Pept.* **164** (2010), 133–138.
[34] H. Kato, H. Kashiwagi, M. Shiraga, S. Tadokoro, T. Kamae, H. Ujiie, S. Honda, S. Miyata, Y. Ijiri, J. Yamamoto, N. Maeda, T. Funahashi, Y. Kurata, I. Shimomura, Y. Tomiyama and Y. Kanakura, Adiponectin acts as an endogenous antithrombotic factor, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **26** (2006), 224–230.
[35] P. Restituto, I. Colina, J.J. Varo and N. Varo, Adiponectin diminishes platelet aggregation and sCD40L release. Potential role in the metabolic syndrome, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **298** (2011), E1072–E1077.
[36] R. Lichnovska, S. Gwozdziewiczova, R. Chlup and J. Hrebicek, Serum leptin in the development of insulin resistance and other disorders in the metabolic syndrome, *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc. Czech Repub.* **149** (2005), 119–126.
[37] S. Stork, M.L. Bots, P. Angerer, C. von Schacky, D.E. Grobbee, C.E. Angermann and J. Seufert, Low levels of adiponectin predict worsening of arterial morphology and function, *Atherosclerosis* **194** (2007), e147–e153.
[38] A. Nakagomi, M. Sasaki, Y. Ishikawa, T. Shibui, M. Kosugi, Y. Endoh, M. Morikawa, Y. Kusama, H. Atarashi and K. Mizuno, Upregulation of monocyte tissue factor activity is significantly associated with carotid intima-media thickness in patients with metabolic syndrome, *J. Atheroscler. Thromb.* **18** (2011), 475–486.
[39] F. Samad, M. Pandey and D.J. Loskutoff, Regulation of tissue factor gene expression in obesity, *Blood* **98** (2001), 3353–3358.
[40] Y.J. Chen, L.Q. Zhang, G.P. Wang, H. Zeng, B. Lu, X.L. Shen, Z.P. Jiang and F.P. Chen, Adiponectin inhibits tissue factor expression and enhances tissue factor pathway inhibitor expression in human endothelial cells, *Thromb. Haemost.* **100** (2008), 291–300.

[41] O.F. Arici and N. Cetin, Protective role of ghrelin against carbon tetrachloride (CCl)-induced coagulation disturbances in rats, *Regul. Pept.* **166** (2011), 139–142.
[42] H. Amagasa, M. Okazaki, S. Iwai, T. Kumai, S. Kobayashi and K. Oguchi, Enhancement of the coagulation system in spontaneously hypertensive and hyperlipidemic rats, *J. Atheroscler. Thromb.* **12** (2005), 191–198.
[43] A.M. Carter, C.M. Cymbalista, T.D. Spector and P.J. Grant, Heritability of clot formation, morphology, and lysis: the EuroCLOT study, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **27** (2007), 2783–2789.
[44] G.E. Sonnenberg, G.R. Krakower and A.H. Kissebah, A novel pathway to the manifestations of metabolic syndrome, *Obes. Res.* **12** (2004), 180–186.
[45] H.S. Lim, G.Y. Lip and A.D. Blann, Plasma von Willebrand factor and the development of the metabolic syndrome in patients with hypertension, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **89** (2004), 5377–5781.
[46] A.J. Lansbury, P.J. Grant and A.J. Catto, Atherothrombotic risk factors in subjects with a family history of stroke, *Cerebrovasc. Dis.* **14** (2002), 153–160.
[47] P.J. Grant, Diabetes mellitus as a prothrombotic condition, *J. Intern. Med.* **262** (2007), 157–172.
[48] C. Mineo, H. Deguchi, J.H. Griffin and P.W. Shaul, Endothelial and antithrombotic actions of HDL, *Circ. Res.* **98** (2006), 1352–1364.
[49] A. Pandolfi, D. Cetrullo, R. Polishuck, M.M. Alberta, A. Calafiore, G. Pellegrini, E. Vitacolonna, F. Capani and A. Consoli, Plasminogen activator inhibitor type 1 is increased in the arterial wall of type II diabetic subjects, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **21** (2001), 1378–1382.
[50] K.A. Poli, G.H. Tofler, M.G. Larson, J.C. Evans, P.A. Sutherland, I. Lipinska, M.A. Mittleman, J.E. Muller, R.B. D'Agostino, P.W. Wilson and D. Levy, Association of blood pressure with fibrinolytic potential in the Framingham offspring population, *Circulation* **101** (2000), 264–269.
[51] T. Hoekstra, J.M. Geleijnse, E.G. Schouten and C. Kluft, Plasminogen activator inhibitor-type 1: its plasma determinants and relation with cardiovascular risk, *Thromb. Haemost.* **91** (2004), 861–872.
[52] C. Banfi, L. Mussoni, P. Rise, M.G. Cattaneo, L. Vicentini, F. Battaini, C. Galli and E. Tremoli, Very low density lipoprotein-mediated signal transduction and plasminogen activator inhibitor type 1 in cultured HepG2 cells, *Circ. Res.* **85** (1999), 208–217.
[53] F. Samad, M. Pandey, P.A. Bell and D.J. Loskutoff, Insulin continues to induce plasminogen activator inhibitor 1 gene expression in insulin-resistant mice and adipocytes, *Mol. Med.* **6** (2000), 680–692.
[54] M.C. Alessi and I. Juhan-Vague, PAI-1 and the metabolic syndrome: links, causes, and consequences, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **26** (2006), 2200–2207.
[55] A. Suehiro, I. Wakabayashi, K. Uchida, T. Yamashita and J. Yamamoto, Impaired spontaneous thrombolytic activity measured by global thrombosis test in males with metabolic syndrome, *Thromb. Res.* **129**(4) (2012), 499–501.
[56] M. Kjalke, A. Silveira, A. Hamsten, U. Hedner and M. Ezban, Plasma lipoproteins enhance tissue factor-independent factor VII activation, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **20** (2000), 1835–1841.
[57] C.J. Doggen, R.N. Lemaitre, N.L. Smith, S.R. Heckbert and B.M. Psaty, HMG CoA reductase inhibitors and the risk of venous thrombosis among postmenopausal women, *J. Thromb. Haemost.* **2** (2004), 700–701.
[58] A.D. Baron, Vascular reactivity, *Am. J. Cardiol.* **84** (1999), 25J–27J.
[59] H.O. Steinberg, G. Brechtel, A. Johnson, N. Fineberg and A.D. Baron, Insulin-mediated skeletal muscle vasodilation is nitric oxide dependent. A novel action of insulin to increase nitric oxide release, *J. Clin. Invest.* **94** (1994), 1172–1179.
[60] I.A. Ferreira, A.I. Mocking, M.A. Feijge, G. Gorter, T.W. van Haeften, J.W. Heemskerk and J.W. Akkerman, Platelet inhibition by insulin is absent in type 2 diabetes mellitus, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **26** (2006), 417–422.
[61] N.A. Englyst, J.M. Taube, T.J. Aitman, T.P. Baglin and C.D. Byrne, A novel role for CD36 in VLDL-enhanced platelet activation, *Diabetes* **52** (2003), 1248–1255.
[62] K. Gertow, K.H. Pietilainen, H. Yki-Jarvinen, J. Kaprio, A. Rissanen, P. Eriksson, A. Hamsten and R.M. Fisher, Expression of fatty-acid-handling proteins in human adipose tissue in relation to obesity and insulin resistance, *Diabetologia* **47** (2004), 1118–1125.
[63] G.E. Jarvis, B.T. Atkinson, D.C. Snell and S.P. Watson, Distinct roles of GPVI and integrin alpha(2)beta(1) in platelet shape change and aggregation induced by different collagens, *Br. J. Pharmacol.* **137** (2002), 107–117.
[64] M. Mesri and D.C. Altieri, Leukocyte microparticles stimulate endothelial cell cytokine release and tissue factor induction in a JNK1 signaling pathway, *J. Biol. Chem.* **274** (1999), 23111–23118.
[65] A. Agouni, A.H. Lagrue-Lak-Hal, P.H. Ducluzeau, H.A. Mostefai, C. Draunet-Busson, G. Leftheriotis, C. Heymes, M.C. Martinez and R. Andriantsitohaina, Endothelial dysfunction caused by circulating microparticles from patients with metabolic syndrome, *Am. J. Pathol.* **173** (2008), 1210–1219.
[66] O. Morel, F. Toti, B. Hugel, B. Bakouboula, L. Camoin-Jau, F. Dignat-George and J.M. Freyssinet, Procoagulant microparticles: disrupting the vascular homeostasis equation?, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **26** (2006), 2594–2604.
[67] M.J. Alkhatatbeh, N.M. Mhaidat, A.K. Enjeti, L.F. Lincz and R.F. Thorne, The putative diabetic plasma marker, soluble CD36, is non-cleaved, non-soluble and entirely associated with microparticles, *J. Thromb. Haemost.* **9** (2011), 844–851.

[68] M.S. Phillips, Q. Liu, H.A. Hammond, V. Dugan, P.J. Hey, C.J. Caskey and J.F. Hess, Leptin receptor missense mutation in the fatty Zucker rat, *Nat. Genet.* **13** (1996), 18–19.
[69] R. Subramanian and K.M. MacLeod, Age-dependent changes in blood pressure and arterial reactivity in obese Zucker rats, *Eur. J. Pharmacol.* **477** (2003), 143–152.
[70] E. Cosson, P. Valensi, D. Laude, D. Mesangeau and H. Dabire, Arterial stiffness and the autonomic nervous system during the development of Zucker diabetic fatty rats, *Diabetes Metab.* **35** (2009), 364–370.
[71] J. Hiraoka-Yamamoto, Y. Nara, N. Yasui, Y. Onobayashi, S. Tsuchikura and K. Ikeda, Establishment of a new animal model of metabolic syndrome: SHRSP fatty (fa/fa) rats, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **31** (2004), 107–109.
[72] M. Collison, A.M. Glazier, D. Graham, J.J. Morton, M.H. Dominiczak, T.J. Aitman, J.M. Connell, G.W. Gould and A.F. Dominiczak, Cd36 and molecular mechanisms of insulin resistance in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat, *Diabetes* **49** (2000), 2222–2226.
[73] Y. Tada, S. Kagota, M. Matsumoto, Y. Naito, H. Shibata, N. Nejime, T. Tsujino, M. Koshiba, T. Masuyama and K. Shinozuka, Characterization of cardiac size and function in SHRSP.Z-Lepr(fa)/IzmDmcr rats, a new animal model of metabolic syndrome, *Biol. Pharm. Bull.* **33** (2010), 1971–1976.
[74] Y. Anini and P.L. Brubaker, Role of leptin in the regulation of glucagon-like peptide-1 secretion, *Diabetes* **52** (2003), 252–259.
[75] T. Abumiya, J. Masuda, J. Kawai, T. Suzuki and J. Ogata, Heterogeneity in the appearance and distribution of macrophage subsets and their possible involvement in hypertensive vascular lesions in rats, *Lab. Invest.* **75** (1996), 125–136.
[76] T. Abumiya, T. Sakata, K. Enjyoji, H. Kato, J. Kawai, T. Suzuki, J. Masuda, T. Sasaguri and J. Ogata, Does hypertension confer a hypercoagulable state in stroke-prone spontaneously hypertensive rats?, *J. Hypertens.* **18** (2000), 901–909.
[77] T. Ishizuka, P. Ernsberger, S. Liu, D. Bedol, T.M. Lehman, R.J. Koletsky and J.E. Friedman, Phenotypic consequences of a nonsense mutation in the leptin receptor gene (fak) in obese spontaneously hypertensive Koletsky rats (SHROB), *J. Nutr.* **128** (1998), 2299–2306.
[78] S. Koletsky, Pathologic findings and laboratory data in a new strain of obese hypertensive rats, *Am. J. Pathol.* **80** (1975), 129–142.
[79] P. Ernsberger, R.J. Koletsky, D.D. Kline, D.M. Bedol and J.E. Friedman, The SHROB model of syndrome X: effects of excess dietary sucrose, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **892** (1999), 315–318.
[80] T. Kumai, S. Oonuma, Y. Kitaoka, M. Tadokoro and S. Kobayashi, Biochemical and morphological characterization of spontaneously hypertensive hyperlipidaemic rats, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **30** (2003), 537–544.
[81] K. Okamoto, S. Nosaka, Y. Yamori and M. Matsumoto, Participation of neural factor in the pathogenesis of hypertension in the spontaneously hypertensive rat, *Jpn. Heart J.* **8** (1967), 168–180.
[82] Y. Zhang, R. Proenca, M. Maffei, M. Barone, L. Leopold and J.M. Friedman, Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue, *Nature* **372** (1994), 425–432.
[83] A.J. Kennedy, K.L. Ellacott, V.L. King and A.H. Hasty, Mouse models of the metabolic syndrome, *Dis. Models Mech.* **3** (2010), 156–166.
[84] H. Hyogo, S. Roy and D.E. Cohen, Restoration of gallstone susceptibility by leptin in C57BL/6J ob/ob mice, *J. Lipid Res.* **44** (2003), 1232–1240.
[85] D.L. Silver, X.C. Jiang and A.R. Tall, Increased high density lipoprotein (HDL), defective hepatic catabolism of ApoA-I and ApoA-II, and decreased ApoA-I mRNA in ob/ob mice. Possible role of leptin in stimulation of HDL turnover, *J. Biol. Chem.* **274** (1999), 4140–4146.
[86] J.E. Quigley, A.A. Elmarakby, S.F. Knight, M.M. Manhiani, D.W. Stepp, J.J. Olearzcyk and J.D. Imig, Obesity induced renal oxidative stress contributes to renal injury in salt-sensitive hypertension, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **36** (2009), 724–728.
[87] C. Christoffersen, E. Bollano, M.L. Lindegaard, E.D. Bartels, J.P. Goetze, C.B. Andersen and L.B. Nielsen, Cardiac lipid accumulation associated with diastolic dysfunction in obese mice, *Endocrinology* **144** (2003), 3483–3490.
[88] F. Dong, X. Zhang, X. Yang, L.B. Esberg, H. Yang, Z. Zhang, B. Culver and J. Ren, Impaired cardiac contractile function in ventricular myocytes from leptin-deficient ob/ob obese mice, *J. Endocrinol.* **188** (2006), 25–36.
[89] S.J. Swoap, Altered leptin signaling is sufficient, but not required, for hypotension associated with caloric restriction, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **281** (2001), H2473–H2479.
[90] P.F. Bodary, R.J. Westrick, K.J. Wickenheiser, Y. Shen and D.T. Eitzman, Effect of leptin on arterial thrombosis following vascular injury in mice, *JAMA* **287** (2002), 1706–1709.
[91] P.F. Bodary, S. Gu, Y. Shen, A.H. Hasty, J.M. Buckler and D.T. Eitzman, Recombinant leptin promotes atherosclerosis and thrombosis in apolipoprotein E-deficient mice, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25** (2005), e119–e122.
[92] D.J. Lloyd, J. McCormick, J. Helmering, K.W. Kim, M. Wang, P. Fordstrom, S.A. Kaufman, R.A. Lindberg and M.M. Veniant, Generation and characterization of two novel mouse models exhibiting the phenotypes of the metabolic syndrome: Apob48-/-Lepob/ob mice devoid of ApoE or Ldlr, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **294** (2008), E496–E505.
[93] J.R. Ortlepp, R. Kluge, K. Giesen, L. Plum, P. Radke, P. Hanrath and H.G. Joost, A metabolic syndrome of hypertension, hyperinsulinaemia and hypercholesterolaemia in the New Zealand obese mouse, *Eur. J. Clin.. Invest.* **30** (2000), 195–202.

[94] C. Marchesi, T. Ebrahimian, O. Angulo, P. Paradis and E.L. Schiffrin, Endothelial nitric oxide synthase uncoupling and perivascular adipose oxidative stress and inflammation contribute to vascular dysfunction in a rodent model of metabolic syndrome, *Hypertension* **54** (2009), 1384–1392.
[95] M.A. Miller, C.R. Spillert, R. Ponnudurai, S. Bonthu and E.J. Lazaro, Are hypertensives hypercoagulable?, *J. Natl. Med. Assoc.* **87** (1995), 71–72.
[96] M. Diamant, R. Nieuwland, R.F. Pablo, A. Sturk, J.W. Smit and J.K. Radder, Elevated numbers of tissue-factor exposing microparticles correlate with components of the metabolic syndrome in uncomplicated type 2 diabetes mellitus, *Circulation* **106** (2002), 2442–2447.
[97] V. Regnault, C. Perret-Guillaume, A. Kearney-Schwartz, J.P. Max, C. Labat, H. Louis, D. Wahl, B. Pannier, T. Lecompte, G. Weryha, P. Challande, M.E. Safar, A. Benetos and P. Lacolley, Tissue factor pathway inhibitor: a new link among arterial stiffness, pulse pressure, and coagulation in postmenopausal women, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31** (2011), 1226–1232.
[98] A.A. Ajayi, H. Hercule, J. Cory, B.E. Hayes and A.O. Oyekan, Gender difference in vascular and platelet reactivity to thromboxane A(2)-mimetic U46619 and to endothelial dependent vasodilation in Zucker fatty (hypertensive, hyperinsulinemic) diabetic rats, *Diabetes Res. Clin. Pract.* **59** (2003), 11–24.
[99] H. Gomibuchi, M. Okazaki, S. Iwai, T. Kumai, S. Kobayashi and K. Oguchi, Development of hyperfibrinogenemia in spontaneously hypertensive and hyperlipidemic rats: a potentially useful animal model as a complication of hypertension and hyperlipidemia, *Exp. Anim.* **56** (2007), 1–10.
[100] L.A. Sechi, M. Novello, G. Colussi, A. Di Fabio, A. Chiuch, E. Nadalini, A. Casanova-Borca, A. Uzzau and C. Catena, Relationship of plasma renin with a prothrombotic state in hypertension: relevance for organ damage, *Am. J. Hypertens.* **21** (2008), 1347–1353.
[101] S.S. Anand, Q. Yi, H. Gerstein, E. Lonn, R. Jacobs, V. Vuksan, K. Teo, B. Davis, P. Montague and S. Yusuf, Relationship of metabolic syndrome and fibrinolytic dysfunction to cardiovascular disease, *Circulation* **108** (2003), 420–425.
[102] M. Kaminska, A. Mogielnicki, A. Stankiewicz, K. Kramkowski, T. Domaniewski, W. Buczko and E. Chabielska, Angiotensin II via AT1 receptor accelerates arterial thrombosis in renovascular hypertensive rats, *J. Physiol. Pharmacol.* **56** (2005), 571–585.
[103] C.S. Coffey, F.W. Asselbergs, P.R. Hebert, H.L. Hillege, Q. Li, J.H. Moore and W.H. van Gilst, The association of the metabolic syndrome with PAI-1 and t-PA levels, *Cardiol. Res. Pract.* **2011** (2011), 541467.
[104] P. Sawathiparnich, L.J. Murphey, S. Kumar, D.E. Vaughan and N.J. Brown, Effect of combined AT1 receptor and aldosterone receptor antagonism on plasminogen activator inhibitor-1, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **88** (2003), 3867–3873.
[105] A.W. Dielis, M. Smid, H.M. Spronk, A.J. Houben, K. Hamulyak, A.A. Kroon, H. Ten Cate and P.W. de Leeuw, Changes in fibrinolytic activity after angiotensin II receptor blockade in therapy-resistant hypertensive patients, *J. Thromb. Haemost.* **5** (2007), 1509–1515.
[106] Y. Dorffel, G. Wallukat, N. Bochnig, V. Homuth, M. Herberg, W. Dorffel, A. Pruss, R. Chaoui and J. Scholze, Agonistic AT(1) receptor autoantibodies and monocyte stimulation in hypertensive patients, *Am. J. Hypertens.* **16** (2003), 827–833.
[107] T.W. Kurtz, R.C. Morris and H.A. Pershadsingh, The Zucker fatty rat as a genetic model of obesity and hypertension, *Hypertension* **13** (1989), 896–901.
[108] W. Paul, L.R. Queen, C.P. Page and A. Ferro, Increased platelet aggregation *in vivo* in the Zucker Diabetic Fatty rat: differences from the streptozotocin diabetic rat, *Br. J. Pharmacol.* **150** (2007), 105–111.
[109] A.K. Sista, M.K. O'Connell, T. Hinohara, S.S. Oommen, B.E. Fenster, A.J. Glassford, E.A. Schwartz, C.A. Taylor, G.M. Reaven and P.S. Tsao, Increased aortic stiffness in the insulin-resistant Zucker fa/fa rat, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **289** (2005), H845–H851.
[110] S. Koletsky, Animal model: obese hypertensive rat, *Am. J. Pathol.* **81** (1975), 463–466.

Copyright of Bio-Medical Materials & Engineering is the property of IOS Press and its content may not be copied or emailed to multiple sites or posted to a listserv without the copyright holder's express written permission. However, users may print, download, or email articles for individual use.

RESULTATS:

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES EN RAPPORT AVEC LE TRAVAIL DE THESE

ETUDE N°1

RESULTATS : PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES EN RAPPORT AVEC LE TRAVAIL DE THESE

Etude N°1: « Simultaneous Characterization of Metabolic, Cardiac, Vascular and Renal Phenotypes »

Sur la base de la littérature, nous avons identifié le modèle de rats SHHF comme présentant un intérêt potentiel pour notre projet [241, 242]. Cependant, afin de mettre en place un traitement à visée préventive de l'IC, il nous fallait avec précision les fenêtres d'apparitions des différents constituants du SMet et de l'IC. Les données expérimentales disponibles sur ce modèle étaient cependant incomplètes ou obtenues dans des conditions d'étude très variables incluant : les conditions d'élevage en animalerie, l'utilisation de régimes alimentaires différents (Purina 5008 ou diet standard M20), l'absence de phénotypage métabolique complet à un âge très précoce, la mesure de certains paramètres biochimiques ou hormonaux chez des animaux à jeun ou non, ou encore l'absence dans certaines études d'un génotypage systématique (regroupement des $SHHF^{cp/+}$ et $SHHF^{+/+}$ dans un même groupe d'animaux). Par conséquent, il ne nous était pas aisé de retracer de manière fiable la chronologie d'installation de l'IC et des différents composants du SMet. Dans ce contexte, il nous a semblé essentiel de mettre en place une étude préliminaire caractérisant le plus complètement possible ces animaux dans nos conditions expérimentales (animalerie, élevage, appareils et techniques de mesures utilisées). Nous avons ainsi étudié en parallèle chez les rats $SHHF^{+/?}$et $SHHF^{Cp/Cp}$ certaines caractéristiques phénotypiques d'intérêt : métaboliques, rénales, vasculaires et cardiaques.

Cette étude avait donc pour objectifs de :

1. Caractériser le développement des traits caractéristiques attendus dans la souche SHHF et d'intérêt pour notre étude (hyperaldostéronisme, SMet et IC) en parallèle chez les rats $SHHF^{cp/cp}$ et $SHHF^{+/+}$ afin de préciser leurs étapes de développement
2. Définir par conséquent la fenêtre d'intervention thérapeutique adéquate pour un traitement ARM ciblant les facteurs de risque de l'IC (SMet) lors de leur apparition avec l'objectif d'en prévenir le développement. Caprio M *et al.* ont suggéré le rôle du RM dans la différentiation adipocytaire et son implication dans l'obésité et les

complications du SMet [185]. Les auteurs ont montré que l'antagonisation du RM au moment de la différentiation des adipocytes permet de ralentir l'adipogenèse. Ainsi, il nous a semblé que cette intervention thérapeutique devait être entreprise assez tôt lors du développement des composantes du SMet pour être la plus efficace possible.

La caractérisation standardisée des phénotypes métaboliques, rénaux, cardiaque et cardiovasculaires a été entreprise chez les rats SHHF$^{cp/cp}$ et SHHF$^{+/?}$ à partir d' 1,5 mois d'âge postnatal, correspondant au maximum de précocité possible compte tenu des contraintes liées à la livraison et à la préparation des animaux, jusqu'à l'apparition de l'IC (14 mois d'âge postnatal) (**Figure 37**).

La contribution de l'HTA dans l'IC est bien définie et établie dans la littérature. Par ailleurs, la contribution du SMet dans l'aggravation du phénotype vasculaire est un facteur supplémentaire qui va amplifier les répercussions sur le phénotype cardiaque. Ainsi notre étude caractérise pour la première fois chez le rat SHHF, l'influence de leurs SMet sur les propriétés mécaniques artérielles des carotides par la méthode d'echotracking vasculaire.

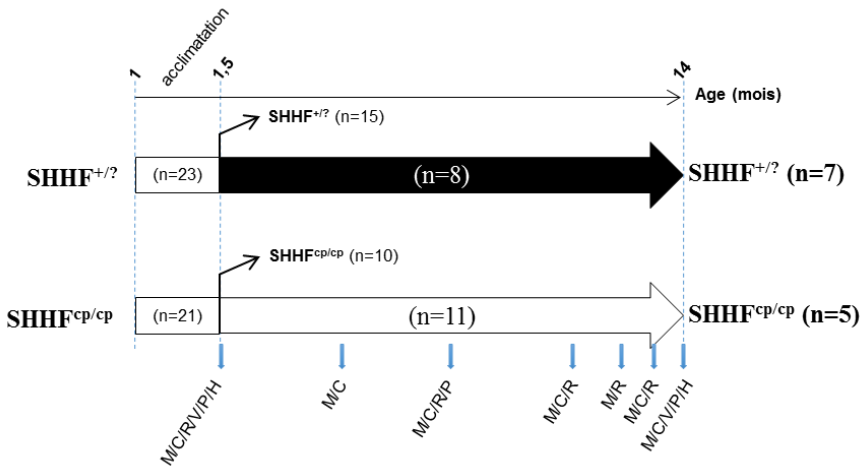


Figure 37 : Mode opératoire mis en œuvre dans l'étude N°1. Les rats SHHF$^{cp/cp}$ et SHHF$^{+/?}$ ont été caractérisés pour leurs phénotypes métabolique (M), rénal (R), vasculaire (V), cardiaque (C) et hémodynamique par le suivi de la pression artérielle (P). L'analyse histologique (H) des organes d'intérêt tels que le rein, le cœur, le foie et le tissu adipeux viscéral ont également été caractérisés.

OPEN ACCESS Freely available online

PLOS | ONE

Simultaneous Characterization of Metabolic, Cardiac, Vascular and Renal Phenotypes of Lean and Obese SHHF Rats

Gina Youcef[1,2,3,4], Arnaud Olivier[1,2,3,5,6], Clément P. J. L'Huillier[1,2,3], Carlos Labat[1,2,3], Renaud Fay[5,6], Lina Tabcheh[2,3,7], Simon Toupance[1,2,3,5,6], Rosa-Maria Rodriguez-Guéant[2,3,5,8], Damien Bergerot[9], Frédéric Jaisser[5,6], Patrick Lacolley[1,2,3,5], Faiez Zannad[1,2,3,5,6], Laurent Vallar[4], Anne Pizard[1,2,3,6]*

1 UMRS U1116 Inserm, Vandoeuvre-lès-Nancy, France, **2** Fédération de Recherche 3209, Nancy, France, **3** Université de Lorraine, Nancy, France, **4** Genomics Research Unit, Centre de Recherche Public de la Santé, Strassen, Luxembourg, **5** CHU Nancy, Nancy, France, **6** CIC 1433, Pierre Drouin, Vandoeuvre-lès-Nancy, France, **7** UMR 7365 CNRS, Vandoeuvre-lès-Nancy, France, **8** U954 Inserm, Vandoeuvre-lès-Nancy, France, **9** CIC 9201, PARCC, HEGP, Paris, France

Abstract

Individuals with metabolic syndrome (MetS) are prone to develop heart failure (HF). However, the deleterious effects of MetS on the continuum of events leading to cardiac remodeling and subsequently to HF are not fully understood. This study characterized simultaneously MetS and cardiac, vascular and renal phenotypes in aging Spontaneously Hypertensive Heart Failure lean (SHHF$^{+/?}$ regrouping $^{+/+}$ and $^{+/cp}$ rats) and obese (SHHF$^{cp/cp}$, "cp" defective mutant allele of the leptin receptor gene) rats. We aimed to refine the milestones and their onset during the progression from MetS to HF in this experimental model. We found that SHHF$^{cp/cp}$ but not SHHF$^{+/?}$ rats developed dyslipidemia, as early as 1.5 months of age. This early alteration in the lipidic profile was detectable concomitantly to impaired renal function (polyuria, proteinuria but no glycosuria) and reduced carotid distensibility as compared to SHHF$^{+/?}$ rats. By 3 months of age SHHF$^{cp/cp}$ animals developed severe obesity associated with dislipidemia and hypertension defining the onset of MetS. From 6 months of age, SHHF$^{+/?}$ rats developed concentric left ventricular hypertrophy (LVH) while SHHF$^{cp/cp}$ rats developed eccentric LVH apparent from progressive dilation of the LV dimensions. By 14 months of age only SHHF$^{cp/cp}$ rats showed significantly higher central systolic blood pressure and a reduced ejection fraction resulting in systolic dysfunction as compared to SHHF$^{+/?}$. In summary, the metabolic and hemodynamic mechanisms participating in the faster decline of cardiac functions in SHHF$^{cp/cp}$ rats are established long before their physiological consequences are detectable. Our results suggest that the molecular mechanisms triggered within the first three months after birth of SHHF$^{cp/cp}$ rats should be targeted preferentially by therapeutic interventions in order to mitigate the later HF development.

Citation: Youcef G, Olivier A, L'Huillier CPJ, Labat C, Fay R, et al. (2014) Simultaneous Characterization of Metabolic, Cardiac, Vascular and Renal Phenotypes of Lean and Obese SHHF Rats. PLoS ONE 9(5): e96452. doi:10.1371/journal.pone.0096452

Editor: Mihai Covasa, INRA, France

Received August 18, 2013; **Accepted** April 7, 2014; **Published** May 15, 2014

Copyright: © 2014 Youcef et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: Dr A. Pizard acknowledges Inserm, Région Lorraine, the « Comité Lorrain » of the « Fondation pour la Recherche Médicale » and FP7-HEALTH-2010 # 261409 MEDIA program for their financial supports to carry this project. G. Youcef is supported by a salary fellowship from AFR PhD grants, Luxembourg. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: anne.pizard@inserm.fr

Introduction

Chronic heart failure (HF) is of heterogeneous etiology but it usually occurs in the elderly [1] and unlike other cardiovascular problems its prevalence is increasing. Several studies demonstrated that patients affected by metabolic syndrome (MetS) -defined as the simultaneous occurrence of at least three of the five following risk factors: obesity, hypertension, dyslipidemia, type 2 diabetes and insulin resistance- have a higher risk of developing HF [2,3,4,5]. Indeed, it has been described that long-lasting hypertension induces left ventricular hypertrophy (LVH) and later dilatation of the LV internal cavity [6]. Diabetes as well as insulin resistance have been also associated with ventricular dysfunction and increased heart mass [7]. Furthermore, the risk of developing chronic HF has been demonstrated to be higher in obese patients and more specifically so, in those presenting abdominal obesity, a fundamental feature of MetS [8,9,10]. Thus, metabolic risk appears to be critical for the development of HF suggesting that the rising incidence of HF over the last decade probably mirrors the concurrent epidemics of obesity. Identifying and managing the patients at risk of HF prior to the onset of symptoms may be an effective approach to prolong active life by delaying or preventing the onset of HF in those patients [11]. For this attractive preventive strategy to be effective, a deep understanding of the continuum of events underpinning the transition from obesity/MetS to HF is required. Furthermore a better characterization of risk factors for the transition to HF is likely to provide new preventive therapeutic opportunities.

To study the influence of MetS on the cardiac, renal and vascular remodeling leading to the development of HF, an experimental animal model such as the Spontaneously Hypertensive rats prone to HF (SHHF/MccGmiCrl- Lepr^{cp}, SHHF) might be particularly relevant [12,13].

Obtained from the seventh backcross between SHR/N-cp obese and SHR/N rats (Spontaneously hypertensive) [14], the SHHF rat model is of great interest in our study since it mimics the same pathophysiology of human MetS and HF [12,13,15,16,17,18].

To our knowledge, it represents the only available model that could progressively and spontaneously develop HF with earlier onset when rats are homozygous for the mutant allele of the leptin receptor gene $Lepr^{cp}$, a genotype that renders them hyperphagic and obese [19]. Interestingly, the onset of HF varies accordingly to the $Lepr^{cp}$ allele dosage and consequently obese homozygous mutant animals $SHHF^{cp/cp}$ die before the lean littermates (heterozygous, $SHHF^{+/cp}$ and wild type, $SHHF^{+/+}$ later referred to as $SHHF^{+/?}$) [12].

Although some studies have been published using the SHHF rat model, the data are too scattered to draw clear-cut conclusions on the continuum of events leading to HF. Indeed, if reports have focused either on the SHHF cardiac [15,20,21] or renal features [22] and the combination of both is rarely addressed. As they are not based on the concurrent observation of obese versus lean animals in similar conditions (sex, diet, analyzed parameters), conclusions from these studies are difficult to combine in order to get a unified model. Furthermore, the vascular phenotypes of the obese and their control lean SHHF rats have not yet been evaluated.

The present study has been therefore designed to provide an integrated status of the metabolic, cardiac and vascular phenotypes of the SHHF obese as compared to lean rats in order to fully appreciate the impact of MetS on the progression towards HF.

Materials and Methods

Animal model

Male 1 month-old lean (homozygous wild type $SHHF^{+/+}$ and heterozygous $SHHF^{+/cp}$, hereafter referred to as $SHHF^{+/?}$, n = 23) and obese ($SHHF^{cp/cp}$, n = 21) Spontaneously Hypertensive Heart Failure rats (SHHF/MccGmiCrl-$Lepr^{cp}$) were purchased from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France). Animals were maintained on a 12:12-h light-dark cycle with *ad libitum* access to tap water and modestly enriched fatty diet (Purina 5008, Charles River, France) as recommended by the supplier. The composition of the diet by weight was 23% protein, 58.5% carbohydrate, 6.5% fat (as compared to 3.15% in standard diet; M20 SDS)), 4.0% fiber and 8.0% ash. Delivery of calories from each component was: approximately 16.7% from fat, 26.8% from proteins and 56.4% from carbohydrates. After a 2-week-period of acclimation, fourteen 1.5 month-old $SHHF^{+/?}$ and twelve $SHHF^{cp/cp}$ underwent detailed metabolic, cardiac, renal and vascular phenotyping before being euthanized by exsanguination leading to cardiac arrest. The remaining animals were monitored regularly over a period of 12.5 months in order to evaluate their metabolic, cardiac, renal and vascular status over time. Experimental protocols were carried out according to the institutional animal care and use committee of Inserm in order to minimize animal suffering. This protocol was reviewed and the experiments were monitored by the staff of the animal facility, which was authorized (agreement # B54-547-17) by the Ministry and local authorities.

Three $SHHF^{cp/cp}$ rats died while none of the $SHHF^{+/?}$ did during the confinement at 37°C required for the phethymography blood pressure measuring experiment. One $SHHF^{cp/cp}$ rat was found dead in his cage while no confounding behaviour warned us of such a potential event. Although those sudden deaths suggest a fragility of the $SHHF^{cp/cp}$ rats as compared to their lean counterparts it seemed inappropriate to draw a Kaplan Meier curve while most of the deaths occurring within the group of obese rats intervened during their phenotyping. Thus, the end point of our study (month 14) was determined by the number of $SHHF^{cp/cp}$ rats still alive that had to be sufficient to allow statistical comparison with the $SHHF^{+/?}$ group of rats.

Metabolic cages

All animals were individually transferred into siliconed metabolic cages (Silicone Solution in Isopropanol, SERVA; Tecniplast, France) where they were given ad libitum access to water and powdered food (Purina 5008, Charles River). Animals were followed during three consecutive days with daily monitoring of their water and food consumption as well as collection of fecal and urinary excretion. The intakes and excretions were estimated during the 3-day follow-up by averaging daily measurements to mitigate the possible changes linked to rat acclimation to the metabolic cages. Urine samples were collected on a daily basis and centrifuged at 4,500 rpm for 10 min at RT in order to discard cell debris and other solid materials before being stored at −20°C for further biochemical analysis. Urinary osmolality, ionogram, enzymatic creatinine and aldosterone levels were determined in urine samples collected on the third day since it corresponds to a physiological steady state of the rats. Osmolality was assayed using a freezing point osmometer (Roebling, Germany) whereas creatinine and aldosterone were measured with commercial kits according to the manufacturer's recommendations (OSR61204, Beckman Coulter and Siemens 06615154 Coat-A-Count RIA Aldosterone Kit, respectively).

To evaluate renal performance and activity, glomerular filtration rate (eGFR) was estimated in ml/24h and calculated as follows:

eGFR (ml/24 h) = [(Urinary creatinine concentration (mmol/L) × Urinary daily volume (mL/24 h))/serum creatinine concentration (mmol/L)].

Echocardiography

Transthoracic echocardiography was performed on anesthetized rats (Isoflurane 5% initial, 3% maintenance, in 1.5 L/min dioxygen) at different time points: 1.5, 3, 6, 9, 12 and 14 months in the left decubitus position using a 12 MHz pediatric transducer connected to a Sonos 5500 Ultrasound System (Philips, France). Short axis M-mode echocardiograms were obtained for measurement of Left Ventricle (LV) Internal Diameters at end diastole (LVIDd) and end systole (LVIDs), LV Fractional Shortening (FS), Ejection Fraction (EF), Septal (Septum) and Posterior Wall thickness (PWT). Doppler flow velocities were taken at the level of the mitral valve in the apical four-chamber view with the Doppler probe placed at the edge of the mitral leaflets where the peak of early (E) and late filling waves (A) as well as E wave deceleration time (EDT) were measured. Measurements and calculations used were as follows:

(i) **FS** (%) = [(LVIDd – LVIDs)/LVIDd] ×100.

(ii) **EF** (%) = [(EDV- ESV)/EDV] ×100 where EDV and ESV referred to End-diastolic and End-systolic volumes respectively.

(iii) **LV mass** (mg) = 1.04× [$(PWT+Septum+LVIDd)^3$-$(LVIDd)^3$] where 1.04 is the specific gravity of the myocardium.

All echocardiographic parameters were calculated by averaging results from three to four consecutive cardiac cycles for each rat at each time point.

Blood Pressure measurements

Peripheric Systolic blood pressure (SBP) as well as HR were monitored at different time points in conscious animals using the tail-cuff method (Visitech BP-2000 Systems, France). After the placement of the rats in a warmed chamber to allow caudal vein dilatation, the tail-cuff computerized non-invasive method was set to measure 10 preliminary cycles followed by 10 effective measurements. To prevent bias in data due to animal anxiety, all rats were familiarized with the procedure for at least one week before measurements.

Invasive Blood pressure and Arterial stiffness measurements

Arterial diameter (right carotid artery) and central blood pressure (diastolic, systolic and pressure pulse (PP) on left carotid artery) were simultaneously recorded in isoflurane-anesthetized rats (3% of isoflurane in 1.5 L/min dioxygen). Internal arterial diameter was measured using a 17 MHz ultrasonic echo-tracking device (NIUS-01; Asulab SA, Marin, Switzerland). 1.5- and 14-month-old rats were characterized for their carotid distensibility and compliance as well as the incremental elastic modulus (Einc) and circumferential wall stress (σ) as described previously [23].

Histology

After arterial hemodynamic property evaluation, anesthetized animals were euthanized by exsanguination leading to cardiac arrest and organs were rapidly dissected and weighted. Organs and tissue specimens were washed in physiological saline, fixed in formalin for 24 h, and then preserved in 70% ethanol before being paraffin-embedded. Histological slides for heart, kidney, liver and peri-renal visceral adipose tissue were prepared from 5 µm thick sections of the paraffin blocks and stained using Sirius Red or hematoxylin-eosin. Myocardial fibrosis was determined on Sirius red stained heart sections by measuring the percentage of fibrotic area to whole heart section area using Image J software. Paraffin-embedded carotid sections underwent Weigert's staining in order to measure the carotid mean cross sectional area (MCSA) as previously described [23]. Glomerular surface area was traced manually on different places on the kidney section and measured by using NIS-element software (Nikon). Results were the average of up to 50 glomeruli per animal of each group.

Blood collection and Biochemical assays

Arterial blood samples were collected at 1.5 months and 14 months of age through a catheter implanted in the carotid of the anesthetized rats. Venous blood samples were collected from the jugular vein puncture at several time points taking advantage of the anaesthesia of the rats that underwent echocardiographic examination. Plasma samples were collected in presence of sodium citrate (1:10 v:v of blood) to separate plasma after immediate centrifugation at 3,000 rpm for 10 min at room temperature (RT).

Plasma samples from 1.5 and 14 months old rats were used to evaluate Brain Natriuretic Peptide 45 (BNP 45) using a BNP 45 Rat ELISA Kit (Abcam, ab108816) according to manufacturer's instructions.

Serum samples were collected after 20 min sedimentation at RT and subsequent 2,300-rpm centrifugation for 15 min. Serum samples from 16 h-fasted rats at 1.5 and 14 months of age were used to evaluate total cholesterol, triglycerides, free fatty acids, creatinine and glucose concentrations by routine enzymatic methods on an automatic biochemical analyzer, sodium and potassium (Na^+, K^+) by a standardized indirect potentiometry technique. Adiponectin and Insulin levels were measured using commercially available kits according to manufacturer's instructions of the Adiponectin Rat ELISA Kit (Abcam, #ab108784) and Insulin Human ELISA kit (Abcam, #ab100578) respectively.

Insulin resistance (IR) was evaluated in rats using the homeostasis model assessment (HOMA) by calculating the HOMA-IR index as follows:

HOMA-IR = [fasting glucose concentration (mmol/L) × fasting insulin concentration (µIU/mL)]/22.5.

Statistics

All results are presented as mean ± sem. Statistical analysis of data was performed using unpaired Student's t test to compare the genotypes and ages respectively with $^{*}p<0.05$, $^{**}p<0.01$, $^{***}p<0.001$ and $^{\S}p<0.05$, $^{\S\S}p<0.01$, $^{\S\S\S}p<0.001$ to be considered statistically significant. Non-parametric ANOVA analysis with two factors allowed the evaluation of interaction between aging and genotypes.

Results

Early Metabolic disorders in SHHF$^{cp/cp}$ rats

While no differences were observed at 1.5 months of age, SHHF$^{cp/cp}$ gained significantly more weight during the following 3 months than their SHHF$^{+/?}$ littermates as animals underwent a rapid growth phase (Figure 1A). Then, both groups of rats showed a slower and almost parallel growth phase. At 14 months of age, SHHF$^{cp/cp}$ and SHHF$^{+/?}$ rat weight increased by about 6- and 4-fold, respectively (Figure 1A). Histological analysis of peri-renal visceral fat revealed the presence of very large adipocytes and evidence of fibrosis in SHHF$^{cp/cp}$ rats as compared to that of SHHF$^{+/?}$ rats (Figure 1B).

Altered plasma metabolic profiles were detectable in SHHF$^{cp/cp}$ rats as early as 1.5 months of age. These included higher levels of total cholesterol, HDL cholesterol, free fatty acids (FFA) and triglycerides (TG) (Table 1). The overall increase in blood lipid concentration in the SHHF$^{cp/cp}$ rats was significantly maintained over the time leading to major dyslipidemia at 14 months of age (Table 1). While the fasting glycemia levels were not modified either over time or between genotypes, fasting insulin levels increased significantly in animal of both genotypes but more dramatically in the SHHF$^{cp/cp}$ group indicating the development of an insulin resistance (IR) (Table 1). The IR development was confirmed by the HOMA-IR index, that discriminated the SHHF$^{cp/cp}$ rats from the SHHF$^{+/?}$ as early as 1.5 months of age. Adiponectin levels were higher as early as 1.5 months of age in the homozygous mutant group. At both ages, plasma BNP concentrations were not different between genotypes but significantly increased over time in SHHF$^{cp/cp}$ and SHHF$^{+/?}$ rats. No differences were recorded in serum sodium and potassium levels between SHHF$^{cp/cp}$ and SHHF$^{+/?}$ rats throughout the follow-up (Table 1). Hepatic steatosis was detected only at 14 months of age in livers dissected from SHHF$^{cp/cp}$ rats (Figure 1C).

Worsening of the renal function associated with $^{cp/cp}$ genotype

Average water intake (Table 2) and urine excretion (Figure 2A) estimated over three consecutive days indicated that SHHF$^{cp/cp}$ rats developed polyuria as early as 1.5 months of age before showing evidence of polydipsia. Up to 12 months of age volumes of water consumed and urinary excretion were greater in SHHF$^{cp/cp}$ rats as compared to SHHF$^{+/?}$ animals (Table 2 and Figure 2A, respectively). This occurred concomitantly with a progressive decrease in urine osmolality and creatinine (Table 2), and in parallel with a progressive increase in proteinuria over the

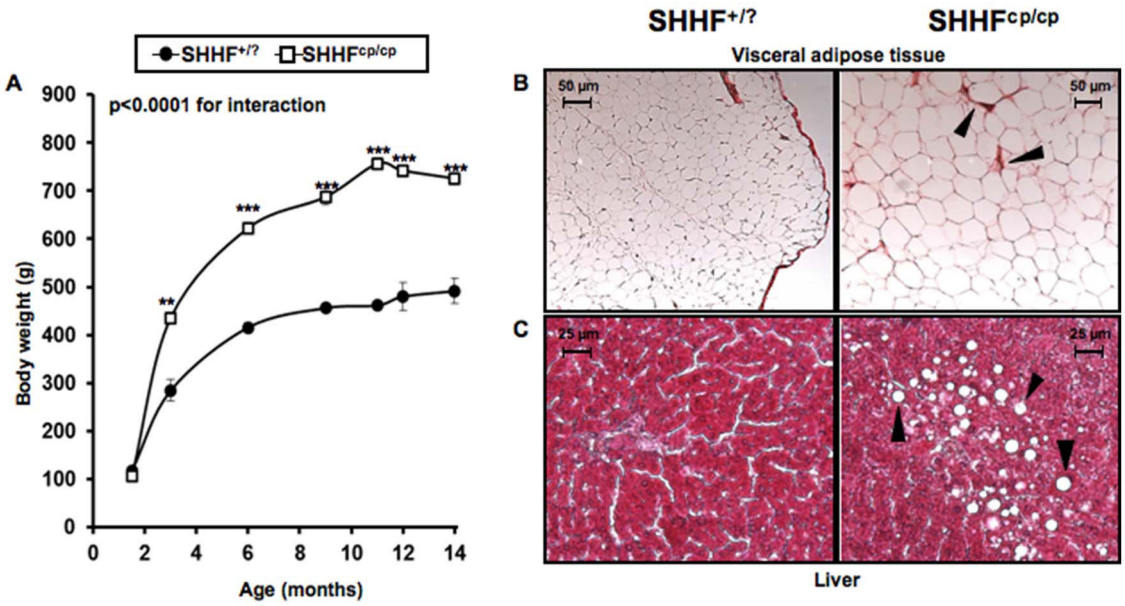


Figure 1. Metabolic follow-up. A- The monitoring of body weight shows that the onset of obesity occurs during the first three months after birth of $SHHF^{cp/cp}$ rats. Progressively, the $SHHF^{cp/cp}$ rats continue to gain weight accentuating their differences with the $SHHF^{+/?}$ (n = 5 to 14 rats per genotype). (**B–C**) Paraffin embedded tissues dissected from $SHHF^{cp/cp}$ and $SHHF^{+/?}$ rats at 14 months of age showing metabolic disorder related-tissue alterations **B**- Peri-renal visceral fat of $SHHF^{cp/cp}$ rats stained with Sirius red exhibited marked fibrosis (arrows) and hypertrophic adipocytes. **C**- Hemaetoxylin & Eosin staining shows the deposition of lipid droplets (arrows) in the liver dissected from $SHHF^{cp/cp}$ rats suggesting the development of non-alcoholic hepatic steatosis. Pictures are representative of each analyzed group (n = 5 to 7 rats per genotype). Values are mean ± sem. Non-parametric ANOVA analysis with two factors allowed the evaluation of an interaction between aging and genotype. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ for comparing $SHHF^{cp/cp}$ vs. $SHHF^{+/?}$ at the same time point.
doi:10.1371/journal.pone.0096452.g001

animals lifetime measured in the urine obtained on the third day in the metabolic cages (Figure 2B). Interestingly, while showing higher daily sodium and potassium excretions at 1.5 months of age, SHHF $^{cp/cp}$ rats reduced their excretions over time to concentrations similar to those of the $SHHF^{+/?}$ rats (Table 2). It is noteworthy that the significantly smaller sodium to potassium ratio in $SHHF^{cp/cp}$ at 1.5 months of age was observed while a higher urinary excretion of aldosterone was detected in those rats as compared to the $SHHF^{+/?}$ animals (Table 2).

The kidney weight-to-tibia length ratio was greater in the $SHHF^{cp/cp}$ rats than in the $SHHF^{+/?}$ rats (Table 2). However, histology and tissue architecture of the kidney of the obese rats did not appear altered at 1.5 months of age (Figure 2C). In contrast, abnormal architecture of the kidney was observed in 14 month-old in $SHHF^{cp/cp}$ rats compared to $SHHF^{+/?}$. Renal lesions in obese rats included increases in glomerular surface area (Figure 2C and Table 2, respectively) associated with massive protein casts in the Bowman's space and tubular lumens in both kidney cortex and medulla. In $SHHF^{+/?}$ rats, tissue alterations were restricted mostly to the cortex. At 14 months of age, the abnormal histological modifications were observed simultaneously with a significant reduction of the estimated glomerular filtration rate (eGFR) in the $SHHF^{cp/cp}$ group thus reflecting significantly reduced kidney function (Table 2).

Exacerbated cardiac remodeling in $SHHF^{cp/cp}$ rats

At 1.5 months of age, heart weight-to-tibia length ratios were significantly increased in the $SHHF^{cp/cp}$ group as compared to the $SHHF^{+/?}$ group (Table 3). Cardiac hypertrophy was not associated with gross histological modifications of the heart structure or with functional impairment at that age (Figures 3A–E at 1.5 months of age). By contrast, at 14 months of age, Sirius red staining revealed massive cardiac fibrosis in the $SHHF^{cp/cp}$ rats (Figure 3E; 14 months and table 3; % fibrotic area) which was less apparent in $SHHF^{+/?}$ animals. In the former group of rats, this was observed concomitantly with dramatically altered cardiac function parameters together with elevated HW/tibia length (Table 3).

Echocardiographic monitoring from 1.5 to 14 months of age demonstrated the development of worsened and faster cardiac remodeling in the $SHHF^{cp/cp}$ group (Table 3 and Figure 3) as compared to the $SHHF^{+/?}$ rats. Indeed, while showing indistinguishable echocardiographic parameters at 1.5 months of age, the two groups of rats developed progressively distinctive features from 6 months of age. The measured cardiac remodeling was indicative of alterations of the cardiac systolic function in the $SHHF^{cp/cp}$ group only (Table 3 and Figure 3A–B). Diastolic function was not different between lean and obese rats at 14 months of age (Table 3; LV Diastolic function).

Interestingly, a significantly heavier mass of the left ventricle (LV) of the $SHHF^{cp/cp}$ was observed as early as 6 months of age, a difference that was sustained through to 9 months of age (Figure 3C). A thinning of the LV wall (Table 3; septum and posterior wall thickness) was present in the $SHHF^{cp/cp}$ that led to dilation as early as 3 months of age (Figure 3D) and the decline by 14 months of age of the left ventricular systolic function (Figure 3A–B). Over the whole period of monitoring, the observed hypertrophic remodeling was of the eccentric type in the $SHHF^{cp/cp}$ animals since their LV dilated and their LV walls had firstly thickened before becoming thinner at 14 months of age (Figure 3C). Meanwhile the $SHHF^{+/?}$ rats developed concentric hypertrophic remodeling as their cardiac LV wall continued to thicken (Table 3; septum and posterior wall thickness and Figure 3C).

Table 1. Blood parameters.

Genotype	SHHF$^{+/?}$	SHHF$^{cp/cp}$	SHHF$^{+/?}$	SHHF$^{cp/cp}$		ANOVA	
Parameters							
Age, month	**1.5**	**1.5**	**14**	**14**	**Genotype**	**Age**	**Interaction**
N	7–12	5–10	7	5			
Ionogram, mmol/l							
Na^+	140.8±0.5	141.4±0.6	143.7±0.7§§§	143.0±0.8	ns	0.0003	ns
K^+	4.8±0.2	4.9±0.2	5.3±0.2	4.7±0.2	ns	ns	ns
Na^+/K^+ ratio	29.8±0.9	28.8±1.0	28.1±1.2	30.3±1.4	ns	ns	ns
Lipidic profil, g/l							
Total Cholesterol	0.7±0.2	0.9±0.3***	0.8±0.3	4.6±0.4***§§§	<0.0001	<0.0001	<0.0001
HDL	0.2±0.0	0.3±0.0**	0.2±0.0	0.4±0.0***§§§	<0.0001	<0.0001	<0.0001
LDL	0.4±0.1	0.5±0.1	0.4±0.1	1.3±0.2§	0.0026	0.0045	0.0141
FFA	1.1±0.4	1.7±0.5*	1.1±0.5	5.2±0.6*§	<0.0001	0.0045	0.0023
TG	0.3±0.7	0.8±0.0*	0.5±0.1	14.6±1.1***§§§	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Fasting glycemia, mg/dl	83±5	100±12	107±5	92±9	ns	ns	ns
Fasting insulin, µIU/ml	12±2	25±4	16±4§§	226±92***§§§	0.007	0.004	0.009
HOMA-IR index	0.9±0.3	2.6±0.8***	2.0±0.3§§§	14.6±5.9***§§	0.004	0.007	0.022
Creatinine, mmol/l	2.13±0.60	1.88±0.69**	4.60±0.79§§§	8.00±0.93***§§§	0.0489	<0.0001	0.0244
BNP, pg/ml	117±18	116±24	212±29§§	207±29§§	ns	0.0013	ns
Adiponectin, µg/ml	6.4±0.5	19.7±0.8***	5.3±0.7§	12.8±0.8***§§§	<0.0001	<0.0001	0.0007

Na^+, sodium, **K^+**, potassium; **HDL**, High Density Lipoprotein; **LDL**, Low density Lipoprotein; **FFA**, Free Fatty Acids; **TG**, triglyceride; **BNP**, Brain Natriuretic Peptide. Values are the mean±sem. Non-parametric ANOVAs analysis with two factors allowed the evaluation of interaction between aging and genotype. Student's T test * $p<0.05$; ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ to compare SHHF $^{cp/cp}$ *vs.* SHHF$^{+/?}$ at same time point; § $p<0.05$; §§$p<0.01$, §§§ $p<0.001$ to compare T14-mo *vs* T1.5-mo for a same genotype; **N** stands for the number of samples; **ns** stands for not significant.

doi:10.1371/journal.pone.0096452.t001

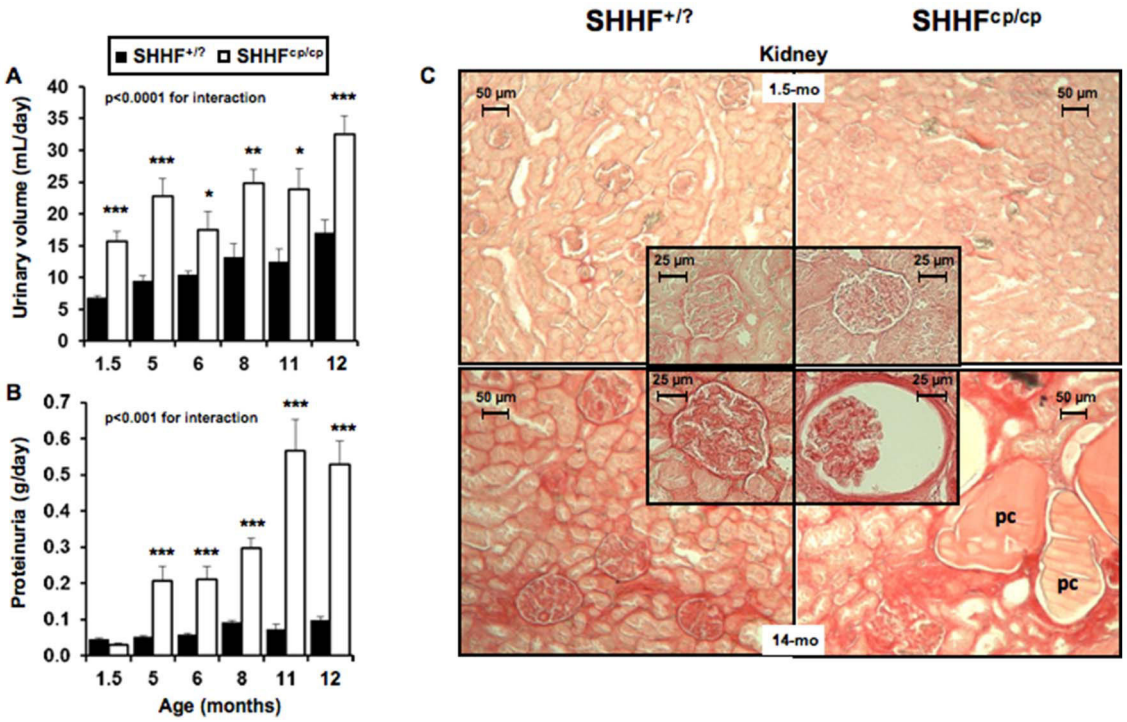


Figure 2. Renal function follow-up. The worsening of renal function associated with the $^{cp/cp}$ genotype was evaluated while rats were placed individually in metabolic cages for 3 consecutive days (n = 5 to 10 rats per genotype). The alteration of renal function observed in SHHF$^{cp/cp}$ rats is shown by **A**- increased urine excretion as early as 1.5 months of age, **B**- increased proteinuria and **C**- by major deteriorations of renal histological ultrastructure at 14 months for SHHF$^{cp/cp}$ rats ie. massive protein casts (pc), fibrosis, tubular atrophy and enlarged glomerular surfaces (insert in the bottom right panel). Pictures are representative of each analyzed group (n = 5 to 14 rats per genotype); 5-fold magnification for the global kidney picture and 20-fold for the glomeruli (inserts). Values are mean ± sem. Non-parametric ANOVA analysis with two factors allowed the evaluation of an interaction between aging and genotype. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ for comparing SHHF$^{cp/cp}$ vs. SHHF$^{+/?}$ at the same time point.
doi:10.1371/journal.pone.0096452.g002

Higher Systolic and pulse pressures in SHHF$^{cp/cp}$ rats

Blood pressure measurement was performed either invasively in anesthetized animals at the earliest and latest ages (Table 4) or in conscious rats by plethysmography at different time points (Table 5). We observed that rats of both genotypes presented comparable values of systolic, diastolic and pulse blood pressure (SBP, DBP and PP respectively) at 1.5 months of age, indicating a similar pre-hypertensive state (Figure 4A). The progression towards severe hypertension was monitored in both SHHF$^{+/?}$ and SHHF$^{cp/cp}$ groups of vigil rats by repeated measures of blood pressure using noninvasive phlethysmography (Table 5). Further hemodynamic evaluation using invasive technique on anesthetized rats showed that the central SBP and PP became significantly higher at 14 months of age only for the SHHF$^{cp/cp}$ rats as compared to their SHHF$^{+/?}$ counterparts (Figure 4A).

Age related arterial stiffening in SHHF rats

No differences in the arterial diameters at systole, diastole and mean BP were detected between the two rat groups either in younger or in older animals (Table 4). The distensibility-pressure curve at 14 months of age for SHHF$^{+/?}$ rats was shifted down words as compared to that of the SHHF$^{+/?}$ animals at 1.5 months of age reflecting stiffening of the carotid during aging (Figure 4B). Similarly, the distensibility-BP curve of the 14-month-old SHHF$^{cp/cp}$ rats was shifted down words but as well to the right in the prolongation of the curve observed in the aged-matched SHHF$^{+/?}$ attesting of higher systolic blood pressure in SHHF$^{cp/cp}$ rats (Figure 4A). Interestingly, at both studied time-points, the values of distensibility at the MBP for the SHHF$^{cp/cp}$ group were significantly decreased as compared to SHHF$^{+/?}$ rats (Table 4, $p<0.05$) suggesting an altered functionality of the carotid occurring as early as 1.5 months of age. The Einc values were slightly higher in 1.5 month-old SHHF$^{cp/cp}$ animals and significantly increased at 14 months of age (Table 4). Furthermore, the intrinsic mechanical behavior of the wall material evaluated by the wall stress/Einc curve (Figure 4C) and of the wall stress at fixed 600 kPa Einc were decreased with age in all animals but were not significantly different between the two rat groups at any time (Figure 4D). Similarly, the influence of age was detected in the MCSA values (increasing from 1.5 to 14 months of age, $p<0.00001$), but no association with the genotype could be revealed at any of the two studied time points (Table 4). Overall, the decreased distensibility observed systematically in SHHF$^{cp/cp}$ rats was not associated with dramatic remodeling of their carotid wall over time that could distinguish them from the SHHF$^{+/?}$ rats.

Discussion

It is now well established that metabolic disorders may dramatically affect heart disease manifestation, especially in the context of a metabolic syndrome when multiple disorders such as obesity, diabetes and dyslipidemia occur simultaneously [2,3,16]. There is growing evidence that alterations associated with obesity are not restricted to adipose tissue, but also affect other organs such as brain, liver, and skeletal muscle, resulting in systemic insulin resistance, inflammation, and oxidative stress [9] eventually leading to endothelial and cardiac dysfunction.

Table 2. Renal parameters.

Genotype	SHHF$^{+/?}$	SHHF$^{cp/cp}$	SHHF$^{+/?}$	SHHF$^{cp/cp}$		ANOVA	
Parameters							
Age, month	**1.5**	**1.5**	**12**	**12**	**Genotype**	**Age**	**Interaction**
N	5–10	6–10	7	5			
KW, g	0.64±0.03	0.69±0.01*	1.69±0.04§§§	1.97±0.05*§§§	0.0007	<0.0001	0.0114
KW/Tibia length, g/cm	0.27±0.01	0.32±0.01**	0.39±0.02§§§	0.49±0.02**§§§	<0.0001	<0.0001	0.0459
Glomerular surface area, μm^2	6179±777	7527±905	14969±1095§§	18864±1347*§§§	ns	<0.0001	ns
Water intake, ml/24h	21.5±1.8	22.5±1.8	30.7±3.2§	41.5±2.9**§§§	ns	<0.0001	0.019
Osmolality, mOsmol/kg H_2O	2583±103	1630±120	2268±103§§§	986±126**§§§	0.002	<0.0001	ns
Ionogram, mmol/24h							
Na^+	1668±191	2639±177***	1065±81§§	1136±93§§§	0.001	<0.0001	0.014
K^+	2965±321	5685±298***	2907±267	2886±289§§§	0.0001	0.0009	0.001
Na^+/K^+ ratio	0.57±0.02	0.46±0.01**	0.38±0.03§§	0.38±0.03§	0.046	<0.0001	0.012
Urine Creatinine, mmol//24h	72.8±5.5	81.0±5.2***	115.2±4.7§§	66.4±5.1§	0.0001	0.0434	0.0005
Aldosterone, ng/24h	3.66±1.51	14.02±1.78*	9.40±0.88§§§	7.18±1.01§§§	0.0195	ns	0.0002
eGFR, mL/24h	35±4	25±2	42±2§	11±2***§§§	ns	<0.0001	0.0004

KW, Kidney Weight; **Na^+**, sodium, **K^+**, potassium, **eGFR**, estimated Glomerular filtration rate; Values are the mean±sem. Non-parametric ANOVAs analysis with two factors allowed the evaluation of interaction between aging and genotype. Student's T test *, ** and *** $p<0.01$, $p<0.001$ and $p<0.0001$ respectively when comparing SHHF $^{+/?}$ *vs.* SHHF$^{cp/cp}$ at same time point; § $p<0.05$, §§ $p<0.01$ and §§§ $p<0.001$ to compare T14-mo *vs* T1.5-mo for a same genotype; **N** stands for the number of samples; **ns** stands for not significant.

doi:10.1371/journal.pone.0096452.t002

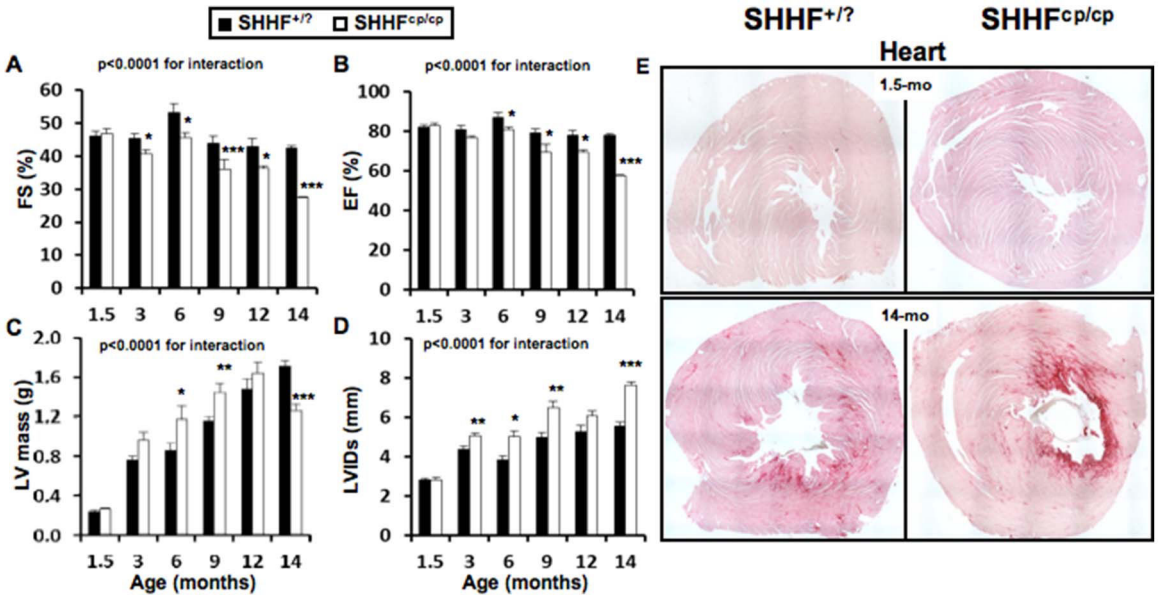


Figure 3. Cardiac follow-up. Transthoracic echocardiograms were performed on isoflurane-anesthetized SHHF at different time points throughout the protocol (1.5; 6; 9 and 14 months of age, n = 5 to 10 rats per genotype). **A**- Fractional Shortening (FS) and **B**- Ejection Fraction (EF) showed the progressive but faster decline of heart systolic function in SHHF$^{cp/cp}$ rats compared to SHHF$^{+/?}$ controls. **C**- LV mass as well as **D**- Left Ventricular (LV) Internal Diameters at end systole (LVIDs) were significantly higher in the SHHF$^{cp/cp}$ group from 6 months and continued to rise till 12 and 14 months of age respectively demonstrating LV hypertrophy and dilation **E**- Red Sirius staining performed on heart sections obtained from SHHF$^{+/?}$ and SHHF$^{cp/cp}$ rats at 1.5 and 14 months of age showed greater myocardial fibrosis in 14-month-old SHHF$^{cp/cp}$ rats compared to SHHF$^{+/?}$ from the same age (n = 5 to 7 rats per genotype). Mean ± sem. Non-parametric ANOVAs analysis with two factors allowed the evaluation of an interaction between aging and genotype. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ for comparing SHHF$^{cp/cp}$ *vs.* SHHF$^{+/?}$ at the same age.
doi:10.1371/journal.pone.0096452.g003

Interestingly, different strains of rat develop abnormalities quite similar to those present in patients with MetS and/or obesity [24]. Among them, the SHHF rat is a particularly interesting study model since it spontaneously develops HF either in the presence or absence of MetS [12,21] unlike other similar animal models described so far [13]. With the aim to investigate in-depth the impact of MetS on the progression towards cardiac remodeling and subsequent failure, we performed a comprehensive analysis of the SHHF$^{+/?}$ and SHHF$^{cp/cp}$ rats phenotypes at cardiac, renal and vascular levels. The concomitant phenotyping of both lean and obese rats helped us refine the physiopathological status of the model during development of HF and clarify discrepancies reported previously for the SHHF model. The side-by-side comparison for a period of 12.5 months (1.5 to 14 months of age) of the SHHF$^{cp/cp}$ and SHHF$^{+/?}$ rats allowed us to characterize the sequence of events leading towards the faster development of heart failure in the obese rats.

If phenotypically barely distinguishable at 1.5 month-old, the SHHF$^{+/?}$ and SHHF$^{cp/cp}$ rats develop very distinctive phenotypes with age. As reported previously SHHF$^{cp/cp}$ rats have a shorter life expectancy than their SHHF$^{+/?}$ littermates (data not shown). This might be explained by the development of severe metabolic disorders that is exclusively present in the obese rats and consequently affected pejoratively their cardiac and renal functions.

Interestingly, altered serum lipidic profiles, presence of insulin resistance and higher adiponectin levels accompanied with hyperaldosteronism were found in young SHHF$^{cp/cp}$ animals (1.5 month-old). The contribution of each of these metabolic factors in obesity and/or MetS development is well known [25,26], and it is conceivable that their alteration with ageing together with the hyperphagia resulting from the leptin receptor inactivation, participates in the development of the massive obesity and non-alcoholic hepatic steatosis found in SHHF$^{cp/cp}$ rats. Since the metabolic disorders arise at 1.5 months of age when cardiac function and blood pressure were not different between the genotypes, it is likely that these deregulations may have participated in the faster cardiac function decline observed in the SHHF$^{cp/cp}$ rats.

In discordance with reports indicating that the obese SHHF rats are affected by diabetes [13,27] we monitored glucose concentrations in blood and urine during aging in both groups of rats and never observed fasting hyperglycemia or glycosuria. However, high levels of fasting serum insulin in the SHHF$^{cp/cp}$ rats reflecting the development of an insulin resistance, rather than type 2 diabetes were detected as early as 1.5 months of age. Although SHHF$^{cp/cp}$ rats did not develop diabetes, they presented polydipsia and polyuria that were not associated with dramatic histological alteration of the kidney at the earliest studied age. Despite the absence of glycosuria, interestingly renal histological analysis of 14 month-old SHHF$^{cp/cp}$ rats showed renal lesions similar to those described for diabetes, i.e. hypercellularity, glomerular sclerosis, and increased glomerular surface. The massive proteinuria observed at 5 months of age in SHHF$^{cp/cp}$ rats was consistent with previous reports [17]. Thus, our data suggest that the SHHF$^{cp/cp}$ rats exhibit pre-diabetic features rather than diabetic type 2 trademarks. Since the SHHF strain originates from the breeding of SHR/N-cp rats themselves derived from the original Koletsky rat colony, with SHR-N rats [14] they are likely to share unidentified protective genes that may protect against the onset of Type 2 diabetes in the face of extreme obesity and insulin resistance proposed to be also present in the SHROB genetic background. Indeed, diabetes is not an intrinsic function of the cp mutation itself but likely requires polygenic interaction with

Table 3. Cardiac parameters.

Genotype	$SHHF^{+/?}$	$SHHF^{cp/cp}$	$SHHF^{+/?}$	$SHHF^{cp/cp}$		ANOVA	
Parameters							
Age, month	**1.5**	**1.5**	**14**	**14**	**Genotype**	**Age**	**Interaction**
N	10	10	7	5			
Cardiac Morphometry							
HW, g	0.75±0.03	0.77±0.04	1.95±0.04§§§	2.08±0.05***§§§	ns	<0.0001	ns
Tibia length, cm	2.30±0.03	2.13±0.03*	4.31±0.04§§	3.98±0.05***§§	<0.0001	<0.0001	0.0538
HW/Tibia, g/cm	0.32±0.01	0.36±0.01**	0.45±0.01§	0.52±0.01*§	0.0004	<0.0001	ns
Cardiac Remodeling, mm							
LVIDd	5.6±0.2	5.4±0.1	9.6±.01§§	10.7±0.2***§§§	0.013	<0.0001	0.002
Septum Thickness	1.2±0.0	1.1±0.0*	2.4±0.0§§§	1.6±0.1***§§§	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Posterior Wall Thickness	0.9±0.0	1.0±0.0	1.6±0.0§§§	1.1±0.0***§§§	<0.0001	<0.0001	<0.0001
% myocardial fibrosis	0.10±0.01	0.12±0.02	1.14±0.56	4.75±1.02*§	0.0005	0.0013	0.0372
LV Diastolic function							
A, mm/s	31±4	24±2	41±7	92±25	ns	ns	ns
E, mm/s	96±5	108±6	101±2	124±7	ns	ns	ns
E/A	3.2±0.4	4.0±0.9	2.9±0.4	1.5±0.4	ns	ns	ns
EDT, ms	14±1	14±1	32±1§§	20±5***§	<0.0001	<0.0001	<0.0001

HW, Heart Weight; **LV**, Left Ventricle; **LVIDd**, Left Ventricle Internal Diameters at diastole; **E** and **A**, early and late filling waves; **EDT**, E-vel Deceleration Time. These echocardiographic parameters are the mean ± sem of the average of three to four consecutive cardiac cycles for each rat. % of Myocardial fibrosis was determined on Sirius red stained heart sections by measuring the percentage of fibrotic area to whole heart section area using Image J software. Non-parametric ANOVAs analysis with two factors allowed the evaluation of interaction between aging and genotype. Student's T test * $p<0.05$; ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ to compare $SHHF^{+/?}$ *vs.* $SHHF^{cp/cp}$ at same time point; ; § $p<0.05$, §§ $p<0.01$ and §§§ $p<0.001$ to compare T14-mo *vs* T1.5-mo for a same genotype; **N** stands for the number of rats; **ns** stands for not significant.

doi:10.1371/journal.pone.0096452.t003

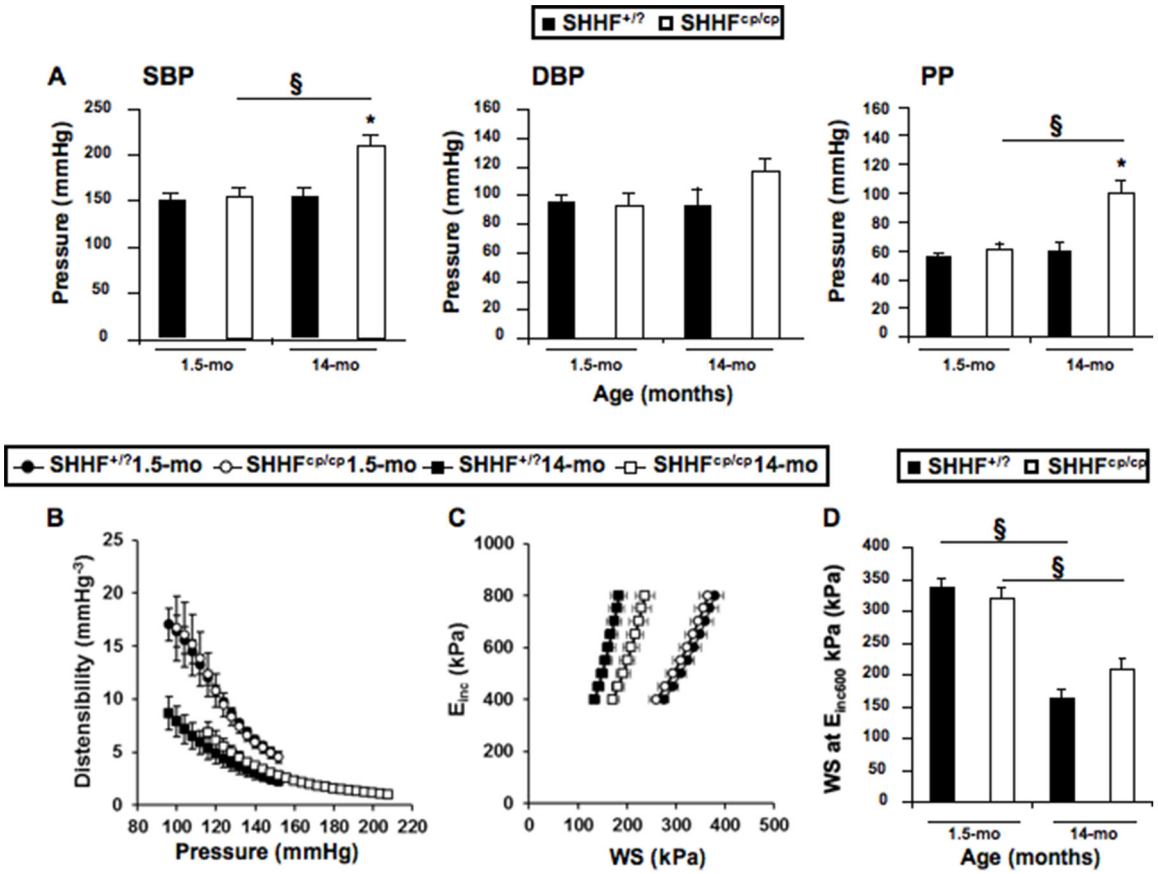


Figure 4. Hemodynamic phenotyping. Invasive blood pressure measurements were obtained on anesthetized rats during vascular phenotyping of the animals. **A**- Systolic (SBP), Diastolic (DBP) Blood Pressures and Pulse Pressure (PP) were measured at both the earliest and latest ages. Results showed that over time only SHHF$^{cp/cp}$ rats increased their SBP and PP becoming significantly higher at 14 months of age compared to SHHF$^{+/?}$ animals. **B**- Distensibility, **C**- Incremental Elastic modulus (E_{inc}) to Wall Stress (WS) curves and **D**- WS at Einc 600 kPa were recorded. Values are mean ± sem of 5 to 14 measurements depending on the genotype and age. Fisher's LSD Multiple-Comparison Test * $p<0.05$ for comparing of SHHF$^{cp/cp}$ *vs.* SHHF$^{+/?}$ rats at the same age; § $p<0.05$ for comparison of 14 month-old *vs.* 1.5-month-old rats of the same genotype.
doi:10.1371/journal.pone.0096452.g004

other diabetogenic modifier genes present in the background of other strains [28]. Of note, SHHF$^{cp/cp}$ rats did not reach end-stage renal disease causing the reduction of urine volume by the time our protocol ended i.e. at 14 months of age. It is noteworthy that, like dyslipidemia, alterations in the kidney function have been described as risk factors favoring the development of HF, rendering the SHHF strain an adequate model to study the implication of MetS in the decline of the cardiac function. While the discrepancies regarding the diabetic status of SHHF rats requires further analysis, the combination of hyperlipidemia and a pre-hypertensive state as early as 1.5-months of age in the SHHF$^{cp/cp}$ rats nevertheless demonstrates two critical hallmarks of MetS. By 5 months of age the obesity was established in SHHF$^{cp/cp}$ determining the onset of the MetS only in this genotype.

The concurrent comparison of cardiac remodeling between the SHHF$^{+/?}$ and SHHF$^{cp/cp}$ groups of rats allowed us to confirm data from previous reports [15,20,21] and extend further the knowledge about the consequences of metabolic disorders on the heart.

At 1.5 months of age, the echocardiographic phenotyping could not distinguish the two rat strains but the simultaneous evaluation of cardiac function in both SHHF$^{+/?}$ and SHHF$^{cp/cp}$ rats during aging indicated that animals differ by the type of cardiac remodeling they develop. The left ventricular wall remodeling is hypertrophic in both groups but is eccentric in SHHF$^{cp/cp}$ while it is concentric in SHHF$^{+/?}$ rats at 14 months of age. Indeed the LV diastolic diameter is greater in SHHF$^{cp/cp}$ rats from 6 months to 14 months of age when the LV internal cavity expands dramatically. Together with the differential modulation of E and A velocity waves between the genotypes over time, cardiac remodeling observed in the SHHF$^{cp/cp}$ group is characteristic of cardiac diastolic dysfunction.

The premature sudden deaths observed during the phenotyping of the SHHF$^{cp/cp}$ group (4 deaths out of 9 SHHF$^{cp/cp}$ rats involved in the follow-up protocol) precluded the observation of a fully declined systolic function at 14 months of age. However, the systolic function evaluation throughout the follow-up of ejection and shortening fractions indicated that those parameters were significantly lower in SHHF$^{cp/cp}$ than in SHHF$^{+/?}$ rats. Moreover, this difference increased significantly after 6 months of SHHF$^{cp/cp}$ rat survival, reflecting the onset of a cardiac decompensation state. By 14 months, SHHF$^{cp/cp}$ animals exhibited dilation of their LV, concomitantly with depletion of the walls and a drop in EF and FS values. Unlike previous reports [13,18], we did not observe any congestion in the heart of SHHF$^{cp/cp}$ animals, neither during the compensatory cardiac remodeling phase (before 6 months) nor during the decompensate phase (after 6 months of age). However, a massive congestion was observed in 22 month-old lean SHHF

Table 4. Mechanical properties of the carotid artery.

Genotype	$SHHF^{+/?}$	$SHHF^{cp/cp}$	$SHHF^{+/?}$	$SHHF^{cp/cp}$		ANOVA	
Parameters							
Age, month	**1.5**	**1.5**	**14**	**14**	**Genotype**	**Age**	**Interaction**
N	14	12	7	5			
Diameter, mm							
Diastolic	0.78±0.02	0.80±0.05	083±0.05	0.96±0.04[§]	ns	0.03	ns
Systolic	1.01±0.02	0.99±0.05	1.01±0.03	1.13±0.05	ns	ns	ns
Mean Blood Pressure, mmHg	113±5	113±8	114±13	150±9	0.046	0.045	0.047
Values at the MBP							
Diameter, mm	0.88±0.03	0.88±0.05	0.92±0.04	1.05±0.04[§]	ns	0.046	ns
Compliance, $mm^2/mmHg^{-1}.10^3$	5.88±0.29	4.15±0.26[*]	4.45±0.53[§]	2.79±0.40[*§]	0.0002	0.002	ns
Distensibility, $mm.Hg^{-3}$	9.98±0.71	7.33±0.73[*]	7.25±1.26[§]	2.95±0.38[*§]	0.002	0.002	ns
Einc, kPa	388±58	577±110	421±125	1004±133[*]	0.002	0.049	0.08
WS, kPa	234±28	245±40	142±26	242±35	ns	ns	ns
MCSA, mm^2	0.084±0.013	0.087±0.019	0.149±0.014[§]	0.132±0.060[§]	ns	<0.00001	ns

MBP, Mean Blood Pressure; **Einc**, Incremental Elastic-modulus; **WS**, Wall Stress; **MCSA**, Mean Cross Sectional Area. Values are mean ± sem. Non-parametric ANOVAs analysis with two factors allowed the evaluation of interaction between aging and genotype. Fisher's LSD Multiple-Comparison Test * $p<0.05$ to compare $SHHF^{cp/cp}$ *vs.* $SHHF^{+/?}$ at the same age; § $p<0.05$ to compare of 14 month-old vs. 1.5-month-old rats of the same genotype; **N** stands for the number of rats; **ns** stands for not significant.

doi:10.1371/journal.pone.0096452.t004

Table 5. Blood pressure follow-up in conscious SHHF rats.

Genotype	$SHHF^{+/?}$				$SHHF^{cp/cp}$				ANOVA		
Age, month	**2.5**	**5**	**13**	**14**	**2.5**	**5**	**13**	**14**	**Genotype**	**Age**	**Interaction**
N	8	8	7	7	9	9	6	5			
SBP, mmHg	176±4	182±12	187±6	195±8	150±8	163±14	182±7	207±9	ns	<0.0001	ns
HR, bpm	397±5	383±12	466±13	460±6	368±10*	390±6	401±20*	412±18*	<0.0001	<0.0001	0.0020

SBP, Systolic Blood Pressure; **HR**, Heart Rate; **bpm**, beats per minute. Values are mean ± sem. Non-parametric ANOVAs analysis with two factors allowed the evaluation of interaction between aging and genotype. **N** stands for the number of rats; **ns** stands for not significant. Student's T test * $p<0.05$ to compare $SHHF^{cp/cp}$ *vs.* $SHHF^{+/?}$ at same age.

doi:10.1371/journal.pone.0096452.t005

rats from an unrelated series of animals (not shown). Altogether our results show that SHHF rat strains exhibit rather specific features stressing the importance and relevance of studying the signaling pathways specifically stimulated or muted during the development of heart failure phenotype associated with each etiology.

Arterial stiffening resulting from metabolic injury or natural aging is a mechanism that might accelerate cardiac remodeling [29,30]. The deleterious implication of the metabolic disorders in altering hemodynamic parameters was also suggested in other experimental models. Among others, Sloboda et al [31] demonstrated that in old obese Zucker rats had elevated plasma free fatty acid levels alter arterial stiffness was a result of endothelial dysfunction and higher systolic arterial pressure. Based on those data, it is conceivable that the early increase in FFA observed in $SHHF^{cp/cp}$ rats might participate in the impairment of carotid distensibility and compliance in these animals while no difference in the echocardiographic parameters could yet be detected. $SHHF^{cp/cp}$ rats exhibited higher FFA than that of $SHHF^{+/?}$ counterparts but also developed higher blood pressure overtime. For the first time, we evaluated the mechanical properties of the carotid artery in $SHHF^{cp/cp}$ as compared with $SHHF^{+/?}$ rats when only few metabolic disorders were established (1.5 month), and during the decline of cardiac function (14 months of age). Altogether, the significant alteration of carotid distensibility observed in $SHHF^{cp/cp}$ rats suggested that dyslipidemia together with hypertension conjointly affected the mechanical properties of the arteries as early as 1.5 months of age.

While our findings were obtained from a longitudinal study design, they are based on a relatively small sample size that did not allow the sacrifice of animals at intermediary time points. However, the $SHHF^{cp/cp}$ rats still alive at 14 months of age certainly showed the less severe symptomatology as compared to the rats which died prematurely. This probably introduced a bias in our data analysis by minimizing the significance of the differences observed between the $SHHF^{+/?}$ and $SHHF^{cp/cp}$ groups.

As it is not yet clear whether diastolic heart failure progresses towards systolic heart failure or if both, diastolic and systolic dysfunctions are two distinct manifestations of the large clinical spectrum of this disease, there is a clear interest for experimental models such as the SHHF rat. Because alterations of the filling and of the contraction of the myocardium were observed in the SHHF rats, a further refined comparison of the myocardial signal pathways between obese and lean could help discriminating the common physiopathological mechanisms from the specific ones. The echographic manifestation of telediastolic elevation of left ventricular pressure (lower IVRT and increase of E/e' ratio) reflects the altered balance between the preload and afterload of the heart, which are a paraclinical early signs of congestion. These measurements and evaluation are routinely performed during the follow-up of HF human patients.

Several clinical manifestations described in congestive heart failure patients were not observed in the $SHHF^{cp/cp}$ rats but it is likely that the massive obesity in these animals modified profoundly their appearance that might have hidden the manifestation of oedema. Nevertheless, the hyperaldosteronism is in favour of the development of hydrosodic retention in this experimental model. A phenotypic evaluation of older rats might have allowed the observations of fully developed congestive heart failure as it has been reported by others, knowing that congestion is one of the latest clinical phenotypes appearing in humans. The high levels of hormone secretions such as aldosterone are known also in humans to affect the myocardium by causing at least

fibrotic remodelling over the long term. The hyperaldosteronism developed by the SHHF rats makes this model appropriate to study the influence of the renin angiotensin aldosterone system on heart failure progression.

Furthermore, the SHHF$^{cp/cp}$ rat allows the study of comorbid conditions like renal dysfunction, insulin resistance, obesity, dyslipidaemia, hypertension that have been pinpointed as major determinants of outcomes in patients with HF. The apparent conflicting results demonstrating that unlike Zucker and Koletsky rats, obese SHHF$^{cp/cp}$ rats develop elevated serum adiponectin levels, which might in fact reinforce the pathophysiological pertinence of this latter strain from a cardiovascular point of view. Recent studies in human have described that in contrast with patients « solely » at risk of cardiovascular disease, circulating adiponectin levels are increased in patients with chronic heart failure, and this finding is associated with adverse outcomes [32]. Furthermore a concept has emerged of functional skeletal muscle adiponectin resistance that has been suggested to explain the compensatory elevated adiponectin levels observed in chronic heart failure [33]. Contrary to Zucker and Kolestky rats which develop mainly hypertension-induced heart dysfunction rather than heart failure, SHHF rats have the advantage to develop spontaneously HF with elevated serum adiponectin levels. Although a more detailed comparison of all these animal models is required, SHHF strains seem more appropriate to study HF than the other strains as they better mimic the human heart failure condition.

Altogether, our results reinforce and complete those obtained by others that conclude on the pertinence of the SHHF rat model in studying the impact of MetS on HF [13,15,24,34,35,36]. The SHHF model is an instrumental model to address those issues first, because the metabolic alterations appear in the animals at a very early stage (1.5 months of age); second, because all the rats develop cardiac remodeling, and third, because the severity of the cardiac phenotypes mirror the worsening of metabolic parameters. Importantly, and unlike other animal disease models developing a MetS *per se* (Obese prone rat, SHROB for example) the SHHF strain does develop HF spontaneously [24]. Even though some other strains like the ZSF1 strain [37] could be interesting to study cardiovascular complications of MetS, they develop such dramatic renal injury that the animals die from kidney failure or urinary track pathologies before the establishment of HF features. This is a clear advantage of the SHHF strain over others for studying the biological mechanisms underlying the progression from MetS-induced metabolic disorders to cardiac remodeling.

Here we describe several non-mutually exclusive physiological alterations (dyslipidemia, obesity, renal dysfunction, hypertension, arterial stiffness) that individually, but concomitantly, participate to the adverse cardiac effects of MetS. Since these alterations are established long before their cardiac consequences are detectable in SHHF$^{cp/cp}$ rats, the first trimester of the rat's life appears as an optimal time window for evaluating preventive treatment strategies in these animals.

As suggested in the present study, the pathological molecular programming of cardiac and vascular remodeling had to occur before the detection of their consequences on the phenotypes. An early intervention on MetS-associated disorders may have the potential to prevent, delay or mitigate the renal and vascular alterations as well as cardiac remodeling that appear later.

Acknowledgments

The authors wish to thank Dr H. Kempf, Pr L. Monassier, Pr S. Thornton, A-L. Leblanc, D. Meng, and Z. Lamiral for their helpful discussions and technical help during the completion of the study.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AP FZ FJ PL. Performed the experiments: GY AO C. L'Huillier LT ST RMRG DB AP. Analyzed the data: GY AO C. L'Huillier C. Labat RF FZ PL AP. Wrote the paper: AP PL FJ LV GY.

References

1. Lazzarini V, Mentz RJ, Fiuzat M, Metra M, O'Connor CM (2013) Heart failure in elderly patients: distinctive features and unresolved issues. Eur J Heart Fail.
2. Aroor AR, Madavia CH, Sowers JR (2012) Insulin resistance and heart failure: molecular mechanisms. Heart Fail Clin 8: 609–617.
3. Bui AL, Horwich TB, Fonarow GC (2011) Epidemiology and risk profile of heart failure. Nat Rev Cardiol 8: 30–41.
4. De Pergola G, Nardecchia A, Giagulli VA, Triggiani V, Guastamacchia E, et al. (2013) Obesity and Heart Failure. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.
5. Ebong IA, Goff DC Jr, Rodriguez CJ, Chen H, Bluemke DA, et al. (2013) The relationship between measures of obesity and incident heart failure: The multi-ethnic study of atherosclerosis. Obesity (Silver Spring).
6. Bountiouskos M, Schinkel A, BAx J, Lampropoulos S, Poldermans D (2006) The impact of hypertension on systolic and diastolic left ventricular function. A tissue Doppler echocardiographic study. American Heart Journal 151.
7. Ingelsson E, Arnlov J, Sundstrom J, Zethelius B, Vessby B, et al. (2005) Novel metabolic risk factors for heart failure. J Am Coll Cardiol 46: 2054–2060.
8. Aspelund T, Gudnason V, Magnusdottir BT, Andersen K, Sigurdsson G, et al. (2010) Analysing the large decline in coronary heart disease mortality in the Icelandic population aged 25–74 between the years 1981 and 2006. PLoS One 5: e13957.
9. Horwich TB, Fonarow GC (2010) Glucose, obesity, metabolic syndrome, and diabetes relevance to incidence of heart failure. J Am Coll Cardiol 55: 283–293.
10. Simpson CR, Buckley BS, McLernon DJ, Sheikh A, Murphy A, et al. (2011) Five-year prognosis in an incident cohort of people presenting with acute myocardial infarction. PLoS One 6: e26573.
11. Ardehali H, Sabbah HN, Burke MA, Sarma S, Liu PP, et al. (2012) Targeting myocardial substrate metabolism in heart failure: potential for new therapies. Eur J Heart Fail 14: 120–129.
12. Altschuld RA, Holycross BJ, Radin MJ, McCune SA (2003) The failing SHHF Rat heart. Cardiac remodeling and failure: 67–75.
13. McCune SA, Baker PB, Stills Jr HF (1990) SHHF/Mcc-cp Rat: Model of obesity, Non-insulin-dependant Diabetes, and Congestive Heart Failure. ILAR News 32: 23–27.
14. Greenhouse DD, Michaelis IV OE, McCune SA (1990) Development of corpulent rat strains. Frontiers in diabetes research Lessons from animal diabetes III VIII: 375–377.
15. Heyen JR, Blasi ER, Nikula K, Rocha R, Daust HA, et al. (2002) Structural, functional, and molecular characterization of the SHHF model of heart failure. Am J Physiol Heart Circ Physiol 283: H1775–1784.
16. Hoversland RC (1992) Onset of obesity and puberty in genetically obese SHHF/Mcc-cp rats. Int J Obes Relat Metab Disord 16: 977–984.
17. McCune SA, Jenkins JE, Stills Jr HJ, Park S, Radin MJ, et al. (1990) Renal and heart functions in the SHHF/Mcc-cp rat. Frontiers in diabetes research Lessons from animal diabetes III VIII.6.: 397–401.
18. McCune SA, Radin MJ, Jenkins JE, CHU Y-Y, Park S, et al. (1995) SHHF/Mcc-facp rat model: effects of gender and genotype on age of expression of metabolic complications and congestive heart failure and on response to drug therapy. Leesons from animal diabetes: 255–270.
19. Meier DA, Hennes MM, McCune SA, Kissebah AH (1995) Effects of obesity and gender on insulin receptor expression in liver of SHHF/Mcc-FAcp rats. Obes Res 3: 465–470.
20. Haas GJ, McCune SA, Brown DM, Cody RJ (1995) Echocardiographic characterization of left ventricular adaptation in a genetically determined heart failure rat model. Am Heart J 130: 806–811.
21. Reffelmann T, Kloner RA (2003) Transthoracic echocardiography in rats. Evalution of commonly used indices of left ventricular dimensions, contractile performance, and hypertrophy in a genetic model of hypertrophic heart failure (SHHF-Mcc-facp-Rats) in comparison with Wistar rats during aging. Basic Res Cardiol 98: 275–284.
22. Radin MJ, Jenkins JE, McCune SA, Jurin RR, Hamlin RL (1992) Effects of enalapril and clonidine on glomerular structure, function, and atrial natriuretic peptide receptors in SHHF/Mcc-cp rats. J Cardiovasc Pharmacol 19: 464–472.
23. Lacolley P, Labat C, Pujol A, Delcayre C, Benetos A, et al. (2002) Increased carotid wall elastic modulus and fibronectin in aldosterone-salt-treated rats: effects of eplerenone. Circulation 106: 2848–2853.

24. Fellmann L, Nascimento AR, Tibirica E, Bousquet P (2012) Murine models for pharmacological studies of the metabolic syndrome. Pharmacol Ther 137: 331–340.
25. Caprio M, Antelmi A, Chetrite G, Muscat A, Mammi C, et al. (2011) Antiadipogenic effects of the mineralocorticoid receptor antagonist drospirenone: potential implications for the treatment of metabolic syndrome. Endocrinology 152: 113–125.
26. Caprio M, Feve B, Claes A, Viengchareun S, Lombes M, et al. (2007) Pivotal role of the mineralocorticoid receptor in corticosteroid-induced adipogenesis. FASEB J 21: 2185–2194.
27. Kim SH, Chu YK, Kwon OW, McCune SA, Davidorf FH (1998) Morphologic studies of the retina in a new diabetic model; SHR/N:Mcc-cp rat. Yonsei Med J 39: 453–462.
28. Friedman JE, Ferrara CM, Aulak KS, Hatzoglou M, McCune SA, et al. (1997) Exercise training down-regulates ob gene expression in the genetically obese SHHF/Mcc-fa(cp) rat. Horm Metab Res 29: 214–219.
29. Benetos A, Waeber B, Izzo J, Mitchell G, Resnick L, et al. (2002) Influence of age, risk factors, and cardiovascular and renal disease on arterial stiffness: clinical applications. Am J Hypertens 15: 1101–1108.
30. Marti CN, Gheorghiade M, Kalogeropoulos AP, Georgiopoulou VV, Quyyumi AA, et al. (2012) Endothelial dysfunction, arterial stiffness, and heart failure. J Am Coll Cardiol 60: 1455–1469.
31. Sloboda N, Feve B, Thornton SN, Nzietchueng R, Regnault V, et al. (2012) Fatty acids impair endothelium-dependent vasorelaxation: a link between obesity and arterial stiffness in very old Zucker rats. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 67: 927–938.
32. Masson S, Gori F, Latini R, Milani V, Flyvbjerg A, et al (2011) Adiponectin in chronic heart failure: influence of diabetes and genetic variants. Eur J Clin Invest. 41: 1330–8.
33. Van Berendoncks AM, Conraads VM (2011) Functional adiponectin resistance and exercise intolerance in heart failure. Curr Heart Fail Rep. 8: 113–22.
34. Holycross BJ, Summers BM, Dunn RB, McCune SA (1997) Plasma renin activity in heart failure-prone SHHF/Mcc-facp rats. Am J Physiol 273: H228–233.
35. Przybylski R, McCune S, Hollis B, Simpson RU (2010) Vitamin D deficiency in the spontaneously hypertensive heart failure [SHHF] prone rat. Nutr Metab Cardiovasc Dis 20: 641–646.
36. Radin MJ, Holycross BJ, Hoepf TM, McCune SA (2003) Increased salt sensitivity secondary to leptin resistance in SHHF rats is mediated by endothelin. Mol Cell Biochem 242: 57–63.
37. Griffin KA, Abu-Naser M, Abu-Amarah I, Picken M, Williamson GA, et al. (2007) Dynamic blood pressure load and nephropathy in the ZSF1 (fa/fa cp) model of type 2 diabetes. Am J Physiol Renal Physiol 293: F1605–1613.

En résumé, cette première étude nous a ainsi permis de mettre en évidence :

(i) Dès l'âge de 1.5 mois d'âge chez les rats SHHF$^{cp/cp}$:

- le développement d'une pré-HTA comparable à celle des SHHF$^{+/?}$
- l'apparition des premières composantes du SMet, à savoir une dyslipidémie et une insulino-résistance, ainsi qu'un hyperaldostéronisme associé à une diminution du ratio Na^+/K^+ urinaire,
- les premières altérations de leurs fonctions rénales mises en évidence par une polyurie associée à une polydipsie et une hypertrophie des reins,
- une altération des propriétés mécaniques artérielles observée par une moindre compliance et distensibilité vasculaire mesurées par echotracking.

(ii) À l'âge de 3 mois, chez les rats SHHF$^{cp/cp}$:

- l'apparition des premiers signes de surpoids annonciateurs d'une obésité se confirmant plus tard et complétant ainsi à cet âge le tableau « clinique » d'un SMet,
- une HTA sévère similaire à celle développée chez les SHHF$^{+/+}$.

(iii) À l'âge de 6 mois, chez ces mêmes rats :

- l'existence de modifications structurelles et fonctionnelles cardiaques décelables par échocardiographie et caractérisées par une hypertrophie et une dilatation du VG associées à une fibrose myocardique significative, une fraction de raccourcissement et d'éjection plus basses que les contrôles SHHF$^{+/+}$,
- un maintien de la polyurie et l'apparition d'une protéinurie témoignant de l'aggravation du phénotype rénal

(iv) À l'âge de 14 mois, les rats SHHF$^{cp/cp}$ présentent :

- une obésité sévère associée à une hypertrophie des adipocytes et une fibrose du TA viscéral
- une stéatose hépatique
- une dyslipidémie
- une insulino-résistance sévère

- une altération importante du phénotype rénal : polyurie, polydipsie, protéinurie, hypertrophie glomérulaire, hypertrophie rénale et diminution du débit de filtration
- une HTA sévère : augmentation de la PA, et de la pression pulsée : PP
- une altération des propriétés mécaniques vasculaires : augmentation du module élastique incrémental, diminution de la distensibilité et de la compliance vasculaire
- Une aggravation du phénotype cardiaque : augmentation de l'hypertrophie, de la dilatation et de la fibrose cardiaque, diminution des fractions d'éjection et de raccourcissement

Il est important de noter qu'au cours de notre étude, nous n'avons pas été en mesure de relever la présence de DT2 ou d'hyperglycémie à jeun chez les rats SHHF$^{cp/cp}$, un résultat en contradiction avec les données de la littérature qui décrivent la souche SHHF comme modèle de diabète non-insulino-dépendant [242]. En revanche le phénotype d'insulino-résistance et d'hyperinsulinémie est mis en évidence et s'installe de façon très précoce chez les SHHF$^{cp/cp}$, dès l'âge de 1.5 mois. Ces paramètres s'intensifiant avec l'âge des animaux. Cette discordance avec la littérature peut provenir d'une dérive possible de la souche au fur et à mesure des croisements ou l'insertion d'une nouvelle mutation spontanée ayant pour finalité la correction des mécanismes de régulation du glucose

L'absence du phénotype de DT2 ne remet pas en cause la validité de la souche SHHF en tant que modèle de SMet car selon sa dernière définition dictée par l'IDF, le critère principal inclut la présence d'une obésité à laquelle peuvent s'ajouter deux autres constituants du SMet. Ainsi, dans notre contexte, les SHHF$^{cp/cp}$ présentent déjà 4 critères parmi les 5 du SMet.

Bilan :

Dans leur ensemble, les résultats de cette étude pilote caractérisant le phénotype métabolique, rénal, cardiaque et vasculaire de manière longitudinale et simultanée chez les animaux SHHF$^{+/?}$ et SHHF$^{cp/cp}$, nous ont permis de confirmer la pertinence du choix de ce modèle d'étude pour les pathologies étudiées. Nous avons pu également retracer l'historique d'installation des composantes du SMet et les premières souffrances cardiaques

pour ainsi déterminer la fenêtre optimale d'intervention thérapeutique à 1.5 mois d'âge pour un traitement préventif de l'IC. (**Figure 38**)

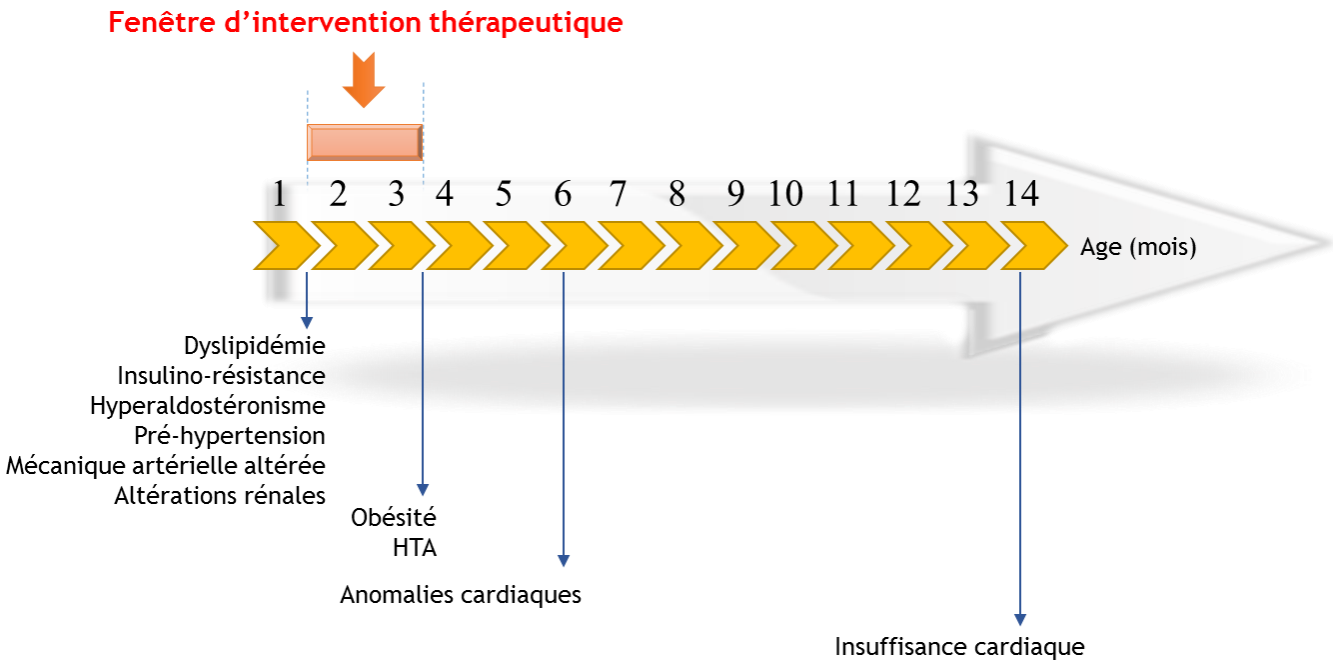


Figure 38 : Récapitulatif de l'historique d'installation des constituants du SMet et des altérations du phénotype cardiaque chez le rat SHHFcp/cp. HTA= hypertension artérielle.

Sur la base de ces données, nous avons mis en place l'étude N°2 dans laquelle nous avons évalué l'impact d'une monothérapie ARM précoce, initiée à 1.5 mois d'âge et s'appliquant au long cours jusqu'au développement de l'IC pour en étudier les effets sur le développement des composantes du SMet et son effet préventif subséquent sur l'IC.

ETUDE N°2

Etude N°2: « Mineralocorticoid receptor antagonism during metabolic syndrome development delays the progression towards heart failure ».

L'hyperaldostéronisme et l'hyperactivation du RM qui lui est associée participent aux processus pro-hypertrophiques, pro-inflammatoires et pro-fibrotiques dans le cœur amenant celui-ci à sa défaillance. Son hypersécrétion lors du développement du SMet suggère donc une prédisposition accrue au risque cardiovasculaire et à la progression vers l'IC. Ainsi, notre 2ème étude s'est intéressée à étudier l'effet potentiel que pouvait avoir un traitement ARM sur le SMet pour prévenir le développement subséquent de l'IC.

En se basant sur les données de l'Etude N°1, nous avons déterminé la fenêtre d'intervention thérapeutique et décidé du protocole opératoire de l'étude N°2. Des rats SHHF$^{cp/cp}$ et leurs contrôles SHHF$^{+/+}$ ont été traités avec un ARM le plus sélectif connu, l'Eplérénone, à la dose de 100 mg/kg/jr ou le placébo. Dès l'âge de 1,5 mois, et ce jusqu'à l'âge de 12,5 mois suivant un mode opératoire standardisé (**Figure 39**) au cours duquel les paramètres métaboliques (M), cardiaques (C) vasculaires (V), de pression artérielle (P) des animaux ont été régulièrement étudiés. En parallèle, des examens histologiques post-mortem ont été réalisés sur le tissu cardiaque et le TA viscéral péri-rénal de tous les animaux (**Figure 39**).

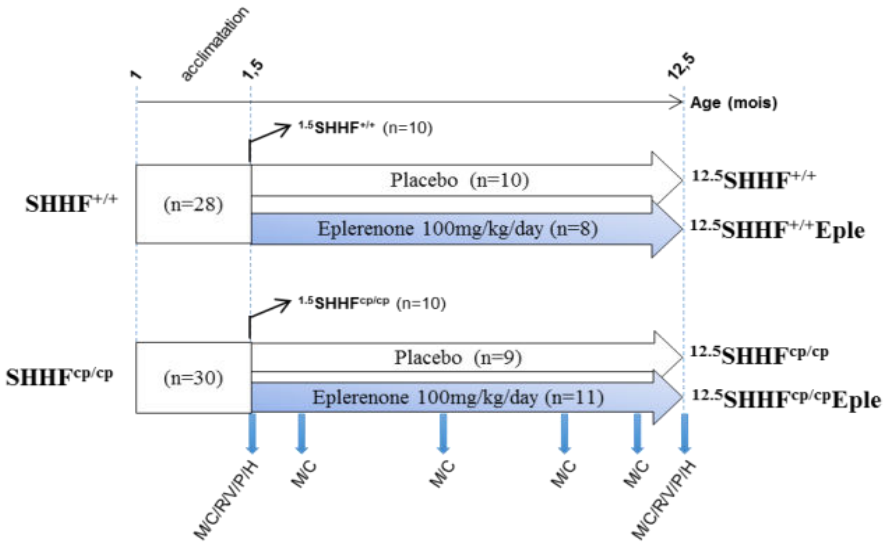


Figure 39 : Mode opératoire mis en œuvre dans l'étude N°2 correspondant à l'évaluation de la prévention de l'IC dans un contexte de SMet par antagonisation du RM chez les rats SHHF.

Au cours de ce protocole nous avons choisis d'administrer l'Eplérénone à la dose de 100 mg/kg/jr. Cette dose est très élevée par rapport aux doses administrées chez l'Humain mais représente la dose validée chez le rat et montrée avoir des effets sur le phénotype cardiovasculaire [250, 251]. Par ailleurs, nous avons choisi également le mode d'administration oral en dissolvant l'Eplérénone dans l'eau de boisson compte tenu de la longue durée du traitement thérapeutique (11 mois). Une administration par gavage par exemple n'aurait éthiquement pas été convenable du fait de l'agression des voies digestive lors de l'injection de la dose. De même l'administration par libération du traitement par mini-pompe n'aurait pas été réalisable du fait de la faible solubilité de l'Eplérénone, nous n'aurions pas eu la garantie d'une libération optimale du principe actif en sous-dermique. Nous avions en revanche envisagé l'administration de l'Eplérénone par son inclusion dans les aliments. Cependant, ce procédé de préparation étant très coûteux et demandant des préparations régulières pour s'adapter à la consommation alimentaire des rats $SHHF^{cp/cp}$ particulièrement hyperphages. De plus, la préparation des paillettes de croquettes incluant l'Eplérénone implique une perte importante de ce principe actif précieux lors de la préparation. Ainsi, la solution la plus adéquate d'un point de vue pratique et coût était de préparer de manière hebdomadaire instantanément la solution d'Eplérénone dans l'eau de boisson en l'adaptant à la consommation hydrique moyenne et au poids moyenne des rats $SHHF^{+/+}$ et $SHHF^{cp/cp}$. Les animaux du groupe placebo ont reçu l'eau de boisson sans le principe actif à savoir l'Eplérénone.

Afin de s'assurer que le mode d'administration de notre produit pharmacologique est efficace, nous avons évalué les taux d'aldostérone urinaire qui sont normalement montrés augmenté lors de l'antagonisation du RM [252]. Nos résultats montrent que les taux d'aldostéronurie sont significativement augmentés dans les groupes des rats ayant reçus l'Eplérénone comparés à ceux ne l'ayant pas reçus validant ainsi l'efficacité d'administration.

American Heart Association.
Hypertension
Manuscript Submission and Peer Review System

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

URL: http://hype-submit.aha-journals.org

Title: Mineralocorticoid receptor antagonism during Metabolic Syndrome development delays the progression towards Heart Failure

Manuscript number: HYPE201404655

Author(s): Anne Pizard, INSERM U1116
Gina Youcef, UMR872
Arnaud Olivier, Nancy University Hospital
Clément L'Huillier, INSERM U1116
Carlos Labat, INSERM, U116
Renaud Fay, INSERM, Centre d'Investigation Clinique CIC-P 9501, Nancy, F-54000 France
Arnaud Bianchi, UMR 7365 CNRS
Rosa-Maria Rodriguez-Guéant, Nancy University Hospital
Frédéric Jaisser, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France

For Hypertension Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

Faiez Zannad, Inserm, Université de Lorraine and CHU

Laurent Vallar, Genomics Research Unit, CRP-Santé Luxembourg

For Hypertension Peer Review. Do not distribute.
Destroy after use.

Mineralocorticoid receptor antagonism during Metabolic Syndrome development delays the progression towards Heart Failure

Running title: *MR antagonism in obesity delays HF*

Gina Youcef[1,2,3,4], Arnaud Olivier[1,2,3,5,6], Clément P.J. L'Huillier[1,2,3], Carlos Labat[1,2,3], Renaud Fay[5,6], Arnaud Bianchi[2,3,7], Rosa-Maria Rodriguez-Guéant [2,3,5,8], Frédéric Jaisser[5,6], Faiez Zannad[1,2,3,5,6], Laurent Vallar[4], and Anne Pizard[1,2,3,6]

[1] UMRS U1116 Inserm, Nancy, France.

[2] Fédération de Recherche 3209, Nancy, France.

[3] Université de Lorraine, Nancy, France.

[4] Genomics Research Unit, Centre de Recherche Public de la Santé, Luxembourg.

[5] CHU Nancy, Nancy, France.

[6] CIC 1433, Pierre Drouin, Nancy, France.

[7] UMR 7365 CNRS, Nancy, France.

[8] U954 Inserm, Nancy, France.

Hypertension Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

Corresponding author:
Dr A. Pizard
Email: anne.pizard @inserm.fr

Abstract

An excessive production of Mineralocorticoid Receptor (MR) ligand has been reported in metabolic syndrome (MetS), a condition known to accelerate the progression towards heart failure (HF). Because MR Antagonists (MRA) are beneficial to HF patients, we hypothesized that a preventive use of MRA to target MetS features may delay the onset of HF. Young hypertensive non-dyslipidemic $SHHF^{+/+}$ and hypertensive dyslipidemic obese $SHHF^{cp/cp}$ male rats were given or not MRA (eple, 100 mg/kg/day) during 11 months. Regular metabolic and cardiovascular monitoring demonstrated that MRA treatment reduced i) body weight gain ($SHHF^{cp/cp}$eple=718±20 *vs.* $SHHF^{cp/cp}$=787±19g, p<0.001), ii) triglycerides ($SHHF^{cp/cp}$eple=20.5±2.6 vs. $SHHF^{cp/cp}$=8.3±1.9g/L, p<0.001) and total cholesterol levels ($SHHF^{cp/cp}$eple=2.7±0.2 *vs.* $SHHF^{cp/cp}$=4.2±0.3 g/L, p< 0.001) as well as it increased adiponectin levels ($SHHF^{cp/cp}$eple=23±2 *vs.* $SHHF^{cp/cp}$=12±1 µg/mL, p< 0.001) in $SHHF^{cp/cp}$eple group. Furthermore and without pressor effects, Eple improved diastolic and systolic function of $SHHF^{cp/cp}$eple rats by lowering LV end diastolic diameter ($SHHF^{cp/cp}$eple=9.9±0.14 *vs.* $SHHF^{cp/cp}$=11.4±0.2 mm, p<0.001), LV mass ($SHHF^{cp/cp}$eple=1760±72 *vs.* $SHHF^{cp/cp}$=2195±73 mg p< 0.001) and E/A ratio ($SHHF^{cp/cp}$eple=1.7±0.1 *vs.* $SHHF^{cp/cp}$=3.0±0.3, p<0.002) together with preserving ejection fraction ($SHHF^{cp/cp}$eple=70±1 *vs.* $SHHF^{cp/cp}$=59±1 %, p<0.001), and improving survival as compared to untreated $SHHF^{cp/cp}$ rats.

Because of the suggested MR excessive activation during MetS and HF, our results propose that the use of MRA in human MetS patients might represent a promising therapeutic strategy for the prevention of cardiac diseases.

Key Words: aldosterone, metabolic syndrome, heart failure, mineralocorticoid receptor antagonism, prevention

For Hypertension Peer Review Do not distribute Destroy after use

Introduction:

More than 23 million patients are diagnosed with HF in the world [1]. The current financial burden to public health of this heterogeneous syndrome is heavy and will become heavier because of the ageing of the population and of the increased prevalence of the different underlying pathophysiologic mechanisms that precipitate individuals towards fully developed HF phenotypes.

Among those aggravating mechanisms, also referred as HF modifier conditions, [2] inappropriate neuroendocrine stimulations are recognized to contribute to the development of HF symptoms. Pathological activation of the renin-angiotensin-aldosterone (RAAS) system has been extensively studied in HF. This resulted in the development of several pharmacological strategies aimed to inhibit the unbalanced RAAS signaling pathways. These strategies have been proven to alleviate HF symptoms. The addition of mineralocorticoid receptor (MR) antagonists (MRA) to standard care clearly reduces mortality of the HF patient [3, 4]. Although initially thought to mainly regulate body fluid volumes *via* its interaction with the renal MR, extra-renal pathophysiological effects of its ligands, namely Aldosterone (Aldo) and glucocorticoids was supported by the finding of MR expression in the myocardium of failing heart and in non-epithelial target tissues in experimental models [5]. In fact the MR excessive stimulation and Aldo increased concentration have been reported to participate in the development of hypertension, inflammation and insulin resistance (IR). Furthermore, the identification of the MR expression in the adipocytes has recently suggested that its inappropriate activation might play a key role in the dysfunction of the adipocytes in the context of obesity [6-8]. Highly prevalent in HF patients these co-morbidities (obesity, dyslipidemia, IR, diabetes and hypertension), alone or in cluster (metabolic syndrome, MetS), participate to a greater deterioration of myocardial structure (remodeling) and function. Interestingly, increased Aldo concentrations have been also reported in MetS giving to the altered MR stimulation a pivotal role within the pathophysiologic continuum leading to the development of HF.[9]The well accepted role of excessive activation of the MR in diagnosed HF patients taken together with its recent implication in MetS development suggest that both HF and MetS syndromes share common aldosterone-mediated deleterious mechanisms.

For Hypertension Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

Altogether, clinical and experimental evidences raised MR as an interesting target for new therapeutic strategies aiming to prevent or delay the development of HF by targeting non-cardiac co-morbidities.

We hypothesized that a preventive effect on HF progression could be obtained by repositioning the use of MRA as mono-therapy from "diagnosed HF" as currently done to "at risk" individuals before any sign of cardiovascular dysfunction is detected.

The present study was therefore designed to investigate whether the use of MRA could improve and may be prevent one or more MetS features and subsequently participate in delaying or preventing the impairment of the cardiovascular function observed in HF. To this end, Spontaneously Hypertensive Heart Failure $^{cp/cp}$ rats (SHHF$^{cp/cp}$) known to develop cardiac phenotypes whose severity mirror the worsening of metabolic parameters [10] with a hyperaldosteronism were chronically exposed to MRA as mono-therapy (Eplerenone) from 1.5 to 12.5 months of age and compared to their lean hypertensive controls (SHHF$^{+/+}$). A follow-up phenotyping of the treated rats revealed that long-term administration of the MRA (11 months) impacted MetS features and participated in a delayed development of HF in SHHF$^{cp/cp}$ animals.

For Hypertension Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

Methods:

Methods are provided in the Methods in the online-only Data Supplement.

Study Design

The design of the current study is based on the extensive phenotyping of obese SHHF$^{cp/cp}$ rats in which MetS and hyperaldosteronism are associated with earlier onset of HF as compared to the lean SHHF$^{+/+}$ ones [10, 11]. To evaluate the impact of mineralocorticoid receptor activation during the development of MetS features -more especially obesity- and its implication into the transition towards HF, the animals of both genotypes were given the selective mineralocorticoid receptor antagonist, eplerenone (pure active molecule provided by *Pfizer*, Eple) from 1.5 month (Figure 1A). This time corresponds to the onset of metabolic disorders (dyslipidemia and obesity) and hypertension but at that time no sign

of cardiac dysfunction was observed. Eple treatment was provided in drinking water at a final concentration of 100 mg/kg/day. Note that the doses given to experimental model, especially rats, are often much higher than the doses that are prescribed to patients with HF. This is due to the differences in drug metabolism and efficacy of the compounds between species. The relevance of the chosen dosage for our investigation was supported by several reports [12-19]. Drug concentration was adjusted monthly based on regular monitoring of rats body weight and fluid intake.

To ease the description of the different experimental groups, from now on and throughout the manuscript the time (expressed in month) when the observations/dosages were performed will figure as an exponent before the strain SHHF (as an example: $^{1.5}$SHHF or $^{12.5}$SHHF referring to observations done at 1.5 and 12.5 months of age respectively), the genotype will be specified by an exponent after SHHF (as SHHF$^{+/+}$ or SHHF$^{cp/cp}$) and the treatment eplerenone "Eple" will follow. The absence of Eple means that the considered rats are part of a control placebo group.

Thirty SHHF$^{cp/cp}$ and twenty-eight SHHF$^{+/+}$ rats were randomly allocated in either the $^{1.5}$SHHF group (n=10 for each genotype) or in the long-term protocol for up to 11 months of follow-up (Figure 1A). From 1.5 months to 12.5 months of age, the regular monitoring of the metabolic and cardiovascular parameters of the rats of both genotypes receiving either Eple (SHHF$^{+/+}$Eple and SHHF$^{cp/cp}$Eple, n=8 and n=11 respectively) or placebo (SHHF$^{+/+}$ and SHHF$^{cp/cp}$, n=10 and n=9 respectively) allowed the comparison of their respective phenotypes at different time points. The end point of our study (month 12.5) was determined by the number of untreated SHHF$^{cp/cp}$ rats still alive that had to be sufficient to allow statistical comparison with the other groups of rats **(Figure 1B)**.

For Hypertension Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

Results

Long-term MR antagonism improved survival

A total of 38 SHHF rats of both genotypes were carefully monitored during 11 months in order to compare the impact of a long-term treatment with eple on the development of MetS and HF **(Figure 1A)**. The effect of treatment (Eple *vs.* placebo) on animals' survival from both genotypes ($SHHF^{cp/cp}$ *vs.* $SHHF^{+/+}$) was analyzed on a Kaplan-Meier representation (**Figure 1B**). Only 60% and 90% of the untreated $SHHF^{cp/cp}$ and $SHHF^{+/+}$rats respectively survived until the end of the study (at 12.5 months of age) while 100% of $SHHF^{cp/cp}$eple and $SHHF^{+/+}$eple rats completed the protocol.

Long-term MR antagonism reduced weight gain and improved obesity-related disorders in $SHHF^{cp/cp}$ rats

The assessment of body weight (BW) with age **(Figure 2A)** showed that $SHHF^{cp/cp}$ animals were significantly heavier as early as 1.5 months of age than the $SHHF^{+/+}$ group ($^{1.5}SHHF^{cp/cp}$ 154±10g *vs.* $^{1.5}SHHF^{+/+}$ =137±2 g, $p<0.001$) and became approximately 2 times heavier by 12 months of age ($^{12}SHHF^{cp/cp}$ = 787±17g *vs.* $^{12}SHHF^{+/+}$ = 456±14 g, $p<0.0001$). While long-term MR antagonism had no effect on $SHHF^{+/+}$Eple BW as compared to untreated group, Eple reduced the weight gain of $SHHF^{cp/cp}$Eple from 3 months of age ($^{3}SHHF^{cp/cp}$Eple= 393±9 g *vs.* $^{3}SHHF^{cp/cp}$= 446±10g, $p<0.001$) until 12 months old ($^{12}SHHF^{cp/cp}$Eple= 718±13g *vs.* $^{12}SHHF^{cp/cp}$= 787±17g, $p<0.05$) **(Figure 2A).** At 12.5 months of age, the BW of $SHHF^{cp/cp}$ animals decreased to value that was no longer significantly different for the $^{12.5}SHHF^{cp/cp}$ Eple one. This was observed without significant change on food and water intake either on the excreted urinary volume upon eplerenone treatment (data not shown).

The mean adipocyte cross sectional area was significantly larger in $^{12.5}SHHF^{cp/cp}$ than in $^{12.5}SHHF^{+/+}$ rats (**Figure2B left panels, Table S1**; $p<0.0001$; median [min-max] $^{12.5}SHHF^{cp/cp}$= 0.124 [0.006-0.660] mm^2 vs. $^{12.5}SHHF^{+/+}$=0.042[0.006-0.384] mm^2). The cell size distribution analysis demonstrated marked and significant reduction of adipocyte hypertrophy in the $^{12.5}SHHF^{cp/cp}$eple animals than in the untreated $^{12.5}SHHF^{cp/cp}$ control group (**Figure 2B bottom panels**; **Table S1**; median [min-max] $^{12.5}SHHF^{cp/cp}$eple=0.077 [0.008-0.573] mm^2 *vs.* $^{12.5}SHHF^{cp/cp}$=0.124 [0.006-0.660] mm^2). The

For Hypertension Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

modification of the visceral adipocyte cross sectional area by the long term MRA might participate in part in the reduced weight gain. The treatment had no impact on the enlargement of adipocyte size (**TableS1**) and on the cell size distribution (median [min-max] $^{12.5}$SHHF$^{+/+}$eple=0.042 [0.006-0.384] mm^2 *vs.* $^{12.5}$SHHF$^{+/+}$=0.040 [0.006-0.122] mm^2) of the adipocytes dissected from SHHF$^{+/+}$ animals.

Serum biochemical and hormonal dosages **(Table 1)** showed that $^{1.5}$SHHF$^{cp/cp}$ rats have significantly increased levels of total and HDL Cholesterol (hypercholesterolemia), triglycerides (TG, hypertriglyceridemia) and adiponectin when compared to $^{1.5}$SHHF$^{+/+}$ rats. SHHF$^{cp/cp}$ dyslipidemia worsened with ageing to reach at 12.5 months of age 5, 33 and 20 times higher levels of total cholesterol, TG, LDL respectively as compared to $^{12.5}$SHHF$^{+/+}$ animals. Similarly $^{12.5}$SHHF$^{cp/cp}$ insulin levels are increased by 4-fold as compared to $^{12.5}$SHHF$^{+/+}$ animals but fasting glycaemia remained unchanged by the genotype **(Table 1)**.

Whereas the MRA treatment had no significant effects on $^{12.5}$SHHF$^{+/+}$Eple serum lipid concentrations neither on glycaemia, and ionogram, eplerenone improved the dyslipidemia of $^{12.5}$SHHF$^{cp/cp}$Eple rats by dramatically reducing total cholesterol (-40%), TG (-60%) and LDL (-65%) concentrations as compared to $^{12.5}$SHHF$^{cp/cp}$ untreated counterparts (**Table 1**). Eple treatment had no significant effect on the $^{12.5}$SHHF$^{+/+}$Eple adiponectinemia, but it significantly increased the adiponectin concentration in the $^{12.5}$SHHF$^{cp/cp}$Eple rats as compared to their $^{12.5}$SHHF$^{cp/cp}$ controls ($p<0.001$) **(Table 1)**.

No significant differences were observed in BNP plasma levels depending on the genotype and the treatment of the animals. No significant change in serum potassium levels or in sodium potassium ratio were observed with eplerenone treatment, excluding any potential toxic effect on salt and water balance due to the long term use of a mineralocorticoid receptor antagonist **(Table 1)**.

Long-term Eple therapy had no influence on hemodynamic and vascular parameters

The central blood pressures (DBP, SBP) measured invasively on anesthetized $^{12.5}$SHHFeple and their untreated controls allowed the calculation of the mean blood pressure (MBP) and pulse pressure (PP). Together, those parameters demonstrated the presence of severe hypertension that is a characteristic feature of the SHHF strain. It was shown not dependent on the genotype and not influenced by the treatment **(Table 2)**. The follow-up of SBP on un-anesthetized animals also evidenced that absence of

For Hypertension Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

impact on SBP of the chronic treatment with Eple at any studied time point **(supplemental data, Table S2)**.

The Remodeling and mechanical properties of the carotid were evaluated on untreated and treated $^{12.5}$SHHF$^{+/+}$ and $^{12.5}$SHHF$^{cp/cp}$ animals. At 12.5 months of age the distensibility-pressure curve and the analysis of the compliance, Einc and wall stress values demonstrated that the intrinsic mechanical behavior of the arterial wall were not different between the four experimental groups (**Figure S1A-B, Table 2**).

Long-term Eple monotherapy improved structural and functional myocardium parameters

The progression of the SHHF cardiac remodeling and dysfunction was evaluated by an echocardiographic follow-up performed between 1.5 to 12.5 months of age. As previously described [10] SHHF$^{cp/cp}$ rats developed eccentric LV remodeling as compared to the concentric hypertrophy of the LV developed by the SHHF$^{+/+}$ rats that is characterized by an increase of LV internal diameter (LVIDd, **Figure 3 A, E, left panels**), thickening of the cardiac posterior wall (PWT) (**Figure 3B, F**) and an increased LV mass (**Figure 3D, H, left panels**). By 12.5 months of age, the dilation of the SHHF$^{cp/cp}$ LV exacerbated (**Figure 3A, E, left panels**) while the PWT (**Figure 3B, F, left panels**) and septum (**Figure 3C, G, left panels**) became thinner. This results in a decreased LV mass that was no longer significantly different from the LV mass of the $^{12.5}$SHHF$^{+/+}$ controls (**Figure 3A, E and D, H, left panels)**. LV remodeling was accompanied in both genotypes by the development of interstitial fibrosis with a significantly higher extend in $^{12.5}$SHHF$^{cp/cp}$ rats as compared to $^{12.5}$SHHF$^{+/+}$ group (**Figure 4A-B**). The remodeling of the LV geometry observed at 12.5 months of age appeared concomitantly with functional alterations of the untreated SHHF$^{cp/cp}$ myocardium (**Figure 5**). Indeed, $^{12.5}$SHHF$^{cp/cp}$ rats altered their diastolic (significantly reduced isovolumic relaxation time $p<0.05$ and significantly increased E/A mitral influx ratio $p<0.001$, **Figure 5A, E; B, F**)) and systolic functions (significantly reduced fractional shortening, $p<0.05$, ejection fraction values, $p<0.001$; Sa wave obtained by Tissue Doppler Imaging, $^{12.5}$SHHF$^{cp/cp}$Sa=2.64±0.10 cm/s *vs.* $^{12.5}$SHHF$^{+/+}$Sa= 3.41±0.07 cm/s, $p<0.0001$)) as compared to $^{12.5}$SHHF$^{+/+}$ rats.

For Hypertension Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

Chronic Eplerenone administration had beneficial effects on rats of both genotypes. The treatment improved LV geometry of the $SHHF^{+/+}$eple rats by limiting the thickening of the posterior wall and septum (**Figure 3B, C**) and significantly reduced LV mass as early as 9.5 months of age (**Figure 3D**) as compared to their untreated controls. Likewise, eple treatment mitigated the eccentric remodeling of the $SHHF^{cp/cp}$eple by reducing the LV at 11.5 months of age (**Figure 3D**), by the significantly reducing ratio heart weight/tibia length of the $^{12.5}SHHF^{cp/cp}$eple rats as compared to the untreated $^{12.5}SHHF^{cp/cp}$ controls (49.5±1.3 mg/mm *vs.* 57±1.7 mg/mm respectively, p= 0.001) and by reducing the LV internal diameter at 12.5 months of age (**Figure 3E**). Eple treatment had no effect on the $SHHF^{+/+}$ cardiac functional parameters surely because they are stable during the time frame of our study (**Figure 5A-D**). However, chronic eple treatment in $^{12.5}SHHF^{cp/cp}$eple group prevented the IVRT, FS and EF decreases (Figure 4-E, G and H) as well as the E/A increase observed in the $^{12.5}SHHF^{cp/cp}$ control group (Figure 4-F). Even though those parameters reached statistical significance solely by 12.5 months of age, the remodeling was associated with early default relaxation of the myocardium of the $SHHF^{cp/cp}$ rats that was improved by MRA at 3 months of age ($^{3}SHHF^{cp/cp}$E wave deceleration time= 35.8±2.6 ms *vs.* $^{3}SHHF^{cp/cp}$epleE wave deceleration time= 26.5±2.3ms; p<0.015). Both improvements of LV structure and function in the $^{12.5}SHHF^{cp/cp}$eple group were accompanied by a significant reduction of cardiac fibrosis in $^{12.5}SHHF^{cp/cp}$ animals (**Figure 4A-B**, p<0.05). The beneficial effect of eple on the cardiac systolic function was further evidenced by the measurement of the Sa wave (by Tissue Doppler Imaging) that was decreased in $^{12.5}SHHF^{cp/cp}$ but preserved in the $^{12.5}SHHF^{cp/cp}$eple group ($^{12.5}SHHF^{cp/cp}$Sa=2.64±0.10 cm/s *vs.* $^{12.5}SHHF^{cp/cp}$Sa= 3.29±0.09 cm/s, p<0.0001).

Altogether, those results suggest a beneficial effect of eple long-term monotherapy on cardiac remodeling in rats of both genotypes and on function mostly in $SHHF^{cp/cp}$ rats.

For Hypertension Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

Discussion:

Accumulating evidences propose that elevated plasma aldosterone level mediates patho-physiological changes that participate to the development of MetS and associated cardiovascular functional decline. Because hypertensive SHHF$^{cp/cp}$ rats develop a metabolic syndrome in presence of higher aldosterone levels in comparison with their lean non-dyslipidemic but hypertensive SHHF$^{+/+}$ controls, they provide an instrumental model to evaluate the effects of MR antagonism on metabolic and cardiovascular parameters [10]. In the present study, we demonstrate that the administration as monotherapy of eple, a selective MR antagonist, at the onset of metabolic disorder development in SHHF$^{cp/cp}$ rats allow to reduce i) mortality, ii) weight gain, iii) number of hypertrophic adipocytes as well as to improve iv) dyslipidemia and v) cardiac remodeling and function. Those observations lead us to propose that the beneficial effects of MRA on cardiac parameters were in part mediated by the amelioration of the metabolic features.

Clinical trials have demonstrated a marked reduction of mortality following MRA treatment with amelioration of HF symptoms [4, 20]. This parallels results obtained on preclinical studies on obese and lean rats at older ages [21, 22]. The long-term MRA treatment effects resulted in the alleviation of the cardiac LV hypertrophic and later dilated remodeling, an effect probably underestimated due to the milder phenotypes, of the survivor. The anti-fibrotic properties of MRA therapies reported in both experimental models (rats, dogs, mice) [18, 23-25] and humans [4, 20, 26, 27] were confirmed in the present report. Such reduction in the pro-fibrotic effects of MR activation in the heart probably participated to the improved survival of the treated rat as the severity of myocardial fibrosis has been reported to be associated with long-term mortality in patients with HF [15, 28, 29]. The exact mechanism of this antifibrotic property of MRA remains unclear. However, it has been suggested that it may result from the restoration of normal levels of the main components of extracellular matrix in SHHF$^{+/+}$ rat myocardium (reduction of tenascin C and periostin with increased osteonectin/SPARC levels) [30] and the regulation of expression of MR downstream cytokines [31, 32].

For Hypertension Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

MRA treatment preserves SHHF$^{cp/cp}$eple rats from developing diastolic dysfunction by preventing the increase in filling pressures and systolic dysfunction by preserving EF, FS and Sa. The cardiac remodeling was associated with early default of the myocardium relaxation of the SHHF$^{cp/cp}$ rats, which was already improved by MRA at 3 month of age (^{3}SHHF$^{cp/cp}$ E wave deceleration time= 35.8±2.6 ms *vs.* ^{3}SHHF$^{cp/cp}$eple E wave deceleration time= 26.5±2.3ms; $p<0.015$) suggesting the eple treatment started at 1.5 months of age add early beneficial impacts on the myocardium function. This early MRA administration might explain that beneficial effects on cardiac remodeling could be evidenced in the setting of our experience while later MRA administration failed to improve cardiac outcomes in other studies [18, 22]. Importantly, the overall improvements observed upon chronic monotherapy MRA were obtained independently of hemodynamic effects. This stresses out the relevance of this early treatment even tough applied as monotherapy.

Clinical reports support the notion that hypertensive and primary hyperaldosteronism patients exhibit more frequent impairment of metabolic signaling, dyslipidemia and obesity [33-35]. Interestingly chronic eple administration started at the onset of the metabolic syndrome in SHHF$^{cp/cp}$ rats, reduced their body mass by 10%, dramatically reduced the dyslipidemia and significantly reduced the hypertrophy of the adipocytes from visceral adipose fat pad [7, 36, 37]. In agreement with relatively few *in vitro* and *in vivo* findings, our results confirm that MR activation plays a crucial role in adipocyte function and that its antagonism is able to induce remarkable morphological changes of the adipocytes *in vivo*. Interestingly, Wada et al reported a comparable improvement of lipid metabolism in a mouse model with diet-induced diabetes and non-alcoholic fatty liver disease [38]. MR antagonism also improves the metabolic activity of adipose tissue by its ability to promote conversion of white adipose tissue into thermogenic fat [39]. In humans, the impact of MRA on dyslipidemia has been described in the ASCOT clinical trial where the treatment with Spironolactone of a subgroup of patients reduced total- and LDL-Cholesterol levels but was associated with an impairment of glucose handling [38, 40]. However Sato et al, reported that eple reduced hyperlipidemia in individuals with essential hypertension without changes in hyperglycemia [41]. In the SHHF$^{cp/cp}$eple group the normalization of the plasma glucose concentration might in part be related

For Hypertension Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

to the increased of adiponectin plasma concentration upon eple treatment and to the increase of both insulin and glucose receptor expression, consequently improving glucose uptake [42, 43]. Such ability of MRA treatment to increase the expression of adiponectin has been previously reported *in vivo* and *in vitro* [36, 39, 44] but further investigations are needed to sort out the *in vivo* implication of MR activation/blockade on adiponectin expression and more globally its implication in glucose handling.

Our study showed that chronic MRA treatment prevents the obesity-related changes in adipose tissue in association with a reduced dyslipidemia and a reduced gain of weight. Importantly those antihyperlipidemic properties of chronic eple administration are independent of hemodynamic factors and glycemia regulation and not associated to hyperkalemia, a common side effect of MRA in humans. Knowing that each of the afore mentioned modifiers greatly influence the prevalence of HF development [9] it is most likely that they participate together with to the cardioprotective effects observed in the eple groups. Because of the pleiotropic activity of the MR, we expect that the overall beneficial effects attributed to the chronic MR antagonism might also relate to other MR target organs besides myocardium and adipose tissues. Indeed, improvement of the kidney and liver functions might have generated signals that participated to the improvement of the obesity-derived disorders and to the preservation of cardiac function.

ion Peer Review. Do not distribute
Destroy after use.

Altogether our data demonstrated that chronic Mineralocorticoid Receptor Antagonism initiated at the onset of MetS in the SHHF model dramatically improves survival and delays the HF onset in the treated groups. The overall metabolic improvements observed in the SHHF$^{cp/cp}$eple group participates in the reduction of the cardiac remodeling (reduced fibrosis and hypertrophy) and in the preservation of the cardiac functions (diastolic and systolic), in the absence of blood pressure changes, that resulted in the delayed progression towards the development of HF symptoms.

Our strategy used one of the most specific MRA as monotherapy to target the MetS compounds. Thus the observed beneficial effects arose from the inhibition of both aldosterone and glucocorticoid and of the selective blockade of the downstream MR signaling pathways.

A higher number of animal would have strengthened the statistical power of the study and allow the study of intermediary time points to better refine the kinetic of MetS and HF progressions and the

interconnection existing between the two disease. But the dramatic difference in the phenotype at the end of our protocol will allow further investigations of the molecular signaling pathways altered by MR antagonism in the visceral adipose tissue and in the heart during MetS. This should help understanding the specific role of MR activation in the pathogenesis of obesity and its contribution to the progression towards HF in this context.

Perspectives

Increasing evidence suggests that excessive MR activation participates not only to the development of heart failure but as well to several heart failure worsening conditions like metabolic syndrome. Indeed patients with hypertension and concurrent metabolic abnormalities such as obesity and dyslipidemia have increased aldosterone levels. The greater risk of developing cardiovascular events in patients with primary aldosteronism as compared to those with essential hypertension is associated with an increased prevalence of MetS. Our study provides further rationale for the MR antagonism in patients at risk of developing adverse metabolic consequences and adipocytes dysfunction. Because of the converging evidences of the major role of MR excessive activation as independent risk factor for metabolic and subsequent cardiovascular disease, the use of MRA might represent a promising therapeutic strategy for the prevention of cardiac diseases especially in human metabolic syndrome patients.

For Hypertension Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

Acknowledgments: We are grateful to Pfizer Inc. (New York, NY) for providing eplerenone. We wish to thank Dr Lacolley for the tremendous support he gave during the completion of this study and Anne-Laure Leblanc and Dominique Meng for their expert technical assistance in animal handling and histology respectively

For Hypertension Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

Funding sources: This work was funded by INSERM, Région Lorraine, FRM comité Lorrain, FP7 FIBRO-TARGETS grant agreement no: 602904. G. Youcef received a salary grant from FNR Luxembourg.

For Hypertension Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

Conflict of interest Disclosures: None

For Hypertension Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

References

1. McMurray, J.J., *Failure to practice evidence-based medicine: why do physicians not treat patients with heart failure with angiotensin-converting enzyme inhibitors?* Eur Heart J, 1998. 19 Suppl L: p. L15-21.
2. van Deursen, V.M., et al., *Co-morbidities in heart failure.* Heart Fail Rev, 2014. 19(2): p. 163-72.
3. Pitt, B., et al., *Transatlantic similarities and differences in major natural history endpoints of heart failure after acute myocardial infarction: a propensity-matched study of the EPHESUS trial.* Int J Cardiol, 2010. 143(3): p. 309-16.
4. Pitt, B., et al., *The EPHESUS trial: eplerenone in patients with heart failure due to systolic dysfunction complicating acute myocardial infarction. Eplerenone Post-AMI Heart Failure Efficacy and Survival Study.* Cardiovasc Drugs Ther, 2001. 15(1): p. 79-87.
5. Zennaro, M.C., M. Caprio, and B. Feve, *Mineralocorticoid receptors in the metabolic syndrome.* Trends Endocrinol Metab, 2009. 20(9): p. 444-51.
6. Caprio, M., et al., *Potential role of progestogens in the control of adipose tissue and salt sensitivity via interaction with the mineralocorticoid receptor.* Climacteric, 2008. 11(3): p. 258-64.
7. Caprio, M., et al., *Pivotal role of the mineralocorticoid receptor in corticosteroid-induced adipogenesis.* FASEB J, 2007. 21(9): p. 2185-94.
8. Caprio, M., et al., *Antiadipogenic effects of the mineralocorticoid receptor antagonist drospirenone: potential implications for the treatment of metabolic syndrome.* Endocrinology, 2011. 152(1): p. 113-25.
9. De Keulenaer, G.W. and D.L. Brutsaert, *Are systolic and diastolic heart failure overlapping or distinct phenotypes within the heart failure spectrum?* Circulation, 2011. 123: p. 1996-2005.
10. Youcef, G., et al., *Simultaneous characterization of metabolic, cardiac, vascular and renal phenotypes of lean and obese SHHF rats.* PLoS One, 2014. 9(5): p. e96452.
11. Hennes, M.M., et al., *Synergistic effects of male sex and obesity on hepatic insulin dynamics in SHR/Mcc-cp rat.* Diabetes, 1990. 39(7): p. 789-95.
12. Bayorh, M.A., et al., *Effects of enalapril, tempol, and eplerenone on salt-induced hypertension in dahl salt-sensitive rats.* Clin Exp Hypertens, 2006. 28(2): p. 121-32.
13. Miana, M., et al., *Effect of eplerenone on hypertension-associated renal damage in rats: potential role of peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPAR-gamma).* J Physiol Pharmacol, 2011. 62(1): p. 87-94.
14. Watson, L.E., et al., *Echocardiographic effects of eplerenone and aldosterone in hypertensive rats.* Front Biosci (Elite Ed), 2013. 5: p. 922-7.
15. Fraccarollo, D., et al., *Deletion of cardiomyocyte mineralocorticoid receptor ameliorates adverse remodeling after myocardial infarction.* Circulation, 2011. 123(4): p. 400-8.
16. Baldo, M.P., et al., *Long-term use of low-dose spironolactone in spontaneously hypertensive rats: effects on left ventricular hypertrophy and stiffness.* Pharmacol Rep, 2011. 63(4): p. 975-82.
17. Rigsby, C.S., D.M. Pollock, and A.M. Dorrance, *Spironolactone improves structure and increases tone in the cerebral vasculature of male spontaneously hypertensive stroke-prone rats.* Microvasc Res, 2007. 73(3): p. 198-205.
18. Susic, D., et al., *Long-term mineralocorticoid receptor blockade reduces fibrosis and improves cardiac performance and coronary hemodynamics in elderly SHR.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. 292(1): p. H175-9.
19. Lacolley, P., et al., *Increased carotid wall elastic modulus and fibronectin in aldosterone-salt-treated rats: effects of eplerenone.* Circulation, 2002. 106(22): p. 2848-53.

For Personal Peer Review. Do not distribute.

20. 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, 2005. 46(3): p. 425-31.
21. Rocha, R., et al., *Mineralocorticoid blockade reduces vascular injury in stroke-prone hypertensive rats.* Hypertension, 1998. 31(1 Pt 2): p. 451-8.
22. Cezar, M.D., et al., *Aldosterone blockade reduces mortality without changing cardiac remodeling in spontaneously hypertensive rats.* Cell Physiol Biochem, 2013. 32(5): p. 1275-87.
23. Ramirez, E., et al., *Eplerenone attenuated cardiac steatosis, apoptosis and diastolic dysfunction in experimental type-II diabetes.* Cardiovasc Diabetol, 2013. 12: p. 172.
24. Brilla, C.G., L.S. Matsubara, and K.T. Weber, *Antifibrotic effects of spironolactone in preventing myocardial fibrosis in systemic arterial hypertension.* Am J Cardiol, 1993. 71(3): p. 12A-16A.
25. Brilla, C.G., et al., *Collagen metabolism in cultured adult rat cardiac fibroblasts: response to angiotensin II and aldosterone.* J Mol Cell Cardiol, 1994. 26(7): p. 809-20.
26. Pitt, B., et al., *Evaluation of eplerenone in the subgroup of EPHESUS patients with baseline left ventricular ejection fraction <or=30%.* Eur J Heart Fail, 2006. 8(3): p. 295-301.
27. 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, 2009. 119(18): p. 2471-9.
28. Azevedo, C.F., et al., *Prognostic significance of myocardial fibrosis quantification by histopathology and magnetic resonance imaging in patients with severe aortic valve disease.* J Am Coll Cardiol, 2010. 56(4): p. 278-87.
29. Aoki, T., et al., *Prognostic impact of myocardial interstitial fibrosis in non-ischemic heart failure. -Comparison between preserved and reduced ejection fraction heart failure.* Circ J, 2011. 75(11): p. 2605-13.
30. Munoz-Pacheco, P., et al., *Eplerenone enhances cardioprotective effects of standard heart failure therapy through matricellular proteins in hypertensive heart failure.* J Hypertens, 2013. 31(11): p. 2309-18; discussion 2319.
31. Lopez-Andres, N., et al., *A role for cardiotrophin-1 in myocardial remodeling induced by aldosterone.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011. 301(6): p. H2372-82.
32. Calvier, L., et al., *Galectin-3 mediates aldosterone-induced vascular fibrosis.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2013. 33(1): p. 67-75.
33. Manrique, C., et al., *Hypertension and the cardiometabolic syndrome.* J Clin Hypertens (Greenwich), 2005. 7(8): p. 471-6.
34. Sowers, J.R., *Metabolic risk factors and renal disease.* Kidney Int, 2007. 71(8): p. 719-20.
35. Van Gaal, L.F., I.L. Mertens, and C.E. De Block, *Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease.* Nature, 2006. 444(7121): p. 875-80.
36. Hirata, A., et al., *Blockade of mineralocorticoid receptor reverses adipocyte dysfunction and insulin resistance in obese mice.* Cardiovasc Res, 2009. 84(1): p. 164-72.
37. Wada, T., et al., *Eplerenone ameliorates the phenotypes of metabolic syndrome with NASH in liver-specific SREBP-1c Tg mice fed high-fat and high-fructose diet.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2013. 305(11): p. E1415-25.
38. Wada, T., et al., *Spironolactone improves glucose and lipid metabolism by ameliorating hepatic steatosis and inflammation and suppressing enhanced gluconeogenesis induced by high-fat and high-fructose diet.* Endocrinology, 2010. 151(5): p. 2040-9.
39. 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, 2014. 28(8): p. 3745-57.

For personal use only. Do not distribute.

40. Homma, T., et al., *Activation of renal angiotensin type 1 receptor contributes to the pathogenesis of progressive renal injury in a rat model of chronic cardiorenal syndrome.* Am J Physiol Renal Physiol, 2012. 302(6): p. F750-61.
41. Sato, A. and S. Fukuda, *Clinical effects of eplerenone, a selective aldosterone blocker, in Japanese patients with essential hypertension.* Journal of Human Hypertension, 2010. 24(6): p. 387-394.
42. Calle, C., et al., *Transcriptional inhibition of the human insulin receptor gene by aldosterone.* J Steroid Biochem Mol Biol, 2003. 84(5): p. 543-53.
43. Selvaraj, J., et al., *Impact of excess aldosterone on glucose homeostasis in adult male rat.* Clin Chim Acta, 2009. 407(1-2): p. 51-7.
44. Guo, C., et al., *Mineralocorticoid receptor blockade reverses obesity-related changes in expression of adiponectin, peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, and proinflammatory adipokines.* Circulation, 2008. 117(17): p. 2253-61.

For Hypertension Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

Novelty and Significance

What is new? The use of mineralocorticoid receptor antagonists to target obesity and related disorder

What is relevant? Because of the role of MR excessive activation as independent risk factor for metabolic and subsequent cardiovascular disease, the use of MRA might represent a promising therapeutic strategy for the prevention of cardiac diseases especially in human metabolic syndrome patients.

Summary Our data demonstrated that preventive Eplerenone treatment at the onset of metabolic syndrome in our experimental model improves obesity, dyslipidemia that delayed progression towards the development of HF symptoms and improved survival rate.

For Hypertension Review. Do not distribute.

Figure legends

Figure 1. Study Design and survival rate

A) Thirty SHHF$^{cp/cp}$ and 28 SHHF$^{+/+}$rats were randomized either to the $^{1.5}$SHHF group (n=10 per genotype) or in the long-term follow-up to receive either the selective mineralocorticoid receptor antagonist eplerenone (eple, 100 mg/kg/day) ($^{12.5}$SHHF$^{+/+}$eple and $^{12.5}$SHHF$^{cp/cp}$eple) or the placebo ($^{12.5}$SHHF$^{+/+}$ and $^{12.5}$SHHF$^{cp/cp}$). Animals underwent a metabolic (M), cardiac (C), vascular (V) and histological (H) phenotyping at the beginning and end of the study. Cardiac parameters were regularly monitored from 1.5 to 12.5 months of age. **B)** Kaplan Meier curves indicating the survival rate for each studied group.

Figure 2. Chronic Eplerenone treatment reduced body weight gain and visceral adipocyte hypertrophy. Rats received either MRA (eple, 100 mg/kg/day) or placebo from 1.5months of age. Perirenal visceral fat was dissected at 12.5months of age and analyzed. **A)** Follow-up of animals body weight (BW) (n=6 to 11). **B)** Morphological analysis of visceral adipocytes were performed on sections stained with hematoxylin-eosin from all groups (n=4-6) (insert). Cross sectional area (mm2) and cell size distribution in %. Student t test, *** $p<0.001$ compared to SHHF$^{+/+}$ from the same age; # $p<0.05$, ## $p<0.01$ compared to the untreated group from the same genotype at the same age.

Figure 3. Chronic Eplerenone treatment reduced cardiac remodeling

Cardiac echocardiographic parameter evolution (n=5-11) of SHHF$^{+/+}$ and SHHF$^{+/+}$eple rats **A)** left ventricular internal diameter at end diastole (LVIDd), **B)** septum wall thickness (SWT), **C)** posterior wall thickness (PWT) and **D)** left ventricular mass (LV mass), but also of SHHF$^{cp/cp}$ and SHHF$^{cp/cp}$eple animals: E to H. Student t test, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ compared to SHHF$^{+/+}$ from the same age; # $p<0.05$, ## $p<0.01$, ### $p<0.001$ compared to the untreated group from the same genotype at the same age.

For Hypertension Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

Figure 4. Chronic Eplerenone treatment reduced myocardial fibrosis

The degree of fibrosis was assessed on histological sections of hearts stained with Sirius red n **A)** untreated controls (right panels) and MRA treated (left panels) $^{12.5}$SHHF$^{+/+}$ and $^{12.5}$SHHF$^{cp/cp}$ animals (n=4-6), **B)** Quantification (image J software) of the percentage of fibrotic surface on all experimental groups. Student t test, ** $p<0.01$ compared to SHHF$^{+/+}$ from the same age; # $p<0.05$ compared to the untreated group from the same genotype at the same age.

Figure 5. Chronic Eplerenone treatment improved SHHF$^{cp/cp}$ cardiac functional parameters

The monitoring of rats cardiac functional parameters by echocardiography at 1.5, 3, 6, 9.5, 11.5 and 12.5 months-old (n=5-11) evidenced the progression of those parameters in SHHF$^{+/+}$ (left panels) and SHHF$^{+/+}$Eple (right panels) rats for their **A)** isovolumic relaxation time (IVRT), **B)** E to A ratio (E/A), **C)** fractional shortening (FS) and **D)** ejection fraction (EF). Similarly parameters are depicted for SHHF$^{cp/cp}$ animals (E to H) where left and right panels correspond to the untreated controls and treated rats respectively. Student t test, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ compared to SHHF$^{+/+}$ from the same age; # $p<0.05$, ## $p<0.01$, ### $p<0.001$ compared to the untreated group from the same genotype at the same age.

For Hypertension Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

Figure 1. Study Design and survival rate

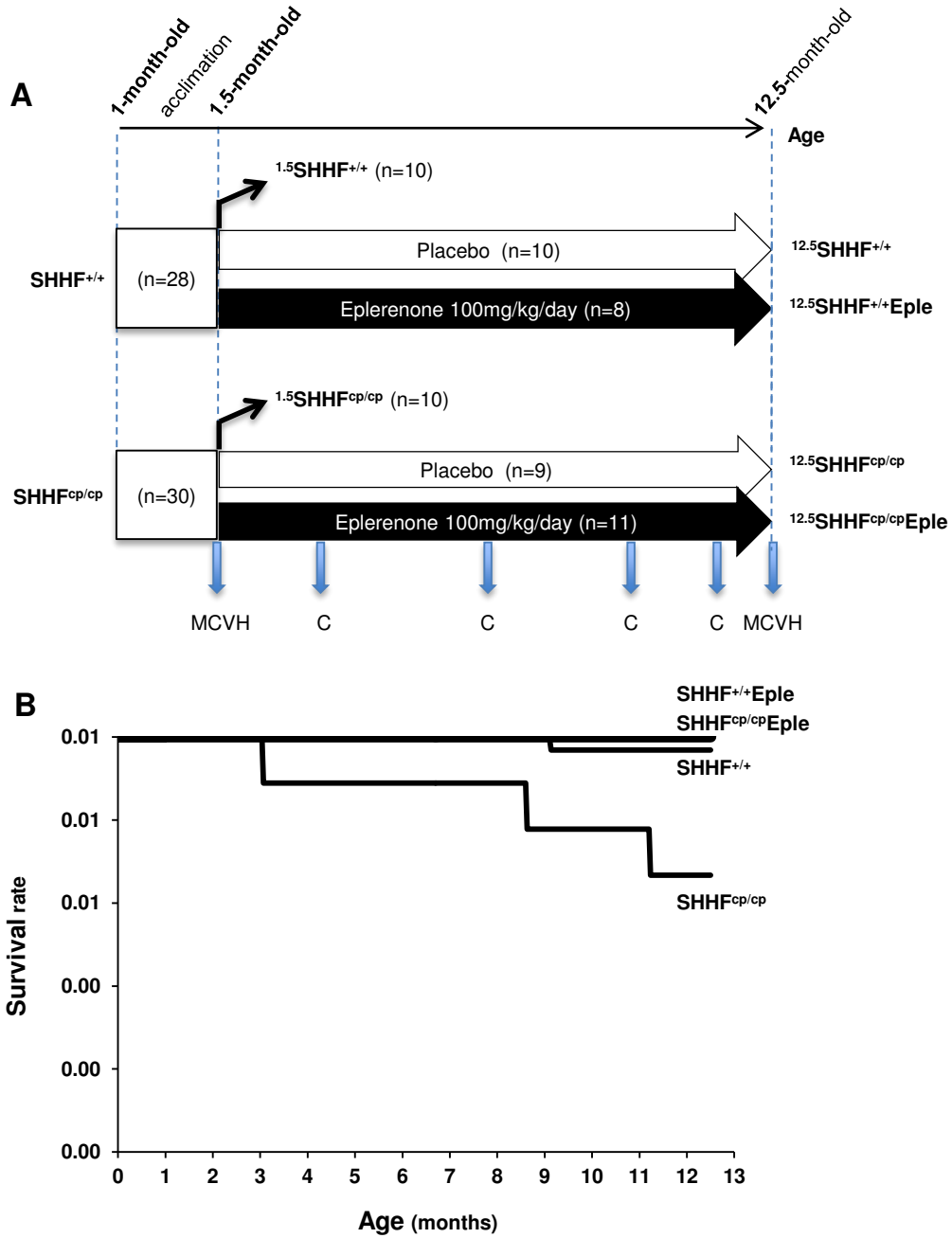
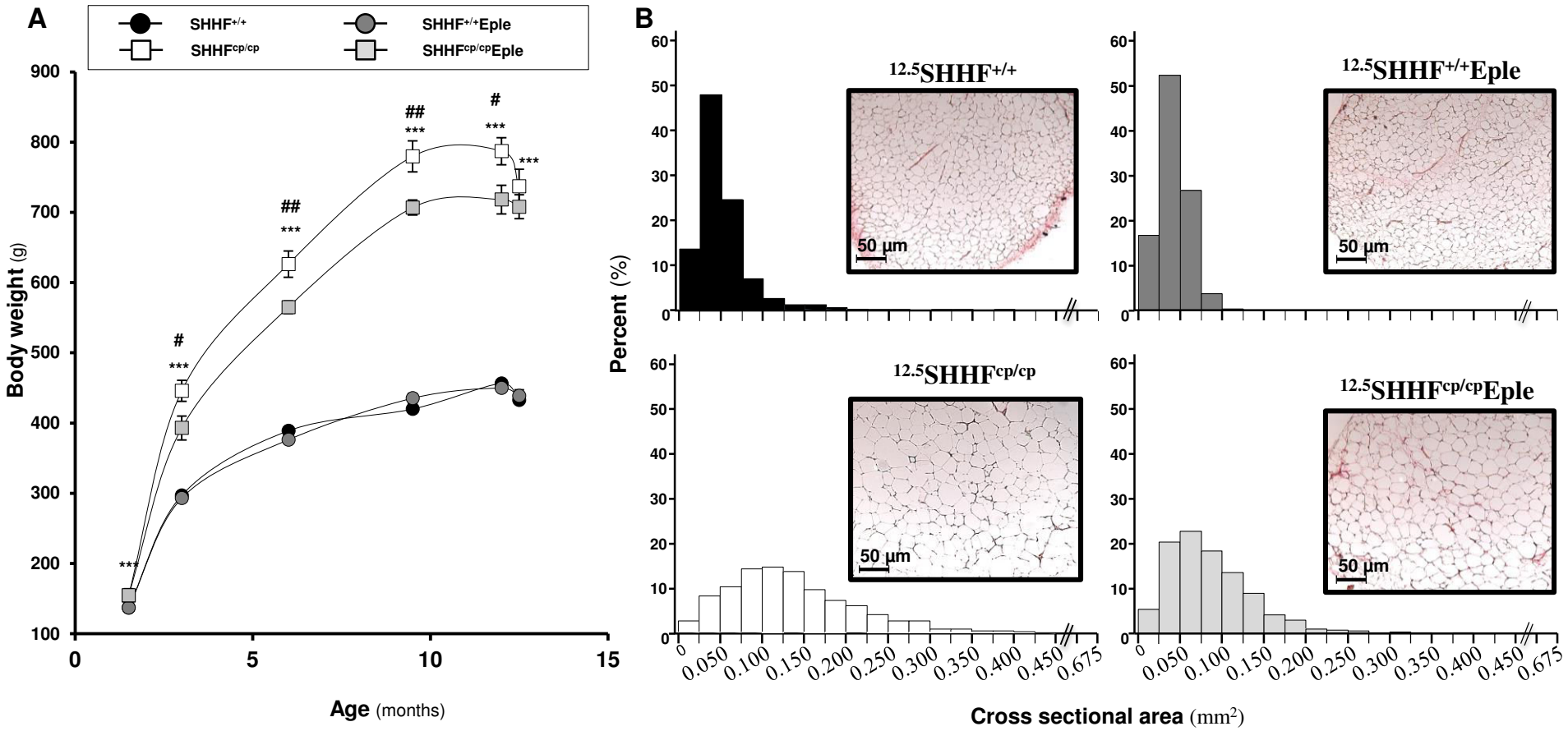


Figure 2. Chronic Eplerenone treatment reduced body weight gain and visceral adipocytes hypertrophy



	SHHF$^{+/+}$			SHHF$^{cp/cp}$					
Age, months	**1.5**	**12.5**		**1.5**	**12.5**		**ANOVA**		
Treatment		**placebo**	**eple**		**placebo**	**eple**			
n	*7*	*10*	*8*	*7*	*10*	*8*	**Genotype**	**Treatment**	**Interaction**
Lipid profile, g/L									
Total Chol.	0.69 ± 0.03	0.90 ± 0.25	0.75 ± 0.28	0.93 ± 0.03 ***	4.25 ± 0.33 ***	2.67 ± 0.24 ###	<0.0001	0.007	0.010
TG	0.37 ± 0.01	0.61 ± 2.02	0.58 ± 2.26	0.77 ± 0.14 *	20.5 ± 2.6 ***	8.26 ± 1.93 ###	<0.0001	0.010	0.010
HDL	0.24 ± 0.01	0.25 ± 0.02	0.27 ± 0.02	0.30 ± 0.01 ***	0.56 ± 0.02 ***	0.50 ± 0.02	<0.0001	0.19	0.043
LDL	0.38 ± 0.03	0.08 ± 0.00	0.08 ± 0.01	0.48 ± 0.03	1.48 ± 0.40 ***	0.55 ± 0.08 ###	<0.0001	0.0003	0.0004
FFA	1.2 ± 0.1	0.4 ± 0.0	0.3 ± 0.1	1.6 ± 0.2	1.1 ± 0.2	1.5 ± 0.3	<0.0001	0.21	0.13
Fasting glycemia, mmol/L	4.6 ± 0.4	5.7 ± 0.4	6.1 ± 0.4	5.7 ± 0.5	5.4 ± 0.6	6.4 ± 0.4	0.88	0.16	0.54
Ionogram, mmol/L									
Na^+	141 ± 0	143 ± 3	139 ± 3	140 ± 1	146 ± 3	140 ± 2	0.49	0.073	0.69
K^+	4.8 ± 0.2	4.9 ± 0.2	5.2 ± 0.2	4.9 ± 0.1	4.6 ± 0.3	5.0 ± 0.2	0.35	0.11	0.92
Na^+/K^+ ratio	29.9 ± 1.4	30.2 ± 1.9	27.1 ± 2.0	28.9 ± 0.6	33.1 ± 2.3	28.4 ± 1.7	0.31	0.93	0.78
Fasting insulin, µIU/mL	11 ± 2	12 ± 5	10 ± 5	16 ± 4	52 ± 6 ***	69 ± 5	<0.0001	0.17	0.11
HOMA-IR index	0.8 ± 0.2	0.9 ± 0.5	0.9 ± 0.5	2.6 ± 0.8	3.6 ± 0.6	5.4 ± 0.6	<0.0001	0.079	0.056
Adiponectin, µg/mL	6.3 ± 0.4	6.3 ± 1.3	7.4 ± 1.2	19.7 ± 1.4 ***	11.9 ± 0.7 ***	22.7 ± 1.6 ###	<0.0001	<0.0001	0.0004
BNP, pg/mL	135 ± 18	219 ± 25	208 ± 25	102 ± 15	225 ± 29	203 ± 22	1.00	0.53	0.82

Table 1. MR blockade reduced dyslipidemia and enhanced adiponectininemia

HDL, High Density Lipoprotein; **LDL**, Low density Lipoprotein; **FFA**, Free Fatty Acids; **TG,** triglyceride; **Na^+,** sodium, **K^+,** potassium; **BNP,** Brain Natriuretic Peptide. Values are the mean±sem. Non-parametric ANOVAs analysis with two factors allowed the evaluation of interaction between genotype and treatment. Student's T test * $p<0.05$; ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ to compare SHHF$^{cp/cp}$ *vs.* SHHF$^{+/+}$ at same time point; ### $p<0.001$ to compare eple *vs* placebo for a same genotype; **n** stands for the number of samples.

	$^{12.5}$SHHF$^{+/+}$		$^{12.5}$SHHF$^{cp/cp}$		ANOVA		
Treatment	**Placebo**	**Eple**	**Placebo**	**Eple**	**Genotype**	**Treatment**	**Interaction**
n	*10*	*7*	*6*	*11*			
DD, mm	1.04 ± 0.06	1.11 ± 0.06	1.03 ± 0.08	1.04 ± 0.02	0.45	0.49	0.55
DS, mm	1.19 ± 0.05	1.26 ± 0.05	1.20 ± 0.06	1.20 ± 0.02	0.59	0.44	0.41
DBP, mmHg	127 ± 11	135 ± 7	129 ± 13	130 ± 3	0.92	0.61	0.68
SBP, mmHg	179 ± 15	187 ± 9	193 ± 15	197 ± 6	0.31	0.63	0.85
MBP, mmHg	144 ± 12	152 ± 7	151 ± 14	153 ± 4	0.72	0.61	0.75
PP, mmHg	52 ± 5	52 ± 4	64 ± 2	67 ± 4 *	0.003	0.76	0.76
HR, bpm	328 ± 9	330 ± 13	323 ± 25	329± 6	0.85	0.76	0.88
Parameter at the MBP							
Surface, mm^2	0.99 ± 0.09	1.12 ± 0.11	1.01 ± 0.12	0.99 ± 0.03	0.49	0.50	0.41
Diameter, mm	1.11 ± 0.06	1.19 ± 0.06	1.12 ± 0.07	1.12 ± 0.02	0.58	0.45	0.48
Compliance, $mm^2/mmHg^{-1}.10^3$	2.44 ± 0.39	2.56 ± 0.51	1.88 ± 0.42	1.99 ± 0.19	0.15	0.76	0.88
Distensibility, 10^{-3}/mmHg	3.04 ± 0.82	2.44 ± 0.55	2.42 ± 1.00	2.01 ± 0.20	0.44	0.46	0.88
Einc, kPa	1 765 ± 357	1 969 ± 541	2 641 ± 691	1 948 ± 178	0.31	0.56	0.29
WS, kPa	281 ± 36	303 ± 35	319 ± 54	329 ± 21	0.37	0.65	0.86
MCSA, mm^2	0.14 ± 0.01	0.15 ± 0.00	0.13 ± 0.01	0.13 ± 0.01 *	0.03	0.83	0.29

Table 2. Lack of impact of eplerenone treatment on carotic hemodynamic properties

DD and **DS**, carotid **D**iameter at the **D**iastol and **S**ystol respectively; **DBP, SBP and MBP D**iastolic, **S**ystolic and **M**ean **B**lood **P**ressure respectively, **PP**, Pulse Pressure; **HR**, Heart Rate; **bpm**; beats per minutes; **Einc**, Incremental Elastic-modulus; **WS**, Wall Stress; **MCSA**, Mean Cross Sectional Area. Values are mean ± sem. Non-parametric ANOVAs analysis with two factors allowed the evaluation of interaction between genotype and treatment. Fisher's LSD Multiple-Comparison Test * $p<0.05$ to compare SHHF$^{cp/cp}$ *vs.* SHHF$^{+/+}$ under the treatment**; n** stands for the number of rats

Figure 3. Chronic Eplerenone treatment reduced cardiac remodeling

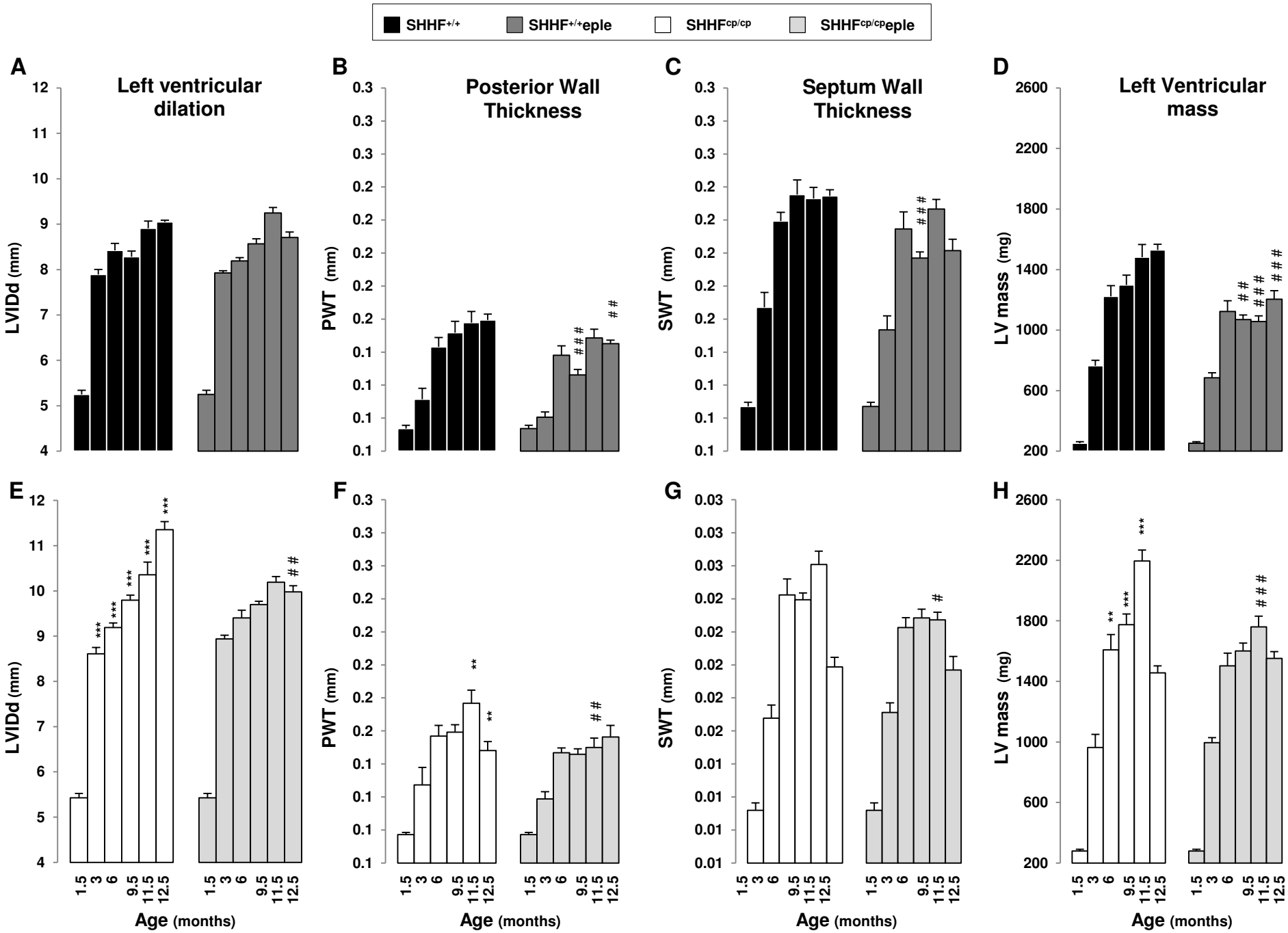


Figure 4. Chronic Eplerenone treatment reduced myocardial fibrosis

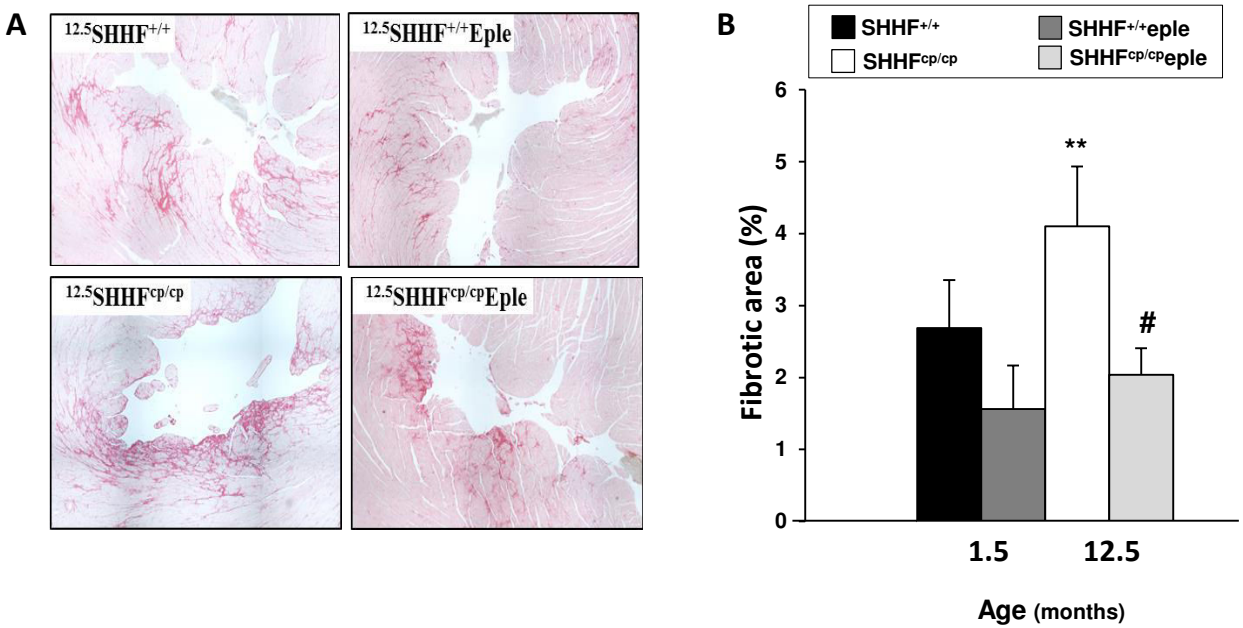
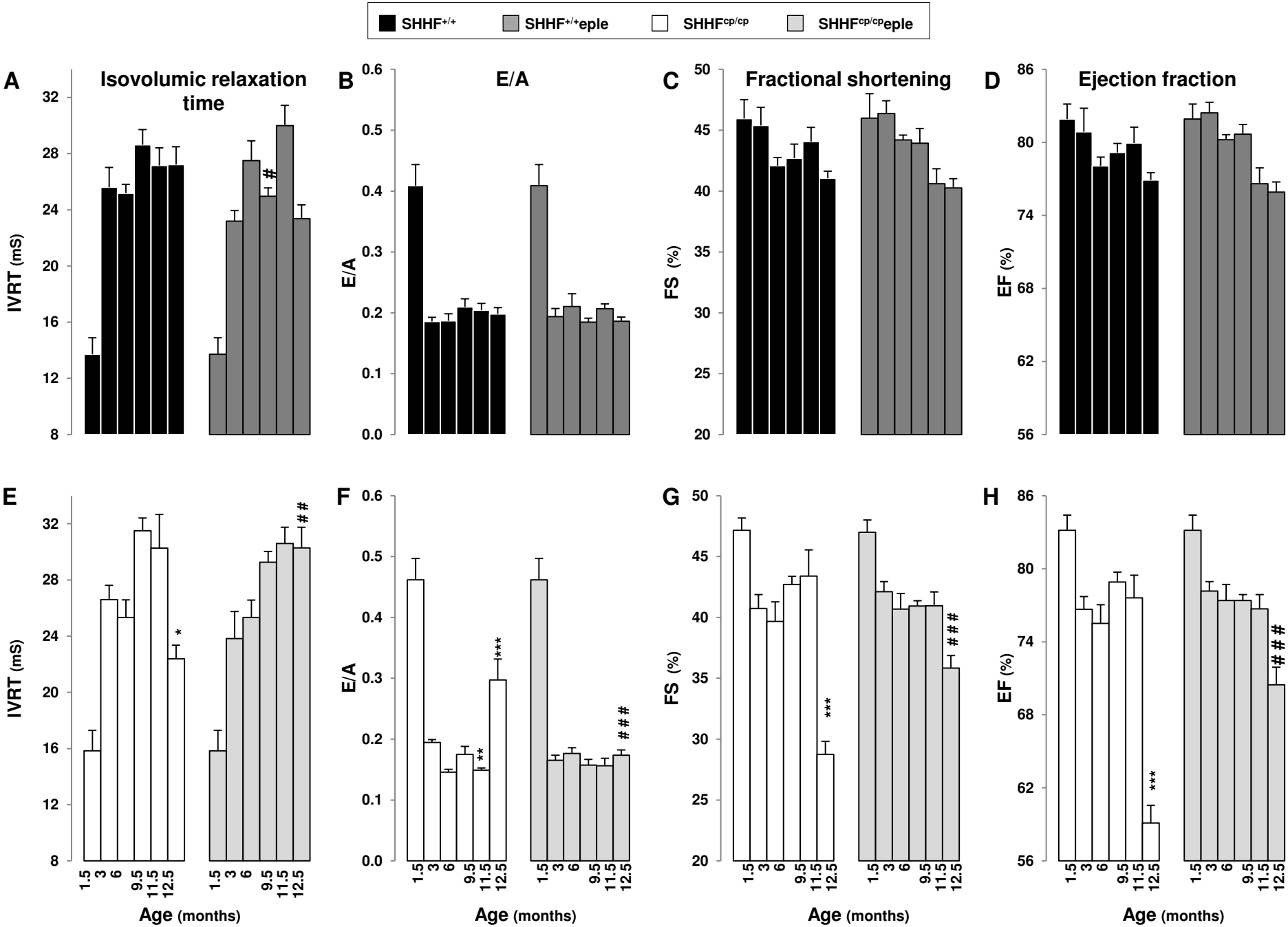


Figure 5. Chronic Eplerenone treatment improved SHHF$^{cp/cp}$ cardiac functional parameters

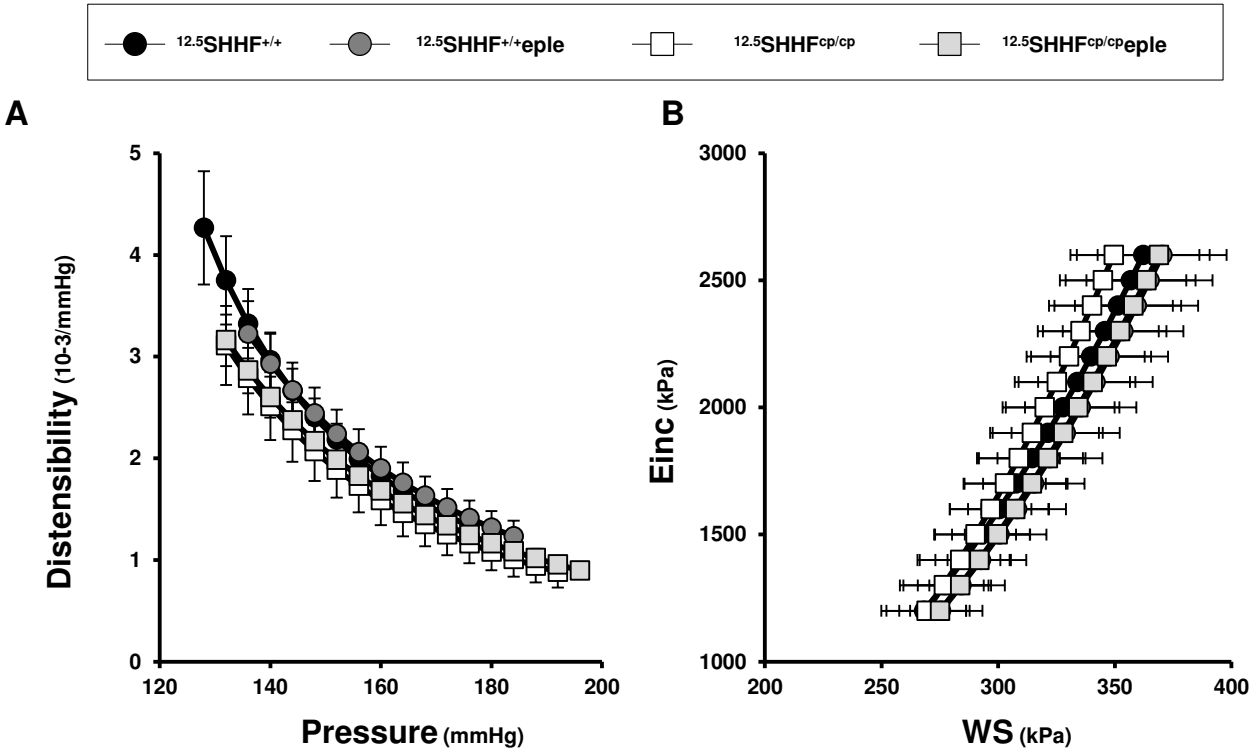


Treatment	SHHF$^{+/+}$		SHHF$^{cp/cp}$		ANOVA		
	placebo	**eple**	**placebo**	**eple**			
n	*4*	*4*	*5*	*8*	**Genotype**	**Treatment**	**Interaction**
total adipocyte count	2605	2369	1153	2510			
mean±SD, mm^2	0.051 ± 0.035	0.042 ± 0.018	0.137 ± 0.078***	0.087 ± 0.054###	<0.0001	0.001	0.012

Table S1. Influence of the treatment on adipocyte cross sectional area in SHHF$^{cp/cp}$ rats

Unadjusted pairwise comparisons The significance level for the 4 pairwise comparisons below have been set to $p < 0.0127$ in order to preserve the 5% overall alpha error rate. *** $p<0.0001$ SHHF$^{cp/cp}$ placebo group *vs.* SHHF$^{+/+}$ placebo group ; ### $p<0.0001$ SHHF$^{cp/cp}$ eple group *vs.* SHHF$^{cp/cp}$ placebo group **n** stands for the number of rats.

Figure S1. Carotid hemodynamic assessment



	SHHF$^{+/+}$								SHHF$^{cp/cp}$							
Treatment	**Placebo**				**eple**				**Placebo**				**eple**			
Age, months	**1.5**	**2.5**	**6**	**11.5**	**1.5**	**2.5**	**6**	**11.5**	**1.5**	**2.5**	**6**	**11.5**	**1.5**	**2.5**	**6**	**11.5**
n	***7***	***10***	***9***	***10***	***5***	***8***	***7***	***7***	***4***	***6***	***3***	***6***	***4***	***10***	***2***	***7***
SBP, mmHg	180±11	175±5	198±11	205±7	191±3	164±6	184±12	199±10	167±6	151±10	191±19	219±7	173±3	147±10	184±23	199±5
HR, bpm	447±6	396±5	397±11	406±9	460±6	384±7	413±13	394±17	518±24	369±12	379±19	391±13	450±9	395±9	36±24	363±9

Table S2. Influence of treatment on hemodynamics parameters in SHHF$^{+/+}$ and SHHF$^{cp/cp}$ rats

SBP, Systolic Blood Pressure; **HR**, Heart Rate; **bpm**, beats per minute. Values are mean ± sem. **n** stands for the number of rats.

L'administration chronique de l'Eplérénone chez les rats SHHF lors de l'étude N°2 a permis de montrer que l'antagonisation du RM :

(i) Sur le plan métabolique :

- atténue la prise de masse corporelle chez les rats SHHF$^{cp/cp}$. En effet, les animaux traités présentent une masse corporelle 10 % plus basse que celle des animaux non traités. Cet effet est observé sans modification de la prise alimentaire que nous avons également évalués par cage à métabolisme (résultats non montrés), Cette moindre prise de masse corporelle s'accompagne d'une diminution du nombre d'adipocytes hypertrophiques mesurés sur les coupes histologiques.
- atténue de 60 % la dyslipidémie chez les animaux SHHF$^{cp/cp}$ en agissant principalement sur la diminution des taux de cholestérol total et la diminution du LDL cholestérol tout en préservant les taux d'HDL. Elle a également agit sur la diminution des taux de TG sériques sans influencer ceux des AG libres.
- prévient la diminution de l'adiponectinémie des SHHF$^{cp/cp}$,
- ne modifie pas la glycémie à jeun ni l'insulino-résistance

(ii) Sur le plan vasculaire et hémodynamique :

- ne modifie pas les propriétés mécaniques artérielles ni des SHHF$^{cp/cp}$ ni des SHHF$^{+/+}$,
- ne modifie pas l'HTA ni des SHHF$^{cp/cp}$ ni des SHHF$^{+/+}$.

(iii) Sur le plan cardiaque :

- préserve des altérations structurales du myocarde en empêchant l'augmentation de la dilatation ventriculaire, de l'hypertrophie cardiaque et de la fibrose myocardique des SHHF$^{cp/cp}$.
- préserve des altérations fonctionnelles en améliorant la dysfonction diastolique des SHHF$^{cp/cp}$: moindre diminution du temps de relaxation iso-volumétrique et moindre augmentation du ratio E/A. L'Eplérénone a également permis l'amélioration de la dysfonction systolique en atténuant la diminution des fractions d'éjection et de raccourcissement du VG des SHHF$^{cp/cp}$.

A un effet important **sur la mortalité** des SHHF$^{cp/cp}$ puisqu'elle la réduit de 30 %. Aucune mort n'a été recensée dans le groupe des animaux traités à l'Eplérénone (**Figure 40**).

Bilan :

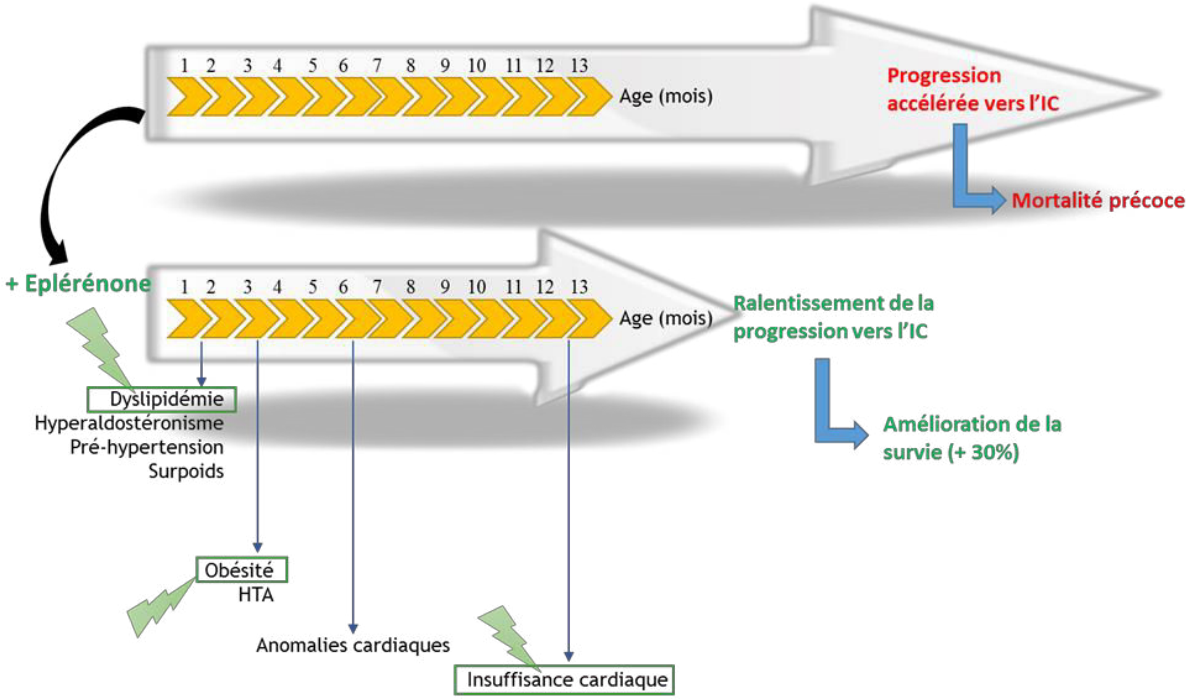


Figure 40 : Récapitulatif des effets majeurs obtenus au cours de l'étude N°2 par l'administration chronique d'un ARM chez les SHHF$^{cp/cp}$.

De façon intéressante, l'action bénéfique de l'Eplé est obtenue sans effet anti-hypertensif chez les rats SHHF$^{cp/cp}$, et n'est pas observée chez les animaux contrôles SHHF$^{+/+}$. Cette observation suggère que l'ARM pourrait impacter de préférence des mécanismes biologiques liés au métabolisme, en particulier celui des lipides, et aux mécanismes responsables de l'altération structurelle et fonctionnelle du cœur. Si les données de notre étude semblent étayer une telle conclusion, elles ne sont cependant pas suffisantes pour en apporter la preuve. C'est dans cette optique que nous avons décidé d'entreprendre la troisième phase de notre projet ayant pour but d'analyser l'impact thérapeutique de l'Eplérénone au niveau moléculaire adipeux et cardiaque par l'analyse du transcriptome et miRNome de ces deux organes.

ETUDE N°3

Etude N°3: « Phenome-guided analysis of the cardiac and adipose transcriptome and miRNome of obese SHHF rats reveals the cardioprotective effects of long-term Eplerenone treatment during metabolic syndrome development ».

Dans cette 3e étude, nous avons décidé d'étudier plus avant le transcriptome et miRNome des tissus adipeux et cardiaque dans le but de préciser les mécanismes moléculaires impactés par l'antagonisation du RM au niveau transcriptionnel dans ces tissus. Notre stratégie a consisté à analyser des échantillons de cœur et de TA viscéral péri-rénal prélevés dans les différents groupes d'animaux au temps initial et final de notre seconde étude longitudinale (**Figure 41**). Les différences d'expression ont été établies en comparant ces différents groupes donnant ainsi accès à l'impact de trois facteurs de variabilité : **le génotype** du rat, **le vieillissement** des animaux et **le traitement** à l'Eplérénone.

Les données transcriptomiques ont été exploitées pour établir les fonctions biologiques et les réseaux de gènes altérés dans ces conditions, alors que les mécanismes de régulation pouvant affecter ces fonctions ou réseaux ont été identifiés à partir des données d'expression des miRs. Nous avons par la suite, chaque fois que cela était possible, relié les données d'expression expérimentales aux données phénotypiques afin d'obtenir en particulier une vue d'ensemble sur la chronologie et les mécanismes mis en œuvre dans la progression vers l'IC chez les rats SHHF$^{cp/cp}$ et, parmi eux, ceux impactés par le traitement.

Notre étude a été réalisée en nous entourant d'un certain nombre de précautions rendues nécessaires par le recours à la technologie des *microarrays*. En effet, comme toutes les technologies à haut débit, les *microarrays* génèrent des signaux fréquemment bruités qui conduisent à une proportion non négligeable de faux-positifs dans les résultats. Pour garantir la robustesse de nos conclusions, nous avons basé nos analyses sur la significativité statistique des données représentée par un taux de faux positif (*False Discovery Rate* ou FDR) ou une p-value. En outre, le nombre d'analyses réalisées a été ajusté, en tenant compte de la variabilité des données expérimentales telle que nous l'avons observée lors d'essais préliminaires, de façon à atteindre un seuil acceptable de significativité. L'ensemble des analyses, incluant les analyses par *microarray* et les traitements statistiques et bioinformatiques des données, a été mis en œuvre suivant des procédures parfaitement standardisées et validées par de multiples contrôles de qualité répondant aux

recommandations internationales [193]. Enfin, en analysant l'expression des gènes et des miRs dans les mêmes échantillons tissulaires, il nous a été possible d'exploiter les données de manière intégrée avec l'assurance que la représentativité du transcriptome, pris au sens large, ne serait pas perturbée par l'utilisation de méthodes d'extraction différentes des ARNs.

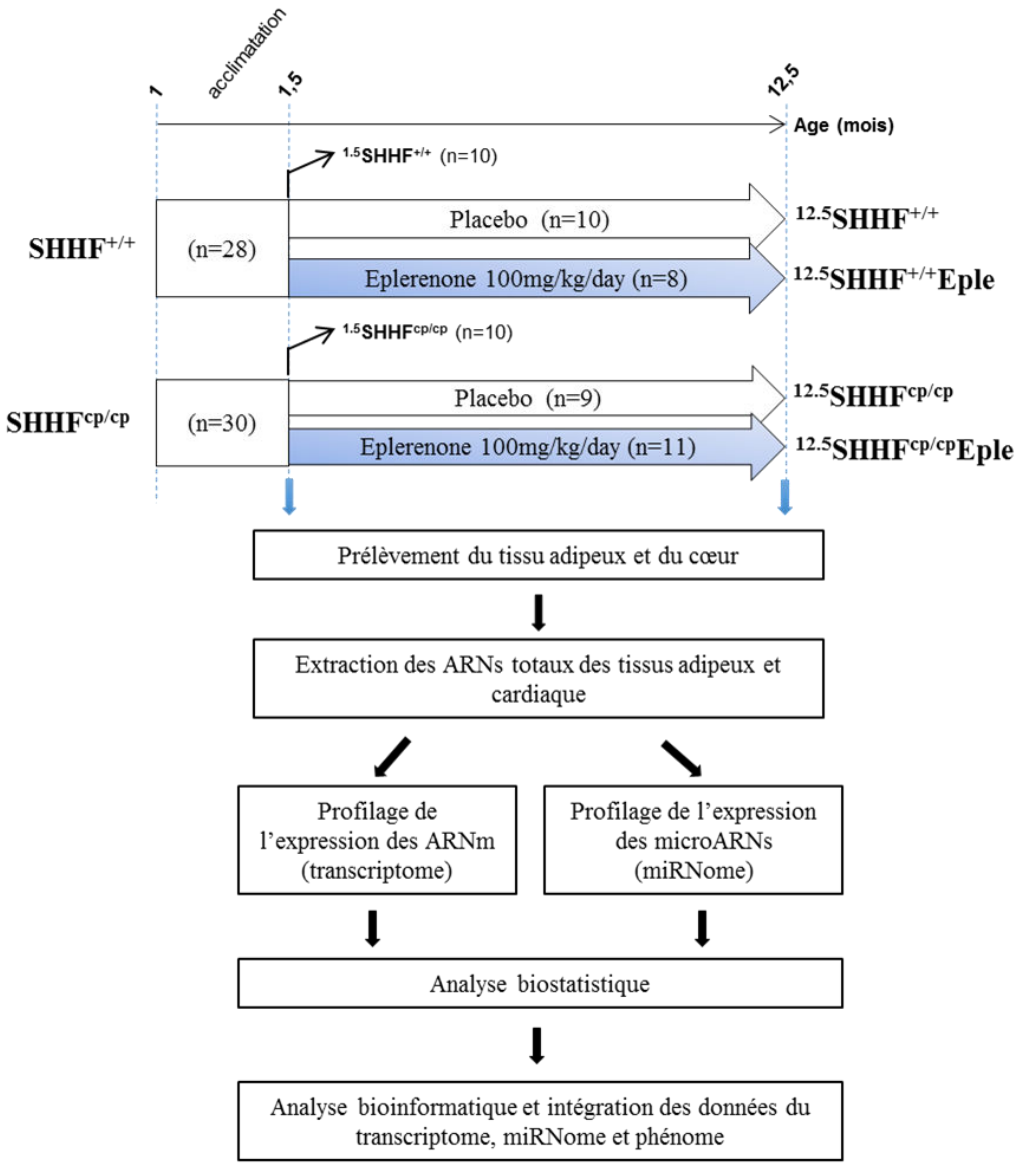


Figure 41 : Mode opératoire mis en œuvre dans l'étude N°3 pour la caractérisation du transcriptome et miRNome du tissu adipeux et cardiaque des rats SHHF traités ou non à l'Eplérénone.

Phenome-guided analysis of the cardiac and adipose transcriptome and miRNome of obese SHHF rats reveals the cardioprotective effects of long-term Eplerenone treatment during metabolic syndrome development

Running title: Gene regulatory networks impacted by mineralocorticoid receptor blockade *in vivo*

YOUCEF G.[1,2,3,4], KAOMA T.[1], NICOT N.[1], MULLER A.[1], NAZAROV P.[1], BERNARDIN F.[1],ZANNAD F.[2,3,4,5,6], PIZARD A.[2,3,4,6] and VALLAR L.[1]*

[1] Genomics Research Unit, Centre de Recherche Public de la Santé, Luxembourg.

[2] Université de Lorraine, Nancy, France.

[3] UMRS U1116 Inserm, Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

[4] Fédération de Recherche 3209, Nancy, France.

[5] CHU Nancy, Nancy, France.

[6] CIC 1433, Pierre Drouin, Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

*** Corresponding author**

Laurent Vallar, PhD
Genomics Research Unit
Centre de Recherche Public de la Santé (CRP-Santé)
84, Val Fleuri
L- 1526 Luxembourg
fax. + 352-26970-390
laurent.vallar@crp-sante.lu

Confidential

Introduction

Over the last decades, unhealthy lifestyles in developed countries greatly contributed to the yet uncontrolled rising incidence of obesity, dyslipidaemia, insulin resistance and diabetes. These pathological states often occur simultaneously in patients, mutually potentiating their deleterious impact on health, and form the basis of a so-called metabolic syndrome (MetS). This condition is a serious risk factor for the development of cardiovascular diseases, and is one of the leading causes explaining the increasing occurrence of chronic heart failure (HF) which nowadays represents an epidemic problem worldwide [1, 2]. Considerable efforts were made recently to define therapeutic strategies against HF, albeit with varying degrees of success as most of them target the disease once it already takes hold in people. In this context, approaches aiming at preventing or slowing the progression of MetS components upstream of HF before there are any manifestations of disease and at the stage where the disturbances are reversible represent attractive choices.

The physiopathological mechanisms leading to MetS and HF are complex and involve a multiplicity of factors [3, 4]. A typical common trait in these conditions is the increased production of the mineralocorticoid hormone aldosterone by suprarenal glands that results in the excessive activation of its natural receptor, the mineralocorticoid receptor (MR) [5-7]. The primary role of aldosterone in the body is the regulation of the water-salt balance by kidneys which is an essential process in the maintenance of blood pressure homeostasis [8]. Aldosterone binding to MR induces increased water retention, sodium reabsorption, potassium secretion, and increased blood pressure. Aldosterone activity is not limited to kidneys but is also present in many other organs and tissues where the MR is expressed [9, 10], as in the heart [11] and adipose tissue [12]. The hormone is thought to stimulate collagen production by cardiac and vascular smooth muscle cells thereby contributing to an increased vascular resistance and blood pressure [13]. Moreover aldosterone was shown to participate in the maturation of adipocytes by inducing the up-regulation of several differentiation genes [14]. Considering the broad spectrum of activities of aldosterone, it is not surprising that the hormone has marked pathogenic effects when it is deregulated. Primary hyperaldosteronism was shown to participate actively in the development and progression of renal [15] and cardiovascular diseases [16, 17] as well as of obesity [18, 19]. Pathological levels of aldosterone promote the expression of pro-hypertrophic and pro-fibrotic genes participating in the

Confidential

injury of the cardiac tissue [20]. Furthermore, adipocytes from obese individuals were proven to produce aldosterone thereby themselves contributing to hormonal excess and favouring the emergence of MetS and cardiovascular complications [6]. Of note in this context, the pleiotropic deleterious role of aldosterone in both metabolic and cardiovascular diseases was reinforced by results from several large clinical trials showing that the use of MR antagonists (MRA) on top of the standard therapy for HF reduced patient morbi-mortality (RALES and EPHESUS clinical studies; [21, 22]. Moreover, MRA is able to mitigate MetS features in humans and animal models of MetS [23, 24].

Based on this data, we postulated that targeting the MetS risk factors by antagonizing the MR before the first signs of cardiac alteration appear, would be an effective strategy to prevent or delay HF. In a preliminary study, we showed that the Spontaneously Hypertensive Heart Failure rat strain exhibits typical metabolic, cardiac and renal features that make it a good model for such purpose. When bearing a mutation in the leptin receptor gene, SHHF rats ($SHHF^{cp/cp}$) rapidly develop obesity which together with early hyperaldosteronism, blood hyperlipidaemia, and insulin resistance contributes importantly to their faster progression to cardiac failure as compared to the non-mutated, lean animals ($SHHF^{+/+}$) [25]. We next provided experimental evidences that the early long-term oral treatment of the $SHHF^{cp/cp}$ rats with the MRA Eplerenone mitigates rat obesity and dyslipidaemia, and is associated with a significant improvement of several important cardiac parameters, including reduced left ventricular hypertrophy, dilation and fibrosis, which contributed to better diastolic and systolic functions. As a clear benefit, obese SHHF rats receiving chronic monotherapy based on Eplerenone showed a delayed progression to HF associated with a better survival as compared to untreated animals [Youcef G. et al. 2014 Hypertension under review].

Following up on this data, we here further characterize in a comprehensive manner the molecular functions that are altered in the heart and visceral adipose tissues of $SHHF^{cp/cp}$ rats as MetS develops and progresses towards HF. Using paired tissue transcriptome and miRNome analysis coupled with a systematic bioinformatics exploration of expression data, we also address by which mechanisms Eplerenone may exerts its therapeutic activity. We provide here evidences that the alteration of phenotypic parameters in $SHHF^{cp/cp}$ animals is accompanied by a marked inhibition of fatty acid oxidation and exacerbation of inflammatory and tissue remodelling processes.

Confidential

87 Interestingly, we show that these functions are fully protected in the rat heart upon chronic MR
88 blockade with Eplerenone leading to genomics profiles that perfectly resemble those found in lean
89 animals. Finally, we identify sets of genes and miRNAs as key elements in MetS pathophysiology
90 and progression to HF and propose them as potential therapeutic target or biomarkers.

91

Confidential

Materials and Methods

Study design and living animal phenotyping

Lean and obese Spontaneously Hypertensive Heart Failure rats (hereinafter referred to as $SHHF^{+/+}$ and $SHHF^{cp/cp}$, respectively) were chronically treated with the aldosterone receptor antagonist 100 mg/kg/day Eplerenone (Eple) or a placebo placed in drinking water for a total period of 11 months starting at the age of 1.5 months (Figure 1). Over the time of the study the animals were regularly monitored for several phenotypic parameters, including morphometric (body mass, tibia length), cardiac morphology (left ventricle mass (LV mass) left ventricle internal diameter at end systole (LVIDs), left ventricle diameter at end diastole (LVIDs), posterior wall thickness (PWT), septum wall thickness (SWT), aortic diameter) cardiac function (fractional shortening fraction (FS), ejection fraction (EF), myocardial velocity associated with atrial contraction at the materal mitral annulus (Aa lat), systolic myocardial velocity at the lateral mitral annulus (Sa lat), late wave filing velocity (A vel), early wave filing deceleration time EDT)), renal (urine volume, urine osmolality, urine excretion of Ca^{2+}, of Cl^{-}, of Na^{+} and of K^{+}), and metabolic (serum cholesterol, triglycerides, high density lipoproteins (HDL, creatinemia, insulinemia, HOMA-insulin resistance index (HOMA-IR), adiponectin) parameters as described elsewhere [Youcef G. et al. 2014 Hypertension under review]. All animal experiments were performed according to current French regulations and to the principles expressed in the Helsinki Declaration, and were approved by the authors' institutional review boards (*Comité d'Éthique Lorrain en Matière d'Expérimentation Animale*, agreement n° 01886).

Tissue sample collection

Tissue samples were obtained from groups of lean and obese SHHF rats sacrificed at the initiation of the study (herein called $^{1.5}SHHF^{+/+}$ and $^{1.5}SHHF^{cp/cp}$, respectively), and at the end time point of the study (hereafter $^{12.5}SHHF^{+/+}$, $^{12.5}SHHF^{+/+}$Eple, $^{12.5}SHHF^{cp/cp}$, and $^{12.5}SHHF^{cp/cp}$Eple for untreated and treated lean, untreated and treated obese rats, respectively). Rapidly upon euthanasia of 16 h-fasted animals, perirenal visceral adipose tissue (VAT) was dissected bilaterally around the kidney while transverse section of the whole heart (right and left ventricles) was performed to obtain representative samples of the cardiac tissue (CT). Tissue sections were immediately rinsed

Confidential

120 in saline solution (0.9% NaCl), weighed, flash frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until
121 analyzed further analysis.

122 **Total RNA isolation and quality control**

123 Total RNAs were extracted from 300 mg of VAT using the Qiagen miRNeasy kit according to the
124 manufacturer's instructions. Cardiac total RNAs were isolated from whole CT samples using the
125 standard TriZol (Invitrogen) protocol provided by the manufacturer. RNA purity and integrity
126 were monitored using NanoDrop® ND-1000 spectrophotometer and Agilent 2100 Bioanalyzer
127 with RNA 6000 Nano assay kit. Only RNAs with no sign of contamination or marked degradation
128 (RIN > 8) were considered good quality and used for further analysis.

129 **Tissue mRNA and miRNA expression profiling**

130 Each individual total RNA extract was used to determine messenger RNA (mRNA) as well as
131 microRNA (miRNA) expression levels using Affymetrix GeneChip Rat Exon 1.0 ST and
132 GeneChip miRNA 2.0 arrays, respectively. For mRNA profiling experiments, 250 ng of total
133 RNAs were reverse transcribed into cDNA, then transcribed into cRNAs and labeled into
134 biotinylated cRNA using the GeneChip WT PLUS Reagent kit (Affymetrix) according to the
135 manufacturer's standard protocols (P/N 4425209 Rev.B 05/2009 and P/N 702808 Rev.6). Labelled
136 cRNA products were randomly fragmented and hybridized onto Affymetrix Exon GeneChips.
137 MiRNA expression experiments were performed using 500 ng of total RNA that were directly
138 labelled using the Genesphere FlashTag Biotin HSR Labelling kit according to the manufacturer's
139 instructions (P/N 703095 Rev.1). Appropriate RNA labelling was confirmed using the Enzyme
140 Linked Oligosorbent Assay (ELOSA) QC Assay provided by Affymetrix. MiRNAs were poly(A)-
141 tailed, ligated to a biotin-labelled DNA and then hybridized onto the Affymetrix miRNA
142 GeneChips. Upon hybridization, arrays were washed and stained using the Affymetrix GeneChip
143 WT Terminal Labelling and Hybridization kit, before being scanned using a GeneChip Scanner
144 3000.

145 **Microarray data analysis**

146 mRNA and miRNA microarray data were analysed using two distinct procedures. Briefly, CEL
147 files generated after array scanning were imported into the Partek Genomics Suite™ (GS) 6.6 for
148 a preprocessing step aiming at estimating transcript cluster expression levels from raw probe

Confidential

149 intensity values. For this purpose, Partek was configured with default options for cardiac mRNA
150 data analysis and with robust multi-array (RMA) background correction for all other datasets.
151 Resulting expression data were then imported into R statistical environment (http://www.R-
152 project.org/) for further analysis. First nonspecific filtering was applied to remove non informative
153 or irrelevant transcript clusters (*ie* mRNA clusters with no specified chromosome location or
154 miRNA clusters not related to Rattus norvegicus). Then, box plots, density plots, relative log
155 expressions (RLEs), and sample pairwise correlations were generated to assess the quality of the
156 data. Principal component analysis (PCA) was used to identify interindividual sample variability
157 and outliers within the datasets. Finally, the LIMMA package (R/Bioconductor) was used to detect
158 differentially expressed mRNA (DE mRNAs) and miRNAs (DE miRNAs) considering various
159 contrasts ($^{1.5}$SHHF$^{cp/cp}$ vs. $^{1.5}$SHHF$^{+/+}$, $^{12.5}$SHHF$^{cp/cp}$ vs. $^{12.5}$SHHF$^{+/+}$, $^{12.5}$SHHF$^{cp/cp}$Eple vs.
160 $^{12.5}$SHHF$^{+/+}$Eple, $^{12.5}$SHHF$^{+/+}$ vs. $^{1.5}$SHHF$^{+/+}$, $^{12.5}$SHHF$^{cp/cp}$ vs. $^{1.5}$SHHF$^{cp/cp}$, $^{12.5}$SHHF$^{cp/cp}$Eple vs.
161 $^{12.5}$SHHF$^{cp/cp}$, $^{12.5}$SHHF$^{+/+}$Eple vs. $^{12.5}$SHHF$^{+/+}$). A linear model and empirical Bayes method were
162 used to calculate the statistical significance of the differential mRNA and miRNA expression data
163 obtained for each contrast. Resulting p values were adjusted for multiple testing errors using the
164 Benjamini and Hochberg's false discovery rate (FDR) [26]. Elements (mRNAs or miRNAs) with
165 FDR less than 0.05 were considered as DE, irrespective of the fold-change. Because of the high
166 intragroup variability observed within the cardiac tissue miRNA expression profiles, a non-
167 parametric method called RankProd was specifically applied to this data to detect DE miRNAs
168 [27].With this method, differences in miRNA expression were considered as significant when the
169 associated Percentage of False Prediction (PFP) was lower than 0.05. For the sake of simplicity,
170 PFP was considered as being equivalent to FDR in this paper. Microarray expression data are
171 available at ArrayExpress (http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/) under the accession number [E-
172 MTAB-XXXX].

173 **Data exploration and mining**

174 Lists of DE mRNA (FDR<0.05) obtained throughout the study were uploaded in the Ingenuity
175 Pathway Analysis bioinformatics tool (Ingenuity Systems, www.ingenuity.com) for further
176 functional analysis based on the IPA knowledge library. The significance of the association
177 between each list and functions or canonical pathways was measured by Fisher's exact test. As a
178 result, a p-value was obtained, determining the probability that the association between the genes

Confidential

179 in our data set and a function or canonical pathway can be explained by chance alone.
180 Transcriptional gene regulatory networks were built by integrating our experimental miRNA
181 expression data and by interconnecting DE miRNA and mRNA elements based on the molecular
182 relationship repertoire referenced in the IPA knowledge library. The IPA Upstream Regulator
183 Analytic tool was also used to infer the transcriptional regulators that could explain the
184 experimental gene expression patterns, predict their activation state, and determine the biological
185 functions affected by the regulatory cascade.

186 **Correlation analysis**

187 The CoExpress software tool [28] was used to analyse the statistical linkage between mRNA and
188 miRNA expression data, or between phenotypic data and combined mRNA/miRNA expression
189 data. Correlation matrices were built from the full sets of microarray and phenotypic raw data
190 allowing the identification of the correlated and anti-correlated profiles with an absolute Pearson
191 correlation coefficient $|r| > 0.8$.

192

Confidential

Results

Transcriptome and miRNome profiling

We recently reported that obese Spontaneously Hypertensive Heart Failure ($SHHF^{cp/cp}$) rats display typical cardiac, renal and metabolic phenotypic features that form the basis for the development of a metabolic syndrome (SMet) with premature heart failure (HF) as compared to lean control ($SHHF^{+/+}$) animals [25]. Furthermore we provided experimental evidences showing that long-term treatment with the aldosterone receptor antagonist Eplerenone mitigated significantly $SHHF^{cp/cp}$ rat obesity, dyslipidaemia and cardiac impairments resulting in a delayed progression to HF in these animals [Youcef G. et al. Hypertension 2014, under review]. To further characterize at the molecular level the phenotype of the SHHF animal model and get a better view of the biological mechanisms impacted by Eplerenone, we analysed both the transcriptome and miRNome profiles in the lean and obese SHHF rats from our initial study. Since Eplerenone treatment particularly improved obesity-related traits and protected animals from faster cardiac alterations, we focused our analysis on the visceral white adipose tissue (VAT) and cardiac tissue (CT). For each tissue, several independent samples were used for a paired mRNA and miRNA profiling with two distinct microarray platforms.

Principal component analysis (PCA) was first performed to characterise the expression datasets. As shown on Figure 1Sa, both mRNA and miRNA datasets obtained for VAT and CT led to comparable PCA patterns for the different animal groups. As revealed by the size of the ellipses in the charts, variability in data was frequently more pronounced in obese rats than in lean counterparts, as well as in old animals compared to the younger ones. A clear discrimination was obtained between young and old rats, and to a lesser extent, between obese and lean animals. Although more subtle, the differentiation of the group of rats treated with eplerenone was also feasible from the representation of PCA data. Analysis of variance (ANOVA) performed with array data confirmed this result and showed that factors contributing the most to the variation across all experimental variables were mainly the animal age and genotype (Figure 1Sb). A stronger contribution of genotype as compared to aging was observed only with mRNA expression data from VAT endorsing the critical importance of this factor in altering adipose tissue transcriptome. The “treatment” factor was found significant to the overall transcriptome and miRNome from only cardiac tissue whereas it was not detectable in all other conditions. In

Confidential

223 agreement with these results significance analysis performed with expression data considering a
224 false discovery rate (FDR) < 5 % resulted in lists of differentially expressed mRNAs or miRNAs
225 of varying importance depending on the animal group and tissue type (Table 1). Relatively large
226 differences in mRNAs and miRNAs expression were found in association with aging in both VAT
227 and CT as compared to the total number of elements targeted by array platforms. Genotype also
228 deeply affected the VAT transcriptome, but had a lesser impact on the CT transcriptome or on both
229 tissue miRNomes. Interestingly treatment influence was only clearly visible on the cardiac
230 transcriptome in $SHHF^{cp/cp}$ rats, whereas it had very little impact on the cardiac miRNomes in
231 these animals. In $SHHF^{+/+}$ rats, treatment had a slight significant effect on the VAT miRNomes,
232 but was not associated with any differential expression in the VAT and CT transcriptomes as well
233 as in the CT miRNome.

234 Altogether, our results showed that mRNA and miRNA expression data obtained from SHHF
235 animals throughout the study was good quality and led to the identification of sets of genes and
236 miRNAs specifically associated with rat aging, phenotype or treatment status, and large enough to
237 allow further functional analysis. Importantly, our data revealed that, contrary to aging and
238 genotype factors which broadly altered mRNA and miRNA expression patterns both in CT and
239 VAT compartments, Eplerenone treatment had a more specific effect mainly focused on cardiac
240 transcriptome in obese rats.

241 **Integrative analysis of phenome, transcriptome, and miRNome data**

242 In an attempt to identify possible links between the mRNA and miRNA expression data derived
243 from the different groups of SHHF rats and the numerous phenotypic data collected during the
244 follow-up of these animals, we performed a correlation study using CoExpress, an in-house
245 developed program. Profiles of entire set of phenotypic data, including morphometric, functional,
246 and metabolic parameters recorded in all animals at various time points was compared to those of
247 the whole sets of genomics data. This resulted in the identification of pairs of phenotypic
248 parameters and genes/miRNAs which were found statistically correlated or anti-correlated with an
249 absolute correlation coefficient $|r| > 0.8$ (Figure 2a). Based on this approach, association patterns
250 were generated providing the lists of mRNAs and miRNAs whose expression patterns were found
251 strongly correlated with the profile of each individual phenotypic parameter in all studied
252 conditions (Figure 2b). Remarkably, these profiles were found tissue-specific and were shown to

Confidential

253 implicate distinct sets of genomic elements (supplementary table 1). Very little overlap between
254 them was found, not only between individual tissue transcripomes/miRNomes and the various
255 phenotypic parameters, but also between each individual phenotypic parameter and the various
256 tissue transcripomes or miRNomes. As expected from biological knowledge, a strong statistical
257 association was found between numerous mRNAs and miRNAs expressed in CT and some, but
258 not all, cardiac morphometric parameters (heart mass, LV mass, LVIDd, LVIDs, aortic diameter,
259 PWT, SWT) . Similarly, elements from the VAT transcriptomes and miRNomes were found
260 associated with obesity-related metabolic parameters (HDL, cholesterol, insulinemia).
261 Interestingly, distinct morphometric and renal parameters were also associated to CT and VAT
262 genomic elements highlighting the complex interplay that took place between the heart, adipose
263 tissue and kidney compartments as SMet progressed towards HF in our animals.

264 Altogether, our results confirmed that the mRNA/miRNA expression profiles generated
265 throughout the study were fully representative of the physiopathological modifications that
266 progressively took place in the SHHF rats according to their age, genotype or treatment status.

267 **Typical genomics traits of untreated obese SHHF$^{cp/cp}$ rats**

268 We recently showed that the obese SHHF$^{cp/cp}$ rats exhibit early hyperaldosteronism and body
269 overweight, and progressively develop, as they age, severe obesity, dyslipidaemia, insulin
270 resistance, cardiac alterations (fibrosis, left ventricle hypertrophy, dilatation and dysfunction) that
271 together contribute importantly to the faster progression of the animals to cardiac failure as
272 compared to the SHHF$^{+/+}$ animals [25]. Following up on this data, we further investigated the
273 contribution of the transcriptome and miRNome to this phenotype and determine the biological
274 functions that were impacted in the SHHF$^{cp/cp}$ rats by exploring the corresponding VAT and CT
275 mRNA and miRNA expression profiles compared to those of the lean counterparts. For this
276 purpose, we considered the lists of significantly differentially expressed genes (DEG) established
277 by comparing the transcriptomes of VAT or CT obtained from obese rats with those from lean
278 animals at the initiation and end of the sudy (empirical Bayes/LIMMA, FDR < 0.05, any fold
279 change) (Figures 3a and 3b). Using the Ingenuity Pathway Analysis (IPA) tool, we found that the
280 more significantly enriched biological functions within the up-regulated or down-regulated DEGs
281 list from young rat VAT were related to adipose tissue adipogenesis (cell proliferation, cell
282 movement, angiogenesis, lipid and fatty acid metabolism) or differentiation (contractility-related

Confidential

283 functions, glycolysis), respectively (Figure 3a). Biological functions enriched in up-regulated
284 DEG lists from old rat VAT were linked to tissue remodelling (cell death, necrosis, apoptosis, cell
285 movement), and inflammation, whereas those found enriched from down-regulated DEGs were
286 mainly related to cell signalling, molecule transport, and glucose metabolism (Figure 3b). Impact
287 of aging on SHHF$^{cp/cp}$ rat VAT transcriptome was also visible by directly comparing the expression
288 data obtained for the animals at the beginning and end of the study (Figure 3c). Of note functions
289 derived from DEGs found down-regulated in this contrast were strongly related to lipid/fatty acid
290 metabolism (synthesis, transport, and oxidation) while up-regulated genes were linked to tissue
291 remodelling (cell death, cell movement, proliferation of cells, necrosis proliferation of T
292 lymphocytes, apoptosis).

293 We analysed the functions enriched in the transcriptome profiles of the cardiac tissue using the
294 same approach, and found that ion/molecule transport and secretion of triacylglycerol were
295 impacted early while functions relative to the cell organization and glycolysis were affected lately
296 in SHHF$^{cp/cp}$ vs SHHF$^{+/+}$ rats (Figure 4a). Functions associated with up-regulated DEGs in old vs
297 young obese rats were all indicative of a marked tissue suffering (cell death, cell apoptosis,
298 necrosis) and remodelling (cell differentiation, proliferation, organization, and movement),
299 whereas those derived from down-regulated DEGs were mainly related to the metabolism of
300 energy substrate in the heart, particularly fatty acid substrate (oxidation of fatty acid and lipids, β-
301 oxidation of fatty acid), electrolyte balance (transport of cation), and remodelling (Figure 4b).
302 Intriguingly when considering the marked hyperaldosteronism characterizing the obese rats, IPA
303 analysis did not return any biological functions directly related to aldosterone activity. A detailed
304 review of relevant pathways available from the IPA knowledge library (renin-angiotensin,
305 aldosterone biosynthesis, aldosterone/mineralocorticoid signalling) revealed that only few genes
306 within these pathways were found DE in our experimental data which were not sufficient to
307 achieve a significant level of enrichment in our functional analysis (supplemental data).

308 Altogether microarray results consolidated and expanded our previous phenotypic data obtained
309 in SHHF$^{cp/cp}$ rats showing in these animals: *i*) an overweight at the age of 1.5 months suggesting
310 the early expansion of adipose tissue, *ii*) the age-related progression to an inflammatory state
311 evidenced in VAT of old rats by marked remodelling and fibrosis, and *iii*) the pronounced cardiac
312 tissue hypertrophy and remodelling associated with functional alterations evidenced at 12.5

Confidential

313 months of age [Youcef et al. Hypertension 2014]. Here genomics data provided additional
314 evidences that support: *i*) an early expression of genes involved in SHHF$^{cp/cp}$ VAT tissue expansion
315 and storage capacity moving over time towards the over-expression of genes involved in VAT
316 remodelling and fibrosis, and *ii*) the marked repression of functions related to lipid and fatty acid
317 metabolism in VAT obtained from aged SHHF$^{cp/cp}$ animals. This was associated in cardiac tissue
318 with: *iii*) an overexpression of genes involved in the transport of cations and triacylglycelrol in the
319 heart of young SHHF$^{cp/cp}$ rats, corroborating the early onset of mechanisms that contribute to
320 energy metabolism deficiency, and *iv*) the pronounced overexpression of genes involved in tissue
321 remodelling accompanied by marked alteration of normal energy metabolism through fatty acid
322 metabolism in aged SHHF$^{cp/cp}$ animals.

323 **Impact of Eplerenone on the transcriptome of obese SHHF$^{cp/cp}$ rats**

324 We next analysed the biological functions associated with the genes found DE in the transcriptome
325 of the rats treated for 11 months with Eplerenone. As no significant impact of the treatment was
326 visible in the expression data established for lean SHHF $^{+/+}$ rats or for the VAT obtained from both
327 animal strains, we focused our analysis on the cardiac transcriptome and miRNome of obese rats
328 compared to that of untreated obese animals, as determined at the end of the treatment. Functional
329 analysis of the 147 up- and 267 down-regulated genes in IPA revealed a strong enrichment in
330 biological processes involved, on one hand, in fatty acid beta-oxidation, and on the other hand, in
331 inflammation (leukocyte migration, activation, migration and proliferation of cells), in tissue
332 necrosis and remodelling (cell death/apoptosis, development of cardiovascular system) (Figure 5).
333 Similar to what was observed previously with untreated obese animals, no functions related to
334 aldosterone activity or blockade was identified through our analysis, the number of DEGS
335 involved in these functions being too low in our dataset to achieve a significant level of enrichment.

336 As a follow up, we used the Upstream Regulator Analytic tool in IPA to define which set of
337 transcriptional regulators, namely miRNAs and transcription factors (TFs), might explain the
338 changes in gene expression monitored in the CT of treated obese rats. Based on the corresponding
339 experimental gene and miRNA expression profiles and IPA knowledge database, the analysis
340 allowed us to further predict whether these upstream regulators were likely activated or inhibited,
341 and how they might interact with one another and with their targets thereby generating several
342 gene regulatory networks (Figure 6). When considering the DE mRNAs and miRNAs from the CT

Confidential

343 of the treated rats ($^{12.5}$SHHF$^{cp/cp}$ Eple vs $^{12.5}$SHHF$^{cp/cp}$), we identified two main networks. The first
344 bridged the transcription regulator PPARγ and several genes, two of them (ACADSB and HADH)
345 potentially being under the transcriptional repression of miR-31-5p. This network was predicted
346 as being activated, implicating an enhanced lipid and fatty acid oxidation in the CT of treated obese
347 rats (Figure 6 d). The second gene regulatory network was found under the control of NFκB, TGF-
348 β receptor 2 (TGFBR2), miR-146a-5p and miR-31-5p and predicted as being inhibited, possibly
349 leading to a reduced cell movement and fibrogenesis in treated animals (Figure 6b). Interestingly,
350 when analysing CT expression data from untreated obese rats ($^{12.5}$SHHF$^{cp/cp}$ vs $^{1.5}$SHHF$^{cp/cp}$), two
351 similar networks targeting the same biological functions were identified presenting a fully opposite
352 activation state (Figure 6a and 6b). Moreover, these networks were found to involve several
353 additional target genes and miRNAs as compared to those identified for the treated animals.

354 Following up on this data, we took advantage of the biological knowledge library available from
355 Ingenuity to identify by which pathway Eplerenone could impact on lipid metabolism. Considering
356 all the known biological interactions referenced by IPA, we built a network by bridging, on one
357 side, the Eplerenone/NR3C2 pathway, and, on the other side, the genes participating in lipid and
358 fatty acid metabolism that were found DE in our study. Although hypothetical, many possible
359 molecular intermediates were retrieved by IPA, some of them being significantly DE in our data
360 set, including TGFβ, VEGFβ and NCF1 (Figure 7).

361 In summary, our data suggested that long-term Eplerenone treatment in obese rats might act by
362 specifically modulating some key target genes and miRNAs in the myocardium, thus contributing
363 to prevent or slow down the alterations seen in untreated obese animals through an attenuation of
364 the inflammatory remodelling processes and a preservation, at least partial, of the normal use of
365 fatty acids as energetic substrates. These are in good agreement with our previous report showing
366 that SHHF$^{cp/cp}$ rats treated with Eplerenone display cardiac structural and functional phenotypic
367 traits almost comparable to those observed in SHHF$^{+/+}$ animals, with markedly reduced
368 remodelling, hypertrophy and fibrosis and delayed HF as compared to untreated SHHF$^{cp/cp}$ rats
369 [Youcef et al. Hypertension 2014 under review]. To our best knowledge, our study is the first to
370 provide evidences that support a cardioprotective effect of Eplerenone in a context of MetS by
371 targeting heart energy and remodelling functions.

Confidential

372

Discussion

In this study, we undertook a genome-wide analysis of the transcriptomes and miRNomes of cardiac and visceral adipose tissues obtained from SHHF rats treated with Eplerenone or a placebo during the development of MetS and progression to HF. Coexpression analysis of phenome and transcriptome/miRNome data allowed us to identify tissue-specific sets of genes and miRNAs whose expression was strongly statistically correlated with some specific phenotypic parameters. Using expression data mining tools, we showed that: *i*) the onset of obesity and progression of MetS in obese $SHHF^{cp/cp}$ rats were associated with an alteration of genes involved in lipid metabolism and fatty acid oxidation as well as inflammatory and tissue remodelling processes both in the heart and in visceral adipose tissue, *ii*) Eplerenone enabled the preservation of these functions in the heart of treated animals thereby delaying HF onset. Finally, we uncovered the importance of two key gene regulatory networks associated with the biological functions that are altered in MetS, and we identified pathways by which Eplerenone may exert on them its activity.

The simultaneous analysis of cardiac and visceral fat transcriptomes and miRNomes allowed us to identify the main sequences of alterations occurring as MetS and HF progress in untreated animals, and to disclose the respective impact on them of the main variability factors affecting the expression profiles, namely rat genotype and aging. Among them, aging was found as the most predominant factor impacting on the transcriptomes and miRNomes in quite all conditions with the exception of the adipose tissue transcriptome which was strongly influenced by rat genotype. This data indicated that adipose tissue alterations occurred very early in obese animals as a consequence of the constitutive mutation in the leptin receptor gene ("cp"), thereafter leading to the accumulation of structural and functional injuries in the heart. This conclusion was also supported by our preliminary phenotypic data showing the very early gain in body weight and blood hyperlipidaemia in the obese $^{1.5}SHHF^{cp/cp}$ rats as compared to the lean $^{1.5}SHHF^{+/+}$ animals [Youcef et al . Hypertension 2014]. The analysis of the transcriptome profile of VAT from young obese rats ($^{1.5}SHHF^{cp/cp}$ vs. $^{1.5}SHHF^{+/+}$) revealed changes in gene expression suggesting an exacerbated maturation of adipocytes with the over-expression of genes implicated in lipid metabolism and the down-regulation of genes involved in myogenic traits. Such transcriptome signature was reported in studies showing that development of obesity involves the maturation of

Confidential

403 the so-called brown adipocytes expressing myogenic genes into white adipocytes storing lipids
404 and contributing to body weight gain [29, 30]. Interestingly, aging of obese rats was associated
405 with the down-regulation of numerous genes involved in fatty acid oxidation. The development of
406 a hypometabolic state in the adipose tissue as a result of obesity progression was already described
407 [31]. Although the precise mechanism by which this phenotype takes place is not yet understood,
408 some studies suggested that it could involve local infiltrating macrophages [32, 33]. In our study,
409 we identified PPARγ and SIRT2 as main regulators of the gene network that may lead to the
410 reduced metabolic activity of obese rat adipose tissue. Mirs-30c, -17, and -130a were predicted to
411 participate in this network by repressing the transcription of PPARγ, miR-130-a being found up-
412 regulated in our expression data. Of note, very recent data showed that the overexpression of miR-
413 130a in db/db mice with hepatic steatosis leads to the repression of fatty acid synthase expression,
414 leading to an abrogation of lipid accumulation in hepatocytes [34]. Authors from this study
415 proposed a regulatory pathway centred on PPARγ similar to that identified in our study.

416 The transcriptome profiles of VAT from aged obese rats ($^{12.5}$SHHF$^{cp/cp}$ vs. $^{12.5}$SHHF$^{+/+}$) also
417 displayed marked alterations in functions related to inflammatory and tissue remodelling
418 processes. Important genes such as MMP-2 and MMP-9 which are key players in tissue fibrosis
419 and remodelling [35, 36], or IFNγR2 in inflammation, were all found over-expressed in our dataset.
420 Within the regulatory network established for this contrast, IFNγ was identified as a possible
421 central regulator. In good agreement with our results, literature data showed that IFNγ plays an
422 important role in the regulation of the inflammatory process associated with obesity [37, 38]. We
423 further identified miR-29 as a possible transcriptional regulator of IFNγ. Such an interaction
424 between IFNγ and miR-29 was already observed in several experimental settings [39, 40], but was
425 never described in adipocytes in the context of obesity. Altogether, our data indicated that
426 development of obesity in SHHF$^{cp/cp}$ rats is associated with an early enhanced maturation of
427 adipocytes within the adipose tissue where metabolic function involved in fatty acid oxidation is
428 initially exacerbated before being progressively repressed. In the meantime inflammatory
429 processes develop and secondarily would favour tissue fibrosis and remodelling.

430

Confidential

While $^{1.5}$SHHF$^{cp/cp}$ and $^{1.5}$SHHF$^{+/+}$ animals displayed similar phenotypic cardiac traits showing unaltered myocardial structures and functions, we found that cardiac transcriptome from SHHF$^{cp/cp}$ rats at this stage already showed gene expression changes affecting mainly the molecular transport of ion and triacylglycerol. This result suggested an early shift in the transport and use of energy substrate in the heart of $^{1.5}$SHHF$^{cp/cp}$ animals. Such a phenomenon was observed in the context of an obesity induced by the administration of a high-fat diet, as well as in animal models of obesity (ob/ob or db/db mice), suggesting that abnormal myocardial substrate utilization is caused by an increase in substrate availability [41-43]. Alteration in myocardial energetics was reported as the earliest abnormality measurable in the heart, preceding the modifications of cardiac functions, thereby indicating that it could be a critical mediator of the structural and functional cardiac impairments observed lately in obesity and MetS [44]. Remarkably in this context, CT from aged untreated animals displayed transcriptome changes indicative of marked inflammation, tissue remodelling, and exacerbated alteration of cardiac energy metabolism. This notably included a lower expression of genes involved in the transport of lipid and oxidation of fatty acids (FABP, DGAT, AGPAT, LIPE, LPIN1, EHHADH) as well as in the preparatory phase of glycolysis (utilization of ATP by the myocardium), concomitant with a higher expression of genes involved in the so-called payoff phase (production of ATP by the myocardium) of glycolysis (Figure 8).

The down-regulation of genes involved in the beta-oxidation of fatty acids concomitant with the up-regulation of genes implicated in glycolysis is a well-documented feature of cardiomyopathy and HF [45-47]. Moreover, fatty acid oxidation is known to be differentially modulated in the myocardium as a consequence of obesity, and be repressed in the muscles of obese patients [48, 49]. This data are in good agreement with our observations showing that impaired cardiac fatty acid beta-oxidation occurred in the untreated SHHF$^{cp/cp}$ rats when the animals exhibited a morbid obesity and evidences of heart failure. Fatty acids are the main source of energy in the normal heart, undergoing β-oxidation in myocardial mitochondria to produce ATP energy [50]. The process ensures a better energy efficiency as compared to glucose, but requires more oxygen supply. In HF condition, the incapacity of the heart to fulfil the demand of the organism leads to energy starvation in the failing myocardium. As a very early adaptive mechanism, myocardial cells switch from fatty acids oxidation to glucose oxidation. When HF progresses further, this metabolic adaptation becomes however insufficient leading even to a lower capacity of the heart to oxidize glucose, and to a dramatic decrease in fatty acid oxidation as observed during end-stage HF [51].

Confidential

462 Thus, regulation of myocardial energetics appears as a critical factor in cardiac remodelling,
463 hypertrophy and function.

464

465 Chronic long-term treatment with Eplerenone produced distinct effects on the visceral adipose
466 tissue and heart of SHHF$^{cp/cp}$ rats as illustrated by differences observed in mRNA and miRNA
467 expression profiles determined at the end of the follow-up study. No treatment signature was
468 detected in the transcriptome or miRNome of rat VAT at this time point. This result was surprising
469 considering that treatment led to a significant reduction in obesity and adipocyte hypertrophy in
470 the animals [Youcef et al. 2014 Hypertension], in good agreement with literature data
471 demonstrating the anti-adipogenic activity of MR antagonists including Eplerenone [52-55].
472 Several reasons may account for this result. First, it is probable that Eplerenone impact on adipose
473 tissue transcriptome and miRNome occurred rapidly after the initiation of the treatment and was
474 limited in time. Supporting this hypothesis, several studies showed that Eplerenone induces rapid
475 transcriptome changes occurring within hours to days [12, 56]. Moreover, aldosterone antagonism
476 might be restricted to a fraction of adipocytes within the VAT, being effective only in immature
477 cells before the initiation of adipogenesis processes. This assumption is supported by our previous
478 observation showing that the initial difference in body weight between obese and lean rats did not
479 amplify over time, but remained constant until the end of the study [Youcef et al. 2014
480 Hypertension)]. The results of a randomized clinical study showing no weight loss in patients with
481 a pre-existing obesity as they were treated with an aldosterone antagonist also provides indirect
482 support for this hypothesis [57]

483 Contrary to VAT, the cardiac transcriptome and miRNome of obese rats was significantly affected
484 by chronic treatment with Eplerenone, in good agreement with our phenotypic data showing the
485 relative preservation of cardiac structure and function in treated animals. Expression profiles
486 established in this condition were indicative of a stimulation of fatty acid beta-oxidation and
487 preparatory phase of glycolysis associated with a parallel inhibition of the glycolytic payoff phase
488 (Figure 8, right panel). This created a normalized physiological environment close to that found in
489 the lean SHHF rats, thereby generating cardioprotective effects in the heart. Characterized through
490 upstream regulator analysis, the gene network predicted to be favourably impacted by Eplerenone
491 were found to involve PPARγ and miR-31 as key regulatory elements. To our best knowledge,

Confidential

492 such result was never reported before with Eplerenone. Noteworthy in this context, Ramirez *et al.*
493 recently reported contradictory data showing that Eplerenone led to a diminished cardiac steatosis
494 in Zucker diabetic fatty (ZDF) rats developing a cardiomyopathy by reducing the expression of
495 genes implicated in fatty acid accumulation and oxidation [58]. Several sources of divergence
496 between this study and ours might explain those contradictory findings. Contrary to ZDF animals
497 which show diabetes and hyperglycaemia, we never noticed any change in fasting glycaemia in
498 $SHHF^{cp/cp}$ rats during the time course of our study [25] and [Youcef G et al. Hypertension 2014].
499 It is conceivable that the confounding effects of obesity and hyperglycaemia in the ZDF rats lead
500 to specific biological perturbations in relation with high blood glucose availability in these
501 animals. In agreement with this hypothesis, several studies showed that hyperglycaemia actually
502 plays a critical role in the alteration of fatty acid oxidation in the myocardium [59], and that anti-
503 diabetic drugs like metformin are able to restore myocardial fatty acid metabolism in
504 cardiomyopathies and HF [34, 60]. Another confounding factor between the two rat models is
505 hypertension. ZDF animals are not hypertensive, while SHHF rats typically display a severe
506 hypertension which exacerbate importantly neuro-endocrine activity and cardiac workload
507 thereafter impacting differently energy management in the failing myocardium [61]. Thus, the
508 modulation of energy metabolism in the heart may be different depending on the cardiac stimuli
509 and how Eplerenone acts on them.

510 We also showed that Eplerenone treatment prevented the deleterious expression of numerous
511 genes involved in the extracellular matrix remodelling and inflammation in the heart of obese rats.
512 These results are in accordance with previous studies showing the role played by the MR in those
513 processes and the beneficial impact of aldosterone antagonism in preventing them [22, 62-65]. Our
514 data revealed that TGFβR2 and NFκB might play a central role in modulating the expression of
515 TIMP1, FN1, and GRK5, three genes known to be involved in myocardial remodelling. Moreover,
516 several of the miRNAs predicted as upstream regulators in this gene network were previously
517 implicated in cardiac pathophysiology. They included miR-21-5p which promotes cardiac
518 hypertrophy and fibrogenesis [66, 67], miR-181a-5p which contributes importantly to cardiac
519 hypertrophy, cell stress and proliferation [68, 69], and miR-130a-3p which participates in cardiac
520 development [2]. Interestingly, six other miRNAs, including miR-672, miR-34b*, miR-31, miR-
521 31*, miR-146b, and miR-147, were all found down-regulated in the myocardium of the treated
522 $SHHF^{cp/cp}$ rats. Although most of them with the exception of miR-672 were previously implicated

Confidential

523 in the development of cardiac disease [70-74] their association with aldosterone/MR signalling
524 pathway was not reported yet. Further analysis are still required to validate the pathways and
525 molecular players identified downstream of the action of Eplerenone, and ascertain their relevance
526 in the context of HF prevention.

527

Confidential

Acknowledgments

This work was supported by the *Fonds National de la Recherche* (AFR grant to GY) and the *Centre de Recherche Public de la Santé* (CRP-Santé) in Luxembourg, and by INSERM, the *Région Lorraine*, *FRM comité Lorrain*, and European Union FP7 FIBRO-TARGETS grant (agreement no: 602904).

Confidential

Disclosures

The authors have no conflicting interests.

Confidential

Figure legends

Figure 1: Design of the study.

SHHF$^{+/+}$ and SHHF$^{cp/cp}$ rats at 1.5 months of age were chronically treated for 11 consecutive months with the selective mineralocorticoid receptor antagonist eplerenone or with a placebo. Animal metabolic, renal and cardiovascular phenotypes were monitored on a regular basis during the study. The transcriptome and miRNome of the visceral adipose tissue (VAT) and cardiac tissue (CT) obtained from rats euthanatized at 1.5 and 12.5 month-old were analyzed using microarrays. Expression data were processed using statistical methods to generate lists of significant differentially expressed (DE) genes and miRNAs. DE elements were then analyzed using bioinformatics tools (IPA Ingenuity systems) and were compared to phenotypic data to get a comprehensive picture of the biological functions and gene regulatory networks impacted by the disease and treatment. **SHHF**, Spontaneously Hypertensive Heart Failure rats. The number of animal in each group is indicated.

Figure 2: Integrative correlation study between phenome, transcriptome and miRNome data.

a) A correlation study was performed using the CoExpress software by comparing gene and miRNA raw expression data to the entire set of phenome data. This resulted in the identification of pairs of phenotypic parameters and genes/miRNAs which were found statistically correlated or anti-correlated with an absolute Pearson correlation coefficient $|r| > 0.8$. The number of miRNAs/mRNAs correlating with each phenotypic trait is displayed on the graph.
b) Example of profile showing a strong statistical association between the mean values of the body mass as monitored in the various groups of animals (black line) and the expression data (green and red lines, each line represents a gene or a miRNA). **SHHF**, Spontaneously Hypertensive Heart Failure rats; **VAT**, visceral adipose tissue; **CT**, cardiac tissue.

Figure 3: Functional analysis derived from the VAT gene expression profiles of untreated obese SHHF$^{cp/cp}$ rats.

DEG in VAT were determined for different contrasts, resulting in specific expression profiles reflecting the influence on the transcriptome of the animal genotype at the initial (a) and end time point (b), as well as aging in obese SHHF$^{cp/cp}$ animals (c). The lists of DEG were then individually analysed in IPA software to determine the biological functions showing a statistical enrichment in either up-regulated or down-regulated genes. The significance of the association between each list and functions or canonical pathways was measured by Fisher's exact test. The resulting p-value is indicated for each function identified in the analysis. **SHHF**, Spontaneously Hypertensive Heart Failure rats; **VAT**, visceral adipose tissue; **CT**, cardiac tissue.

Figure 4: Functional analysis derived from the CT transcriptome profiles of untreated obese SHHF$^{cp/cp}$ rats.

Confidential

DEG in CT were determined for different contrasts, resulting in specific expression profiles reflecting the influence on the transcriptome of the animal genotype at the initial (a) and end time point (b), as well as

aging in obese SHHF$^{cp/cp}$ animals (c). The lists of DEG were then individually analysed in IPA software to determine the biological functions showing a statistical enrichment in either up-regulated or down-regulated genes. The significance of the association between each list and functions or canonical pathways was measured by Fisher's exact test. The resulting p-value is indicated for each function identified in the analysis. **SHHF**, Spontaneously Hypertensive Heart Failure rats; **VAT**, visceral adipose tissue; **CT**, cardiac tissue.

Figure 5: Functional analysis of CT based on the transcriptome profiles of treated obese SHHF$^{cp/cp}$ rats.

DEG were determined by comparing the CT transcriptome of treated SHHF$^{cp/cp}$ rats to that of untreated animals, resulting in a specific expression profile reflecting the influence of eplerenone on the transcriptome. The lists of DEG were then individually analysed in IPA software to determine the biological functions showing a statistical enrichment in either up-regulated or down-regulated genes. The significance of the association between each list and functions or canonical pathways was measured by Fisher's exact test. The resulting p-value is indicated for each function identified in the analysis. **SHHF**, Spontaneously Hypertensive Heart Failure rats; **VAT**, visceral adipose tissue; **CT**, cardiac tissue.

Figure 6: Gene regulatory networks impacted by eplerenone treatment in the cardiac tissue of the obese SHHF$^{cp/cp}$ rats as predicted by IPA.

Gene regulatory networks were derived from the analysis of the mRNAs and miRNAs found DE between treated and untreated SHHF$^{cp/cp}$ rats using the upstream regulator analytics procedure in IPA. The analysis resulted in the prediction of several transcriptional regulators, including miRNAs and transcription factors (TFs), which might explain the changes in the biological activities as monitored experimentally.

Figure 7: Possible pathways linking aldosterone to lipid metabolism as determined in IPA.

The possible relationships between aldosterone/MR and lipid metabolism/fatty acids oxidation pathways were determined in IPA based on the biological knowledge data from Ingenuity library. Genes referenced in this library with a known or inferred interaction with members of both pathways are displayed. The analysis was performed by considering as a starting dataset all genes and miRNAs found DE in our study that are involved in lipid/fatty acids metabolism. The genes found up-regulated or down-regulated in our experimental expression dataset are highlighted in red or green, respectively.

Figure 8: Overview of the impact of eplerenone treatment on cardiomyocyte energy metabolism in obese SHHH rats.

Cardiac energy pathway map showing the alterations in the expression of genes involved in lipolysis, lipogenesis, fatty acid β-oxidation, and glycolysis occurring in the myocardium of aged SHHF$^{cp/cp}$ rats as determined experimentally in untreated (left panel) or eplerenone-treated animals (right panel). The genes found up-regulated or down-regulated in our expression dataset are highlighted in red or green, respectively.

Confidential

Supplemental data :

Figure 1S: Transcriptome and miRNome dataset features

a) Two-dimensional (PC1 and PC2) plot of unsupervised principal component analysis (PCA) was performed using VAT and CT expression data obtained from $^{1.5}$SHHF$^{+/+}$, $^{1.5}$SHHF$^{cp/cp}$, $^{12.5}$ SHHF$^{+/+}$, $^{12.5}$SHHF$^{cp/cp}$, $^{12.5}$SHHF$^{+/+}$Eple and $^{12.5}$SHHF$^{cp/cp}$Eple rats. The various groups of animals were correctly classified using this approach indicating the good quality of data and the absence of outlier. For both VAT and CT, distinctive expression patterns were determined according to the genotype and aging. By contrast, only the CT transcriptome of $^{12.5}$SHHF$^{cp/cp}$Eple and $^{12.5}$SHHF$^{cp/cp}$ animals showed distinctive profiles, whereas CT miRNA as well as VAT mRNAs and miRNAs expression profiles failed to discriminate among the other rat groups. **b)** Analysis of variance (ANOVA) performed with array data confirmed this result and showed that factors contributing the most to the variation across all experimental variables were, in order of importance, the animal age, genotype and treatment status. **DE**, differentially expressed; **VAT**, visceral adipose tissue; **CT**, cardiac tissue.

Confidential

645 # References

646 1. McMurray JJ, A.S., Anker SD, Auricchio A, Böhm M, Dickstein K, Falk V, Filippatos G, Fonseca
647 C, Gomez-Sanchez MA, Jaarsma T, Køber L, Lip GY, Maggioni AP, Parkhomenko A, Pieske BM,
648 Popescu BA, Rønnevik PK, Rutten FH, Schwitter J, Seferovic P, Stepinska J, Trindade PT, Voors
649 AA, Zannad F, Zeiher A; Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart
650 Failure 2012 of the European Society of Cardiology, Bax JJ, Baumgartner H, Ceconi C, Dean V,
651 Deaton C, Fagard R, Funck-Brentano C, Hasdai D, Hoes A, Kirchhof P, Knuuti J, Kolh P,
652 McDonagh T, Moulin C, Popescu BA, Reiner Z, Sechtem U, Sirnes PA, Tendera M, Torbicki A,
653 Vahanian A, Windecker S, McDonagh T, Sechtem U, Bonet LA, Avraamides P, Ben Lamin HA,
654 Brignole M, Coca A, Cowburn P, Dargie H, Elliott P, Flachskampf FA, Guida GF, Hardman S,
655 Iung B, Merkely B, Mueller C, Nanas JN, Nielsen OW, Orn S, Parissis JT, Ponikowski P;, *ESC*
656 *guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force*
657 *for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society*
658 *of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC.*
659 Eur J Heart Fail., 2012 **14**(8): p. 803-869.

660 2. Kim GH, S.S., Earley JU, Svensson EC., *Translational control of FOG-2 expression in*
661 *cardiomyocytes by microRNA-130a.* PLoS One., 2009. **4**(7).

662 3. Thethi T, B.C., Fonseca V., *Metabolic syndrome and heart failure.* Heart Fail Clin., 2006. **2**(1): p.
663 1-11.

664 4. de las Fuentes L, d.S.G., Arnett DK, Dávila-Román VG., *Molecular determinants of the*
665 *cardiometabolic phenotype.* Endocr Metab Immune Disord Drug Targets. , 2010. **10**(2): p. 109-
666 123.

667 5. Tirosh A, G.R., Adler GK., *Mineralocorticoid receptor antagonists and the metabolic syndrome.*
668 Curr Hypertens Rep. , 2010. **12**(4): p. 252-257.

669 6. Sowers JR, W.-C.A., Epstein M., *Narrative review: the emerging clinical implications of the role*
670 *of aldosterone in the metabolic syndrome and resistant hypertension.* Ann Intern Med. , 2009.
671 **150**(11): p. 776-783.

672 7. Whaley-Connell A, J.M., Sowers JR., *Aldosterone: role in the cardiometabolic syndrome and*
673 *resistant hypertension.* Prog Cardiovasc Dis., 2010. **52**(5): p. 401-409.

674 8. Bernstein KE, G.J., Shen XZ, Gonzalez-Villalobos RA., *Renal angiotensin-converting enzyme and*
675 *blood pressure control.* Curr Opin Nephrol Hypertens., 2014. **23**(2): p. 106-112.

676 9. Martinerie L, M.M., Le Menuet D, Meduri G, Viengchareun S, Lombès M., *The mineralocorticoid*
677 *signaling pathway throughout development: expression, regulation and pathophysiological*
678 *implications.* Biochimie. , 2013. **95**(2): p. 148-157.

679 10. Hawkins UA, G.-S.E., Gomez-Sanchez CM, Gomez-Sanchez CE., *The ubiquitous*
680 *mineralocorticoid receptor: clinical implications.* Curr Hypertens Rep., 2012. **14**(6): p. 573-580.

681 11. Hernández-Díaz I, G.T., Arnau MR, Smits VA, Jaisser F, Farman N, Alvarez de la Rosa D., *The*
682 *mineralocorticoid receptor is a constitutive nuclear factor in cardiomyocytes due to hyperactive*
683 *nuclear localization signals.* Endocrinology. , 2010. **151**(8): p. 3888-3899.

Confidential

684 12. Caprio M, F.B., Claës A, Viengchareun S, Lombès M, Zennaro MC., *Pivotal role of the*
685 *mineralocorticoid receptor in corticosteroid-induced adipogenesis.* FASEB J., 2007. **21**(9): p.
686 2185-2194.

687 13. Robert V, V.T.N., Cheav SL, Mouas C, Swynghedauw B, Delcayre C., *Increased cardiac types I*
688 *and III collagen mRNAs in aldosterone-salt hypertension.* Hypertension, 1994. **24**(1): p. 30-36.

689 14. Viengchareun S, P.P., Zennaro MC, Lombès M., *Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors*
690 *inhibit UCP expression and function in brown adipocytes.* Am J Physiol Endocrinol Metab., 2001.
691 **280**(4): p. E640-9.

692 15. Blasi ER, R.R., Rudolph AE, Blomme EA, Polly ML, McMahon EG., *Aldosterone/salt induces*
693 *renal inflammation and fibrosis in hypertensive rats.* Kidney Int., 2003. **63**(5): p. 1791-1800.

694 16. Usher MG, D.S., Ivaschenko CY, Frieler RA, Berger S, Schütz G, Lumeng CN, Mortensen RM.,
695 *Myeloid mineralocorticoid receptor controls macrophage polarization and cardiovascular*
696 *hypertrophy and remodeling in mice.* J Clin Invest., 2010. **120**(9): p. 3350-3364.

697 17. NJ., B., *Contribution of aldosterone to cardiovascular and renal inflammation and fibrosis.* Nat
698 Rev Nephrol. , 2013. **9**(8): p. 459-469.

699 18. Feraco A, A.A., Mammi C, Fabbri A, Rosano GM, Caprio M., *Role of mineralocorticoid receptor*
700 *and renin-angiotensin-aldosterone system in adipocyte dysfunction and obesity.* J Steroid Biochem
701 Mol Biol., 2013. **137**: p. 99-106.

702 19. Guo, C., et al., *Mineralocorticoid receptor blockade reverses obesity-related changes in expression*
703 *of adiponectin, peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, and proinflammatory*
704 *adipokines.* Circulation, 2008. **117**(17): p. 2253-61.

705 20. Azibani F, B.L., Schlossarek S, Merval R, Tournoux F, Fazal L, Polidano E, Launay JM, Carrier
706 L, Chatziantoniou C, Samuel JL, Delcayre C., *Aldosterone inhibits antifibrotic factors in mouse*
707 *hypertensive heart.* Hypertension., 2012. **59**(6): p. 1179-1187.

708 21. Pitt B, Z.F., Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A, Palensky J, Wittes J., *The effect of*
709 *spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized*
710 *Aldactone Evaluation Study Investigators.* N Engl J Med., 1999. **341**(10): p. 709-717.

711 22. Pitt B, R.W., Zannad F, Neaton J, Martinez F, Roniker B, Bittman R, Hurley S, Kleiman J, Gatlin
712 M; Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study
713 Investigators., *Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular*
714 *dysfunction after myocardial infarction.* N Engl J Med., 2003. **348**(14): p. 1309-1321.

715 23. Wada T, M.Y., Sasaki M, Aruga Y, Nakamura Y, Ishii Y, Sasahara M, Kanasaki K, Kitada M,
716 Koya D, Shimano H, Tsuneki H, Sasaoka T., *Eplerenone ameliorates the phenotypes of metabolic*
717 *syndrome with NASH in liver-specific SREBP-1c Tg mice fed high-fat and high-fructose diet.* Am
718 J Physiol Endocrinol Metab., 2013. **305**(11): p. E1415-25.

719 24. Long HD, L.Y., Liu MJ, Liang LY, Zeng ZH., *Spironolactone prevents dietary-induced metabolic*
720 *syndrome by inhibiting PI3-K/Akt and p38MAPK signaling pathways.* J Endocrinol Invest., 2013.
721 **36**(11): p. 923-30.

Confidential

722 25. Youcef G, O.A., L'Huillier CP, Labat C, Fay R, Tabcheh L, Toupance S, Rodriguez-Guéant RM,
723 Bergerot D, Jaisser F, Lacolley P, Zannad F, Laurent Vallar, Pizard A, *Simultaneous*
724 *characterization of metabolic, cardiac, vascular and renal phenotypes of lean and obese SHHF*
725 *rats.* PLoS One, 2014. **9**(5).

726 26. Benjamini, Y. and Y. Hochberg, *Controlling the false discovery rate: a practical and powerful*
727 *approach to multiple testing.* Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological),
728 1995: p. 289-300.

729 27. Breitling, R., et al., *Rank products: a simple, yet powerful, new method to detect differentially*
730 *regulated genes in replicated microarray experiments.* FEBS Lett, 2004. **573**(1-3): p. 83-92.

731 28. Petr V. Nazarov, S.E.R., Arnaud Muller, Nathalie Nicot, Demetra Philippidou, Laurent Vallar and
732 Stephanie Kreis, *Interplay of microRNAs, transcription factors and target genes: linking dynamic*
733 *expression changes to function.* Nucleic Acids Research, 2013. **1**(15).

734 29. James A. Timmons, K.W., Ola Larsson, Tomas B. Walden, Timo Lassmann, Natasa Petrovic, D.
735 Lee Hamilton, Ruth E. Gimeno, Claes Wahlestedt, Keith Baar, Jan Nedergaard, and Barbara
736 Cannon., *Myogenic gene expression signature establishes that brown and white adipocytes*
737 *originate from distinct cell lineages.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(11): p. 4401-4406.

738 30. Kajimura S, S.P., Spiegelman BM., *Transcriptional control of brown fat development.* Cell
739 Metabolism, 2010. **11**(4): p. 257-262.

740 31. Klimcáková E, R.B., Márquez-Quiñones A, Kovácová Z, Kováciková M, Combes M, Siklová-
741 Vítková M, Hejnová J, Srámková P, Bouloumié A, Viguerie N, Stich V, Langin D., *Worsening of*
742 *obesity and metabolic status yields similar molecular adaptations in human subcutaneous and*
743 *visceral adipose tissue: decreased metabolism and increased immune response.* J Clin Endocrinol
744 Metab, 2011. **96**(1): p. 73-82.

745 32. Capel F, K.E., Viguerie N, Roussel B, Vítková M, Kováciková M, Polák J, Kovácová Z, Galitzky
746 J, Maoret JJ, Hanácek J, Pers TH, Bouloumié A, Stich V, Langin D., *Macrophages and adipocytes*
747 *in human obesity: adipose tissue gene expression and insulin sensitivity during calorie restriction*
748 *and weight stabilization.* Diabetes, 2009. **58**(7): p. 1558-1567.

749 33. Suganami T, N.J., Ogawa Y., *A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates*
750 *inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor alpha.* Arterioscler
751 Thromb Vasc Biol., 2005. **25**(10): p. 2062-2068.

752 34. Xiao F, Y.J., Liu B, Guo Y, Li K, Deng J, Zhang J, Wang C, Chen S, Du Y, Lu Y, Xiao Y, Zhang
753 Z, Guo F, *A Novel Function of MicroRNA 130a-3p in Hepatic Insulin Sensitivity and Liver*
754 *Steatosis.* Diabetes, 2014 **63**(8): p. 2631-2642.

755 35. Lijnen HR, M.E., Holvoet P, Mertens A, Lupu F, Morange P, Alessi MC, Juhan-Vague l, *Adipose*
756 *tissue expression of gelatinases in mouse models of obesity.* Thromb Haemost, 2001. **85**(6): p.
757 1111-1116.

758 36. Chavey C, M.B., Monthouel MN, Bonnafous S, Anglard P, Van Obberghen E, Tartare-Deckert S.,
759 *Matrix Metalloproteinases Are Differentially Expressed in Adipose Tissue during Obesity and*
760 *Modulate Adipocyte Differentiation.* J Biol Chem, 2003. **278**(14): p. 11888-11896.

Confidential

761 37. Wong N1, F.B., Cempako GR, Steinberg GR, Walder K, Kay TW, Proietto J, Andrikopoulos S.,
762 *Deficiency in interferon-gamma results in reduced body weight and better glucose tolerance in*
763 *mice.* Endocrinology, 2011. **152**(10): p. 3690-3699.

764 38. Rocha VZ, F.E., Sukhova G, Shimizu K, Gotsman I, Vernon AH, Libby P., *Interferon-gamma, a*
765 *Th1 cytokine, regulates fat inflammation: a role for adaptive immunity in obesity.* Circ Res, 2008.
766 **103**(5): p. 467-476.

767 39. Dooley J, L.A., *Molecular control over thymic involution: from cytokines and microRNA to aging*
768 *and adipose tissue.* Eur J Immunol, 2012. **42**(5): p. 1073-1079.

769 40. Liston A, P.A., Danso-Abeam D, Dooley J., *MicroRNA-29 in the adaptive immune system: setting*
770 *the threshold.* Cell Mol Life Sci, 2012. **69**(21): p. 3533-3541.

771 41. Buchanan J, M.P., Hu P, Chakrabarti G, Roberts MW, Yun UJ, Cooksey RC, Litwin SE, Abel ED.,
772 *Reduced cardiac efficiency and altered substrate metabolism precedes the onset of hyperglycemia*
773 *and contractile dysfunction in two mouse models of insulin resistance and obesity.* Endocrinology,
774 2005. **146**(12): p. 5341-9.

775 42. Mazumder PK, O.N.B., Roberts MW, Buchanan J, Yun UJ, Cooksey RC, Boudina S, Abel ED.,
776 *Impaired cardiac efficiency and increased fatty acid oxidation in insulin-resistant ob/ob mouse*
777 *hearts.* Diabetes., 2004. **53**(9): p. 2366-2374.

778 43. Huisamen, B., et al., *Early cardiovascular changes occurring in diet-induced, obese insulin-*
779 *resistant rats.* Mol Cell Biochem, 2012. **368**(1-2): p. 37-45.

780 44. Wang P, L.S., Zeng H, Bonen A, Chatham JC., *Impact of altered substrate utilization on cardiac*
781 *function in isolated hearts from Zucker diabetic fatty rats.* Am J Physiol Heart Circ Physiol., 2005.
782 **288**(5): p. H2102-10.

783 45. Lopaschuk GD, U.J., Folmes CD, Jaswal JS, Stanley WC., *Myocardial fatty acid metabolism in*
784 *health and disease.* Physiol Rev. , 2010. **90**(1): p. 207.

785 46. Lopaschuk GD, J.J., *Energy metabolic phenotype of the cardiomyocyte during development,*
786 *differentiation, and postnatal maturation.* J Cardiovasc Pharmacol., 2010. **56**(2): p. 130-140.

787 47. Vincenzo Lionetti, W.C.S.a.F.A.R., *Modulating fatty acid oxidation in heart failure* Cardiovasc
788 Res, 2011. **90**(2): p. 202-209.

789 48. Holloway GP, B.A., Spriet LL., *Regulation of skeletal muscle mitochondrial fatty acid metabolism*
790 *in lean and obese individuals.* Am J Clin Nutr., 2009. **89**(1): p. 455S-462S.

791 49. JA, H., *Intramuscular lipid oxidation and obesity.* Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. , 2008.
792 **294**(4): p. 1111-1116.

793 50. Nickel A1, L.J., Maack C., *Myocardial energetics in heart failure.* Basic Res Cardiol., 2013.
794 **108**(4).

795 51. Ventura-Clapier R1, G.A., Veksler V, Joubert F., *Bioenergetics of the failing heart.* Biochim
796 Biophys Acta. , 2011. **1813**(7): p. 1360-72.

Confidential

797 52. Hirata, A., et al., *Blockade of mineralocorticoid receptor reverses adipocyte dysfunction and*
798 *insulin resistance in obese mice.* Cardiovasc Res, 2009. **84**(1): p. 164-72.

799 53. Armani, A., et al., *Mineralocorticoid receptor antagonism induces browning of white adipose*
800 *tissue through impairment of autophagy and prevents adipocyte dysfunction in high-fat-diet-fed*
801 *mice.* Faseb j, 2014. **28**(8): p. 3745-57.

802 54. Feraco, A., et al., *Role of mineralocorticoid receptor and renin-angiotensin-aldosterone system in*
803 *adipocyte dysfunction and obesity.* J Steroid Biochem Mol Biol, 2013. **137**: p. 99-106.

804 55. Caprio, M., et al., *Antiadipogenic effects of the mineralocorticoid receptor antagonist*
805 *drospirenone: potential implications for the treatment of metabolic syndrome.* Endocrinology,
806 2011. **152**(1): p. 113-25.

807 56. Caprio M, A.A., Chetrite G, Muscat A, Mammi C, Marzolla V, Fabbri A, Zennaro MC, Fève B.,
808 *Antiadipogenic effects of the mineralocorticoid receptor antagonist drospirenone: potential*
809 *implications for the treatment of metabolic syndrome.* Endocrinology. , 2011. **152**(1): p. 113-125.

810 57. Kosmala, W., et al., *A randomized study of the beneficial effects of aldosterone antagonism on LV*
811 *function, structure, and fibrosis markers in metabolic syndrome.* JACC Cardiovasc Imaging, 2011.
812 **4**(12): p. 1239-49.

813 58. Ramírez E, K.-M.M., Ares-Carrasco S, Picatoste B, Ferrarini A, Rupérez FJ, Caro-Vadillo A,
814 Barbas C, Egido J, Tuñón J, Lorenzo Ó., *Eplerenone attenuated cardiac steatosis, apoptosis and*
815 *diastolic dysfunction in experimental type-II diabetes.* Cardiovasc Diabetol., 2013. **12**(172).

816 59. Carley AN1, S.D., *Fatty acid metabolism is enhanced in type 2 diabetic hearts.* Biochim Biophys
817 Acta, 2005. **1734**(2): p. 112-26.

818 60. Cittadini A1, N.R., Monti MG, Rea D, Longobardi S, Netti PA, Walser M, Samà M, Aimaretti G,
819 Isgaard J, Saccà L., *Metformin prevents the development of chronic heart failure in the SHHF rat*
820 *model.* Diabetes. , 2012. **61**(4): p. 944-53.

821 61. S. Rimbaud, H.S., A. Garnier, D. Fortin, X. Bigard, V. Veksler, R. Ventura-Clapier, *Stimulus*
822 *specific changes of energy metabolism in hypertrophied heart.* J Mol Cell Cardiol., 2009. **46**(6): p.
823 952-9.

824 62. Iraqi W, R.P., Angioi M, Fay R, Nuée J, Ketelslegers JM, Vincent J, Pitt B, Zannad F.,
825 *Extracellular cardiac matrix biomarkers in patients with acute myocardial infarction complicated*
826 *by left ventricular dysfunction and heart failure: insights from the Eplerenone Post-Acute*
827 *Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study (EPHESUS) study.* Circulation.,
828 2009. **119**(18): p. 2471-9.

829 63. Messaoudi S, G.B., Tarjus A, Pelloux V, Ouvrard-Pascaud A, Delcayre C, Samuel J, Launay JM,
830 Sierra-Ramos C, Alvarez de la Rosa D, Clément K, Farman N, Jaisser F., *Aldosterone-specific*
831 *activation of cardiomyocyte mineralocorticoid receptor in vivo.* Hypertension., 2013. **61**(2): p. 361-
832 7.

833 64. Nagata K, O.K., Xu J, Ichihara S, Noda A, Kimata H, Kato T, Izawa H, Murohara T, Yokota M.,
834 *Mineralocorticoid receptor antagonism attenuates cardiac hypertrophy and failure in low-*
835 *aldosterone hypertensive rats.* Hypertension., 2006. **47**(4): p. 656-64.

Confidential

836 65. Karram T, A.A., Keidar S, Golomb E, Hochberg I, Winaver J, Hoffman A, Abassi Z., *Effects of*
837 *spironolactone and eprosartan on cardiac remodeling and angiotensin-converting enzyme*
838 *isoforms in rats with experimental heart failure.* Am J Physiol Heart Circ Physiol., 2005. **289**(4):
839 p. H1351-8.

840 66. Brønnum H, A.D., Schneider M, Sandberg MB, Eskildsen T, Nielsen SB, Kalluri R, Sheikh SP.,
841 *miR-21 promotes fibrogenic epithelial-to-mesenchymal transition of epicardial mesothelial cells*
842 *involving Programmed Cell Death 4 and Sprouty-1.* PLoS One., 2013. **8**(2).

843 67. Thum T, G.C., Fiedler J, Fischer T, Kissler S, Bussen M, Galuppo P, Just S, Rottbauer W, Frantz
844 S, Castoldi M, Soutschek J, Koteliansky V, Rosenwald A, Basson MA, Licht JD, Pena JT,
845 Rouhanifard SH, Muckenthaler MU, Tuschl T, Martin GR, Bauersachs J, Engelhardt S.,
846 *MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in*
847 *fibroblasts.* Nature, 2008. **456**(7224): p. 980-4.

848 68. Reddy S, Z.M., Hu DQ, Fajardo G, Hu S, Ghosh Z, Rajagopalan V, Wu JC, Bernstein D., *Dynamic*
849 *microRNA expression during the transition from right ventricular hypertrophy to failure.* Physiol
850 Genomics., 2012. **44**(10): p. 562-75.

851 69. Thum T, G.P., Wolf C, Fiedler J, Kneitz S, van Laake LW, Doevendans PA, Mummery CL, Borlak
852 J, Haverich A, Gross C, Engelhardt S, Ertl G, Bauersachs J., *MicroRNAs in the human heart: a clue*
853 *to fetal gene reprogramming in heart failure.* Circulation., 2007. **116**(3): p. 258-67.

854 70. Bauersachs J, T.T., *Biogenesis and regulation of cardiovascular microRNAs.* Circ Res. , 2011.
855 **109**(3): p. 334-47.

856 71. Ikeda S, K.S., Lu J, Bisping E, Zhang H, Allen PD, Golub TR, Pieske B, Pu WT., *Altered microRNA*
857 *expression in human heart disease.* Physiol Genomics, 2007. **31**(3): p. 367-73.

858 72. Bernardo, B.C., et al., *Therapeutic inhibition of the miR-34 family attenuates pathological cardiac*
859 *remodeling and improves heart function.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(43): p. 17615-20.

860 73. Bronze-da-Rocha, E., *MicroRNAs expression profiles in cardiovascular diseases.* Biomed Res Int,
861 2014. **2014**: p. 985408.

862 74. Hoekstra, M., et al., *The peripheral blood mononuclear cell microRNA signature of coronary artery*
863 *disease.* Biochem Biophys Res Commun, 2010. **394**(3): p. 792-7.
864

Confidential

Figure 1: Design of the study

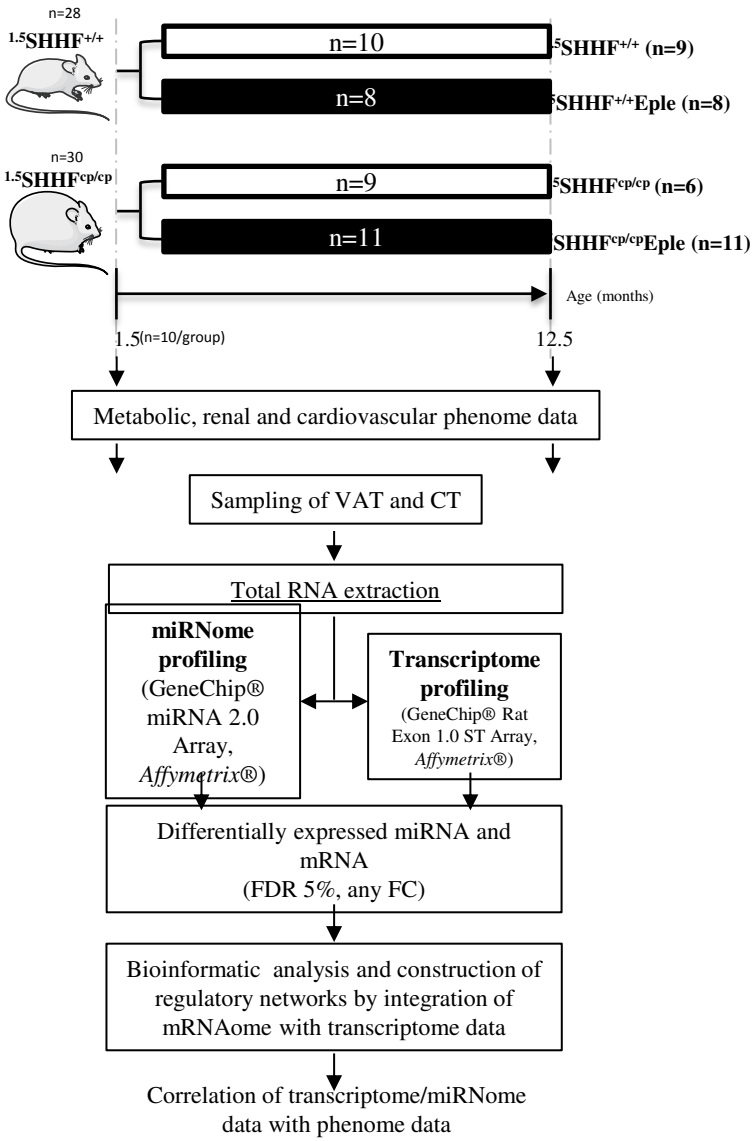


Table 1: Significance analysis of mRNA and miRNA data

		Significance analysis (FDR 5 %)			
		DE mRNA		DE miRNA	
	Contrasts	VAT	CT	VAT	CT
Effect of genotype	$^{1.5}SHHF^{cp/cp}$ vs. $^{1.5}SHHF^{+/+}$	2067	110	43	4
	$^{12.5}SHHF^{cp/cp}$ vs. $^{12.5}SHHF^{+/+}$	2684	67	31	4
Effect of aging	$^{12.5}SHHF^{+/+}$ vs. $^{1.5}SHHF^{+/+}$	3812	2047	95	34
	$^{12.5}SHHF^{cp/cp}$ vs. $^{1.5}SHHF^{cp/cp}$	2869	2299	134	38
Effect of treatment	$^{12.5}SHHF^{cp/cp}$Eple vs. $^{12.5}SHHF^{cp/cp}$	0	414	0	6
	$^{12.5}SHHF^{+/+}$Eple vs. $^{12.5}SHHF^{+/+}$	0	0	5	0

Figure 2: Integrative correlation study between phenome, transcriptome and miRNome data

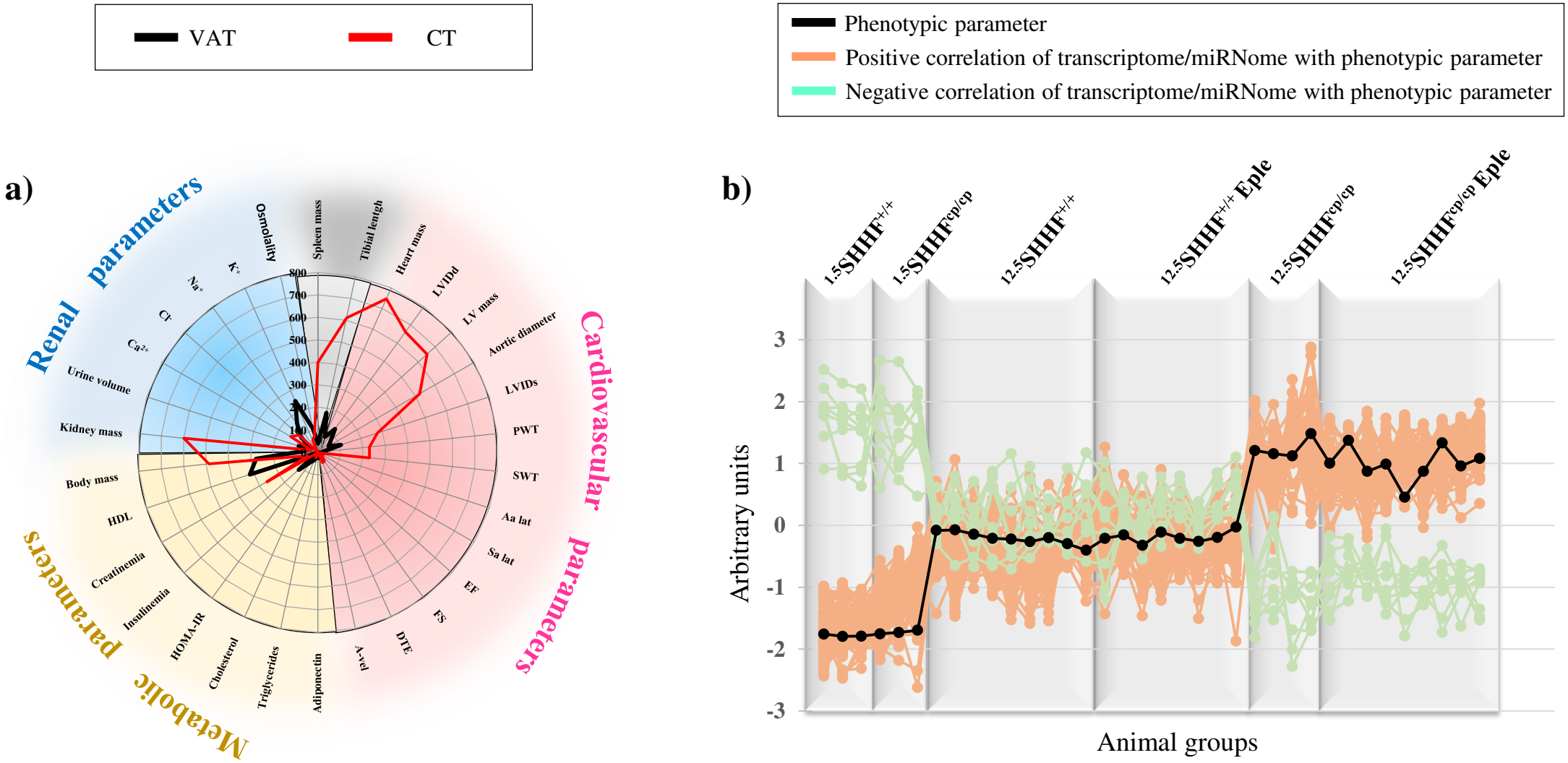
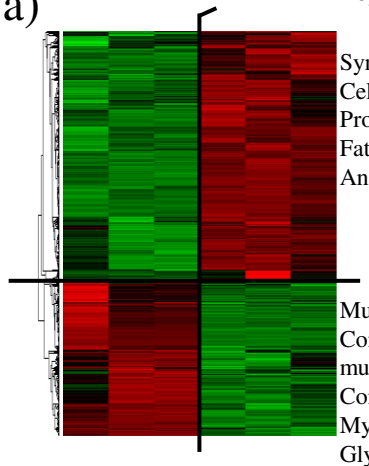


Figure 3: functional analysis of VAT from the gene expression profiles of untreated obese SHHF$^{cp/cp}$ rats

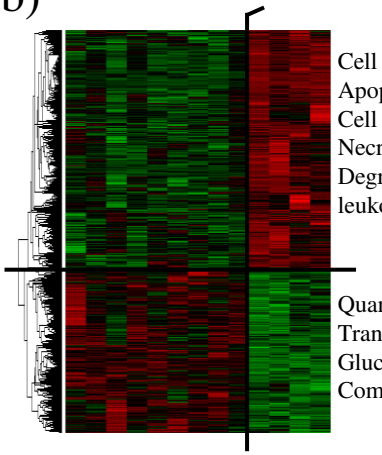
Effect of genotype: ^{time}SHHF$^{cp/cp}$ vs. ^{time}SHHF$^{+/+}$

a)



Top enriched biological functions	P-Value
Synthesis of lipid	1E-08
Cell movement	6E-07
Proliferation of cells	5E-06
Fatty acid metabolism	2E-05
Angiogenesis	2E-05
Muscle contraction	6E-11
Contraction of striated muscle	5E-09
	4E-06
Contraction of heart	6E-06
Myelination of cells	2E-04
Glycolysis	

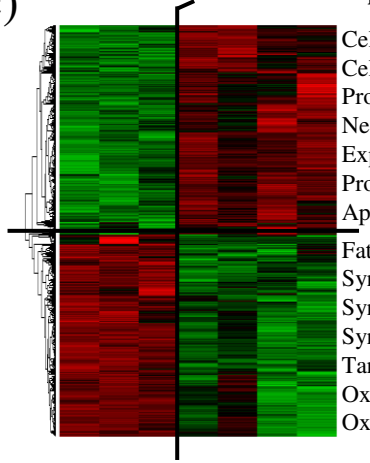
b)



Cell death	9E-13
Apoptosis	2E-10
Cell movement	5E-10
Necrosis	3E-08
Degranulation of leukocyte cell lines	4E-08
Quantity of cyclic nucleotides	3E-07
Transport of molecule	1E-06
Glucose metabolism disorder	2E-05
Communication of cells	3E-05

Effect of aging: $^{12.5}$SHHF$^{cp/cp}$ vs. $^{1.5}$SHHF$^{cp/cp}$

c)



Top enriched biological functions	P-Value
Cell death	2E-09
Cell movement	5E-08
Proliferation of cells	4E-07
Necrosis	9E-07
Experimentally-induced diabetes	1E-06
Proliferation of T lymphocytes	1E-06
Apoptosis	2E-06
Fatty acid metabolism	3E-10
Synthesis of lipid	5E-08
Synthesis of fatty acid	7E-07
Synthesis of acetyl-coenzyme A	2E-06
Tansport of fatty acid	6E-05
Oxidation of fatty acid	7E-05
Oxidation of lipid	7E-05

Color key and histogram

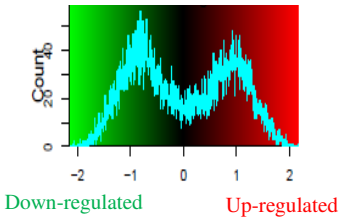


Figure 4: Functional analysis of CT based on the transcriptome profiles of untreated obese SHHF$^{cp/cp}$ rats

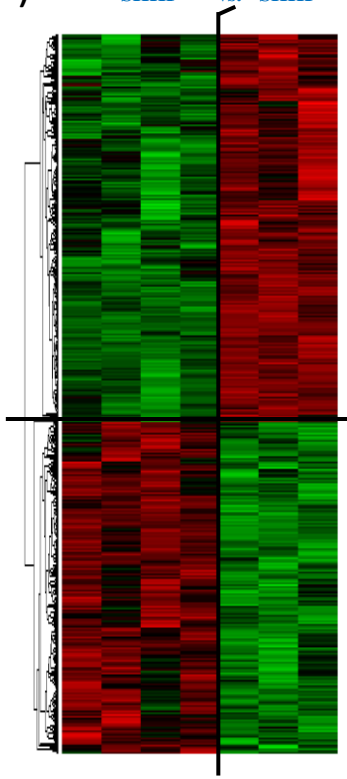
Effect of genotype: ^{time}SHHF$^{cp/cp}$ vs. ^{time}SHHF$^{cp/cp}$

a)

Top enriched biological functions	p-Value
$^{1.5}$SHHF$^{cp/cp}$ vs. $^{1.5}$SHHF$^{+/+}$	
Transport of cation	7E-06
Transport of molecule	2E-05
Secretion of triacylglycerol	1E-04
Transport of metal ion	1E-03
$^{12.5}$SHHF$^{cp/cp}$ vs. $^{12.5}$SHHF$^{+/+}$	
Formation of lamellipodia	2E-03
Glycolysis of cells	3E-03
Formation of focal adhesions	3E-03
Organization of actin filaments	4E-03

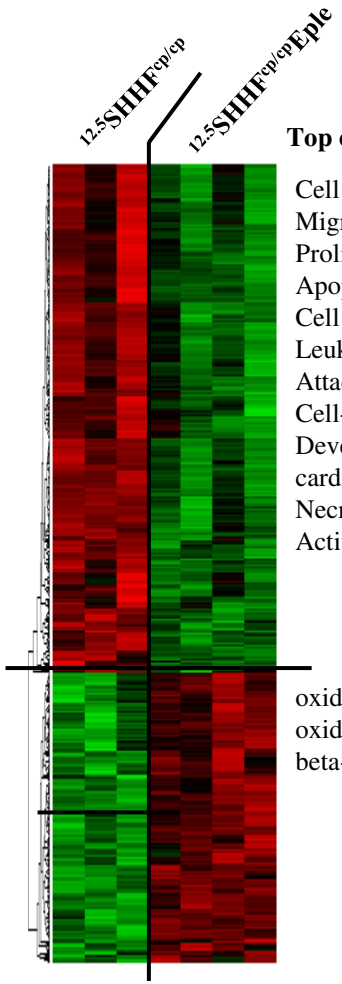
Effect of aging: $^{12.5}$SHHF$^{cp/cp}$ vs. $^{1.5}$SHHF$^{cp/cp}$

b)



Top enriched biological functions	P-Value
Cell death	5E-11
Cell movement	1E-10
Organization of cytoplasm	2E-10
Microtubule dynamics	2E-10
Organization of cytoskeleton	6E-10
Migration of cells	2E-09
Necrosis	9E-09
Apoptosis	6E-07
Regeneration of cells	2E-06
Degranulation of cells	3E-06
Proliferation of cells	4E-06
Formation of cellular protrusions	1E-05
Transport of molecule	1E-05
Differentiation of cells	8E-05
Oxidation of fatty acid	3E-08
Oxidation of lipid	4E-08
Beta-oxidation of fatty acid	4E-08
Transport of molecule	7E-06
Remodeling of blood vessel	8E-06
Transport of monovalent inorganic cation	2E-05
	3E-05

Figure 5: Functional analysis of CT based on the transcriptome profiles of treated obese SHHF$^{cp/cp}$ rats



Top enriched biological functions	P-Value
Cell movement	**3E-12**
Migration of cells	**5E-11**
Proliferation of cells	**2E-07**
Apoptosis	**4E-07**
Cell death	**5E-07**
Leukocyte migration	**6E-07**
Attachment of cells	**1E-06**
Cell-cell adhesion	**1E-06**
Development of cardiovascular system	**5E-06**
Necrosis	**3E-05**
Activation of cells	**5E-05**
oxidation of lipid	**5E-09**
oxidation of fatty acid	**4E-08**
beta-oxidation of fatty acid	**3E-06**

Figure 6: Gene regulatory networks impacted by eplerenone treatment in the cardiac tissue of the obese SHHF rats as predicted by IPA

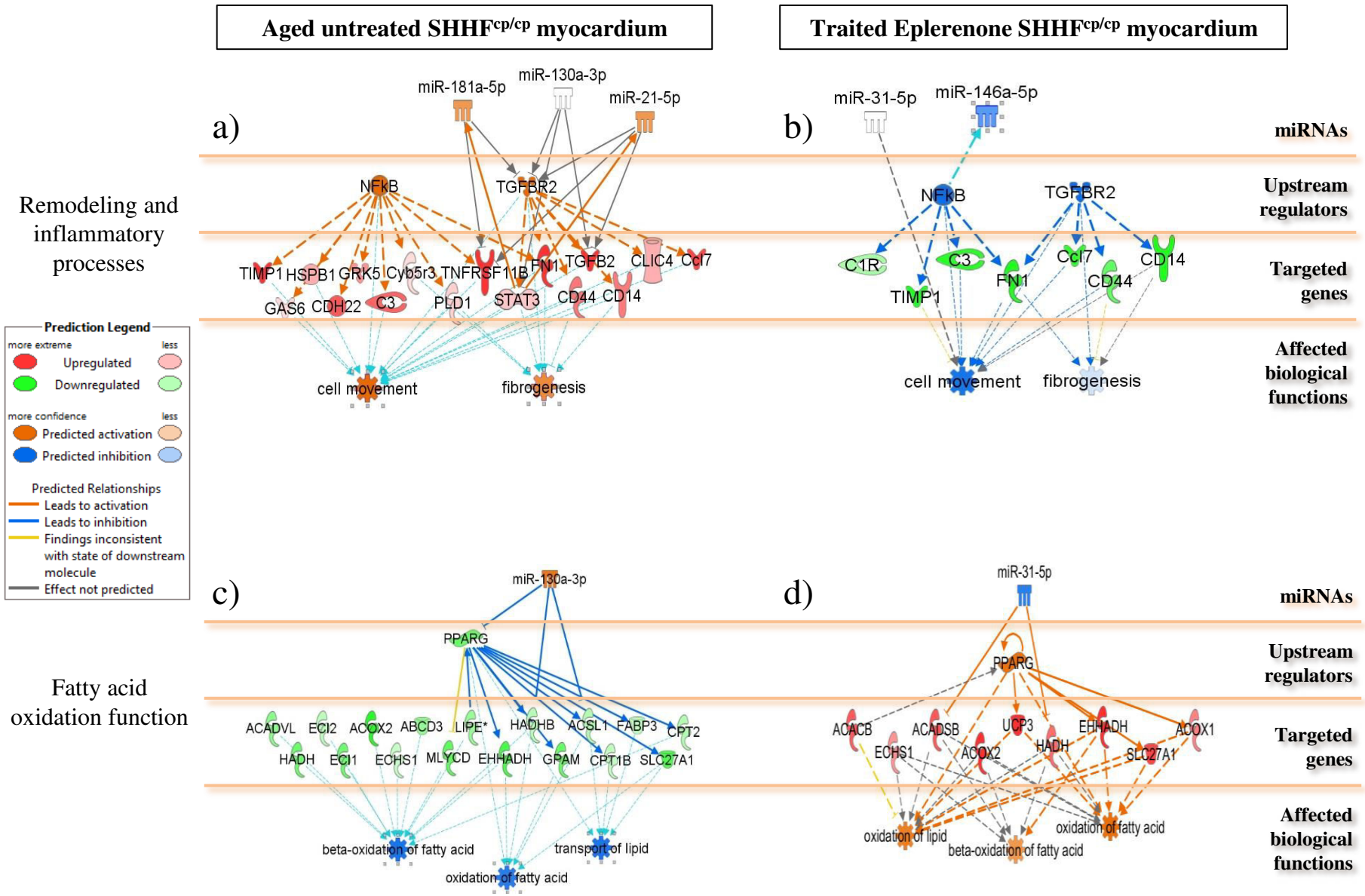


Figure 7: Possible pathways linking aldosterone to lipid metabolism as determined in IPA

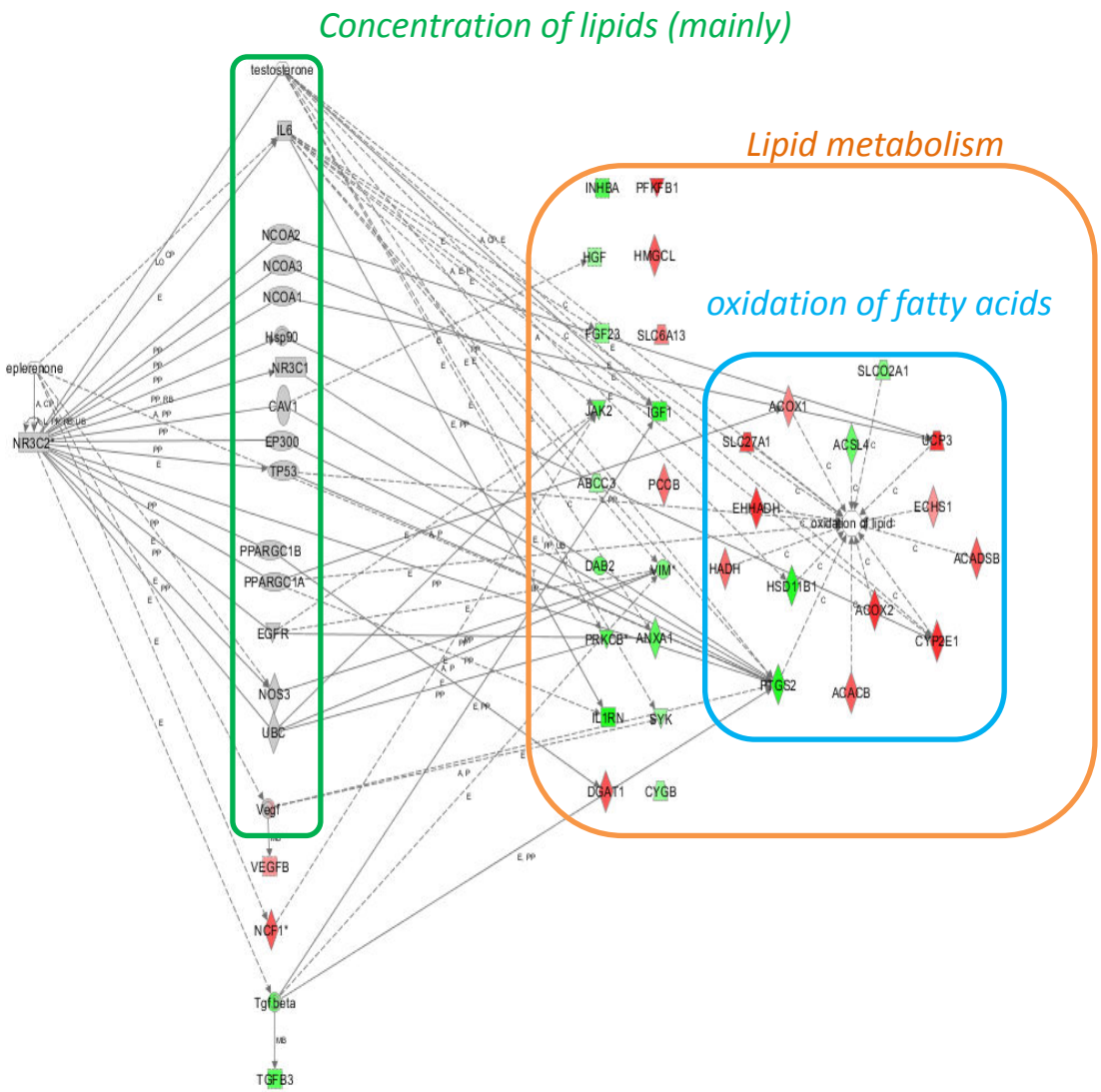
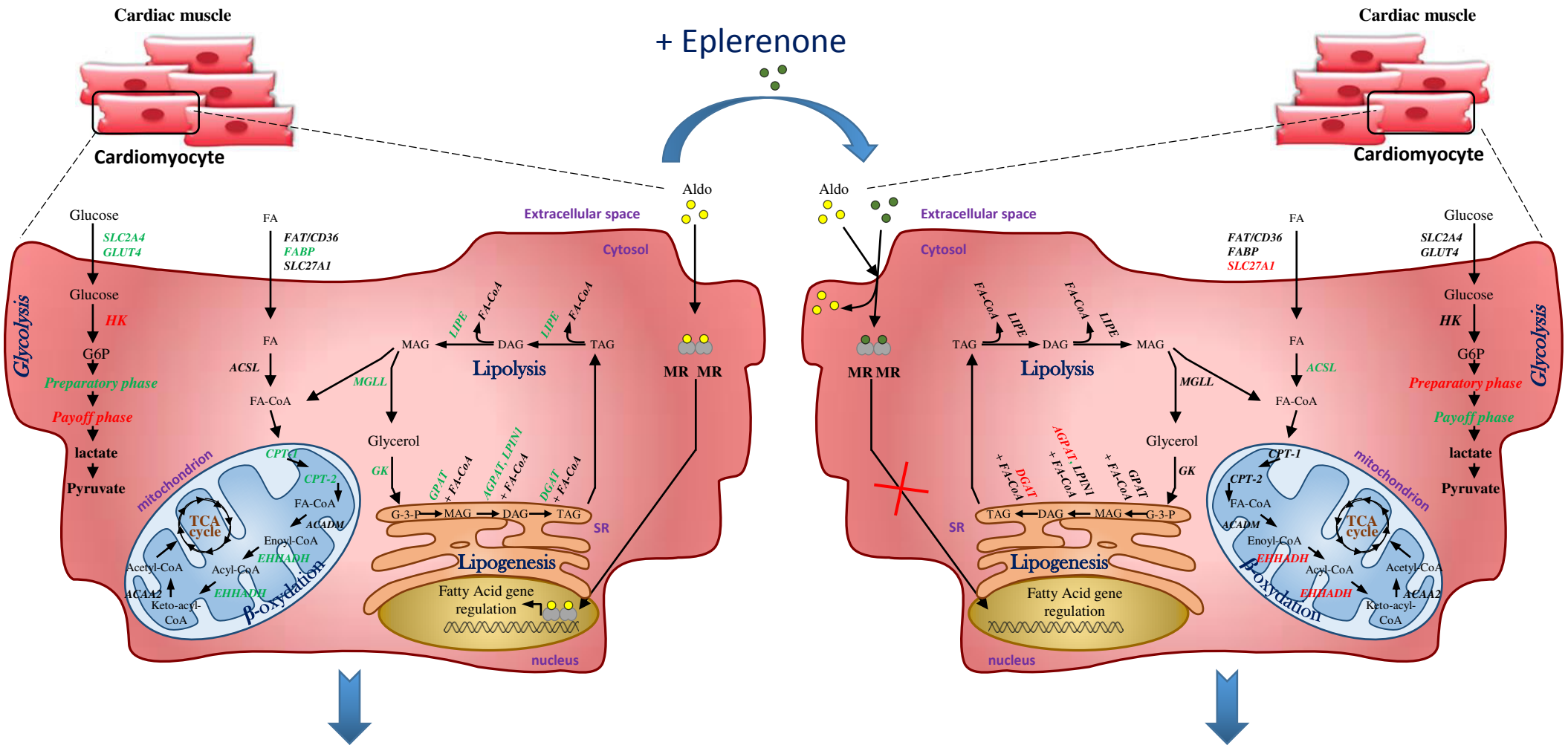
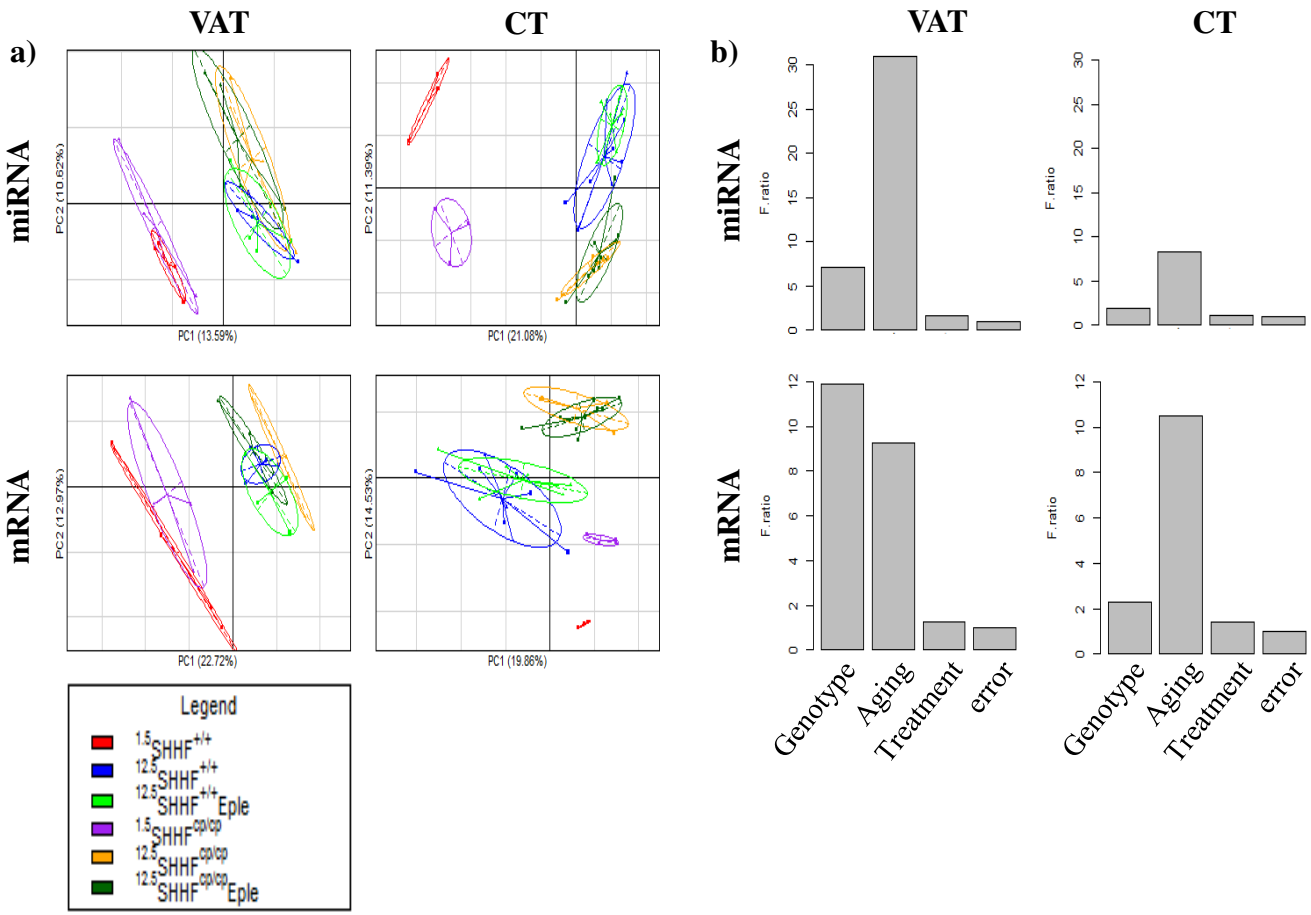


Figure 8: Overview of the impact of eplerenone treatment on cardiomyocyte energy metabolism in obese SHHF rats



Supplemental data

Figure 1S: Transcriptome and miRNome dataset features



Les résultats de la troisième et dernière partie de notre projet ont permis de révéler les fonctions biologiques et moléculaires altérées dans le TA et cardiaque chez les animaux SHHF$^{cp/cp}$ et celles qui ont été impactées par le traitement chronique à l'Eplérénone. L'analyse détaillée de ces fonctions biologiques indique principalement :

(i) Au niveau du tissu adipeux péri-rénal :

- La surexpression de gènes, chez les rats $^{1.5}$SHHF$^{cp/cp}$ par rapport aux $^{1.5}$SHHF$^{+/+}$, principalement impliqués dans les fonctions liées au métabolisme des lipides, de la prolifération cellulaire et de l'angiogenèse indiquant une activité métabolique intense du TA chez ces rats, en parfait accord avec leur surpoids détecté dès ce jeune âge. Dans le même temps, les gènes typiquement impliqués dans les effets thermogéniques du TA brun sont significativement sous-exprimés, suggérant qu'à ce stade précoce, le TA viscéral des animaux est déjà différencié en TA blanc spécialisé dans le stockage des AG.
- Une dépression de l'activité métabolique accompagnant le vieillissement des rats SHHF$^{cp/cp}$ et se traduisant par la sous-expression de gènes impliqués dans le métabolisme des lipides et des AG, et une surexpression importante de gènes impliqués dans le remodelage et l'inflammation tissulaires. Ces données sont en parfaite concordance avec les observations histologiques du TA viscéral qui montrent une hypertrophie des adipocytes ainsi d'une fibrose du TA.

- L'absence d'effet significatif de l'Eplérénone sur le transcriptome et le miRNome en fin d'étude, suggérant que ces effets se produisent sur des périodes de temps courtes et très précoce donc inobservables dans le cadre de notre étude

(ii) Au niveau du tissu cardiaque :

- Chez les $^{1.5}$SHHF$^{cp/cp}$ par rapport aux $^{1.5}$SHHF$^{+/+}$ une expression de gènes enrichis dans les fonctions de transport de cations et de triacylglycérols (ou triglycérides) mettant en évidence l'influence de la dyslipidémie observée chez ces rats sur l'activité énergétique cardiaque.
- Avec le vieillissement des rats SHHF$^{cp/cp}$, une diminution importante de l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme énergétique des AG (principale source

d'énergie dans le cœur) et une surexpression accrue de gènes engagés dans les fonctions de remodelage tels que la nécrose, apoptose, fibrose et inflammation, en bon accord avec nos observations fonctionnelles et histologiques.

- Sous l'effet du traitement chronique à l'Eplérénone, une diminution significative de l'expression de gènes impliqués dans le remodelage cardiaque et une surexpression de ceux impliqués dans le métabolisme énergétique des AG. Nos données indiquent que le traitement chronique par ARM permet de prévenir chez les rats $SHHF^{cp/cp}$ les altérations conduisant au remodelage cardiaque et à la modification délétère du métabolisme énergétique, résultant en un effet général cardioprotecteur vis-à-vis du développement prématuré d'une IC. Sous l'effet du traitement, les animaux $SHHF^{cp/cp}$ présentent des caractéristiques phénotypiques et des profils transcriptomiques cardiaques tout à fait comparables à ceux observés chez les rats $SHHF^{+/+}$ du même âge.

(iii) Au niveau du tissu cardiaque et adipeux :

L'intégration des données phénotypiques obtenus pour les différents paramètres mesurés chez les $SHHF^{+/+}$ et $SHHF^{cp/cp}$ sur le plan métabolique et cardiaque ont permis la mise en évidence d'une co-expression d'un paramètre phénotypique avec des profils de gènes et miRs avec une association statistique très forte (r=0.8). Ces candidats gènes ou miRs peuvent potentiellement être des marqueurs de ces phénotypes et servir éventuellement comme biomarqueurs. Leur validation dans d'autres systèmes d'études expérimentaux est un prérequis avant de pouvoir affirmer cela. Dans notre étude, nous suggérons le rôle potentiel de ces éléments transcriptionnels dans le phénotype avec lequel ils sont très fortement associés statistiquement.

Synthèse générale :

Dans leur ensemble, les études réalisées dans le cadre de notre projet ont permis de caractériser les deux états physiopathologiques limites chez les rats-modèles SHHF : le stade précoce où les animaux sont « à risque » de développer une IC mais n'en présentent pas les symptômes, et le stade d'IC déclarée. Nos données expérimentales ont permis de confirmer l'implication du SMet et de l'activation excessive du RM dans la physiopathologie de l'IC. L'hyperaldostéronisme accompagnant l'installation du SMet chez les rats $SHHF^{cp/cp}$ accélère leur progression vers l'IC. La mise en place d'un traitement monothérapie ARM lors du développement du SMet permet d'atténuer certaines anomalies du SMet (obésité et dyslipidémie) contribuant ainsi à l'amélioration du phénotype cardiaque, au ralentissement de la progression vers l'IC et à l'amélioration de la survie des animaux. L'analyse des mécanismes d'action de l'Eplérénone au niveau moléculaire révèle que le traitement permet de moduler l'expression de nombreux gènes et miRs impliqués dans le remodelage cardiaque et le métabolisme énergétique des AG dans le cœur pour exercer ses effets protecteurs.

DISCUSSION GENERALE

DISCUSSION GENERALE

Le regroupement chez un même individu de plusieurs facteurs de risque incluant l'obésité, le DT2, une dyslipidémie, l'insulino-résistance et l'HTA définissant le SMet, augmente indéniablement le risque cardiovasculaire. Si l'hyperaldostéronisme concomitant au SMet est impliqué dans son émergence et contribue à l'aggravation de l'IC, il est alors une cible thérapeutique potentiellement intéressante pour la prévention de l'IC.

S'inscrivant dans ce contexte, le présent projet avait pour objectif principal d'évaluer l'effet d'un traitement préventif de l'IC basé sur l'utilisation en monothérapie chronique d'un ARM (Eplérénone) ciblant les composants du SMet en tant que facteurs aggravants de l'IC.

Cette étude a permis de montrer au plan expérimental : ***i)*** la pertinence du choix du modèle de rat SHHF dans l'étude de l'influence du SMet et l'hyperaldostéronisme sur l'aggravation de l'IC chez ces rats, ***ii)*** l'impact sur le phénome des animaux du traitement ARM donné en monothérapie mettant en évidence d'une atténuation de l'obésité et de la dyslipidémie contribuant à l'amélioration du phénotype cardiaque structurale et fonctionnelle et au ralentissement de la progression vers l'IC, ***iii)*** qu'a 12.5 mois d'âge, le traitement ARM n'a pas d'impact visible sur le transcriptome adipeux des SHHF$^{cp/cp}$, en revanche il a permis de diminuer l'expression de gènes impliqués dans le remodelage cardiaque et d'augmenter ceux impliqués dans le métabolisme énergétique des AG.

Le modèle de rat SHHF/MccGmiCrl-Lepr^{cp} a été sélectionné dans ce présent projet parce qu'il a la particularité de regrouper les caractéristiques physiopathologiques d'intérêt pour notre étude : un hyperaldostéronisme et une IC dont les symptômes sont aggravés par la présence d'un SMet. Notre choix a reposé sur un ensemble de données expérimentales sur la souche de rat SHHF disponible dans la littérature à l'initiation du projet. Ainsi, il est décrit que les rats SHHF$^{+/+}$présentent des taux d'Aldo circulant augmentant progressivement avec l'installation de l'IC [246], taux qui sont significativement encore plus élevés chez les rats SHHF$^{cp/cp}$ développant un SMet [253]. Cet hyperaldostéronisme développé chez les SHHF$^{+/+}$ est essentiellement lié à l'activation des systèmes neurohumoraux observée lors de

l'installation de l'HTA et la progression de l'IC et est accentué par la présence du SMet. Dans ce contexte, les animaux présentent une sévérité dans le développement de l'IC qui est dépendante de l'expression du SMet, réduisant l'espérance de vie des rats SHHF$^{cp/cp}$ par deux en comparaison de celle des animaux SHHF$^{+/+}$ [241]. Notre première étude a confirmé ces données, et a permis de les compléter en prenant avantage d'un protocole d'étude réalisé sur le long terme dans des modes opératoires propres à nos conditions. Contrairement aux données de la littérature, qui ont été obtenues dans des conditions très variables, et qui sont morcelées, incomplètes, parfois discordantes, et donc difficilement comparables, les résultats expérimentaux collecté au cours de notre projet constituent un ensemble cohérent et qui se veut exhaustif pour la caractérisation des animaux sur les plans cardiaque, rénal et métabolique. Venant s'ajouter à ces données, le phénotypage vasculaire des animaux, qui a permis de caractériser leurs propriétés mécaniques artérielles, représente une partie originale du projet qui n'avait jamais été réalisée auparavant.

L'étude simultanée des paramètres cardiaques, vasculaires, rénaux et métaboliques en parallèle chez les rats SHHF$^{+/?}$ et SHHF$^{cp/cp}$ a confirmé la présence d'un l'hyperaldostéronisme, d'un SMet, et le développement d'une IC dont la sévérité est liée à la présence du SMet chez les SHHF$^{cp/cp}$. Si une insulino-résistance a été détectée chez les rats SHHF$^{cp/cp}$, aucune hyperglycémie à jeun ou DT2 n'a été relevé lors de notre étude, en discordance avec les données de la littérature [242, 254]. Cette divergence peut être liée aux conditions spécifiques mises en œuvre dans notre protocole, et qui sont assez différentes de celles utilisées dans certaines autres études. Par ailleurs, nous ne pouvons pas exclure la possibilité d'une dérive des souches SHHF avec lesquelles nous avons travaillé. En effet, ces dernières sont peu utilisées par la communauté scientifique, et sont maintenues à un niveau de base limité par le fournisseur. Il est possible que pendant cette phase de maintien, ou lors de la réactivation des souches pour les besoins de notre étude, une sélection d'un sous-type particulier d'animaux dépourvus de DT2 ait eu lieu. Cette hypothèse est difficile à vérifier puisque le fond génétique des rats SHHF est mal défini, les animaux ayant une origine congénique. Malgré l'absence d'un DT2 avéré chez les animaux, une résistance à l'insuline a été établie, et nous avons considéré que le modèle SHHF était dans ce contexte pertinent pour atteindre les objectifs définis dans notre projet puisqu'il présentait par ailleurs toutes les autres caractéristiques d'un SMet pouvant potentiellement favoriser le développement

d'une IC. Il est à noter que la dernière définition donnée par l'IDF pour le SMet, exige la présence de l'obésité associée à deux autres critères du SMet. Ainsi notre modèle reste en accord avec la définition du SMet malgré l'absence du DT2.

Notre étude longitudinale, étalée sur 12,5 mois pendant lesquels les animaux ont été régulièrement phénotypés, nous a permis de préciser la séquence d'apparition des composants du SMet chez les rats SHHF$^{cp/cp}$, et en particulier de définir le moment à partir duquel les dysfonctions cardiaques deviennent visibles. Nos résultats révèlent la présence chez les rats SHHF$^{cp/cp}$ dès l'âge de 1,5 mois d'un hyperaldostéronisme, une dyslipidémie et d'une insulino-résistance marquant les premiers signes du SMet. Les premières différences de masse corporelle entre les deux souches de rats sont observées à l'âge de 3 mois, à un moment où s'installe progressivement l'HTA en complétant le tableau clinique du SMet. À ce stade les animaux sont asymptomatiques pour l'IC, puisque les premières anomalies cardiaques sont mises en évidence à l'âge de 6 mois. Ces dernières s'aggravent progressivement jusqu'à l'IC déclarée qui est diagnostiquée chez les rats SHHF$^{cp/cp}$ à 14 mois d'âge. La connaissance des séquences d'événements conduisant cette souche de rats à l'IC était particulièrement importante pour définir la fenêtre d'intervention idéale pour un traitement préventif de l'IC par ARM.

Notre hypothèse de travail était qu'une telle intervention devait, pour être efficace, être mise en œuvre précocement pour cibler les composants du SMet connus pour aggraver l'IC, chez des animaux asymptomatiques sur le plan cardiaque. Les travaux de Caprio M. *et al.* ont montré que les ARM ont une capacité à induire des effets anti-adipogéniques pouvant ainsi moduler l'émergence de l'obésité et les complications du SMet [185, 255-257]. Ils ont également montré que l'antagonisation précoce du RM lors de l'adipogenèse permet une dédifférenciation du TA blanc à l'origine de l'obésité en TA brun thermogénique, un mécanisme pouvant prévenir les effets délétères de l'obésité sur le développement du SMet [183]. Sur la base de ces données et de nos résultats expérimentaux, il nous est apparu que la période optimale pour initier un traitement préventif par ARM chez les rats SHHF était située entre 1,5 et 3 mois d'âge. Ainsi, le traitement a été initié dès l'âge de 1,5 mois chez les rats SHHF$^{+/+}$ et SHHF$^{cp/cp}$ qui ont reçu quotidiennement à partir de cet âge, 100 mg/kg/jr d'Eplérénone, un ARM présentant une grande spécificité pour le RM et montrant une

efficacité importante dans le traitement de l'IC [258]. Nous avons exclu le choix de la Spironolactone, un autre ARM efficace mais moins spécifique, car ciblant également le récepteur aux glucocorticoïdes (RG) avec pour conséquence bien décrite l'induction de nombreux effets secondaires [259]. Ainsi, son administration chez l'homme peut générer une gynécomastie et une impuissance, alors que chez les femmes, elle peut perturber le cycle menstruel [260]. Dans le contexte de notre étude, l'Eplérénone a été administrée par sa dissolution dans l'eau de boisson à laquelle les animaux ont un accès tout à fait libre. Par ailleurs la dose d'Eplérénone a été régulièrement ajustée à leur prise hydrique évaluée par cage a métabolisme et son efficacité d'action a été évaluée par le dosage de l'aldostéronurie dont les taux augmentent fortement chez les animaux traités ($SHHF^{+/+}$ et $SHHF^{cp/cp}$) par rapport aux non traités [252, 261]. Une observation à ce niveau a été relevée et correspond au plus fort taux d'aldostéronurie mis en évidence chez les animaux $SHHF^{cp/cp}$ traités comparés aux animaux $SHHF^{+/+}$ traités qui peut être expliquée par le fait qu'initialement les $SHHF^{cp/cp}$ ont des taux d'Aldo plus élevés. Les effets de l'Eplérénone au niveau rénal n'ont pas été totalement explorés au cours de notre étude, mais nos résultats préliminaires sont en faveur d'une amélioration du phénotype rénal (moindre hypertrophie rénale, moindre chute du débit de filtration glomérulaire et moindre protéinurie). Plusieurs travaux ont montré l'amélioration du phénotype rénal par les ARM dans des modèles de SMet ou de néphropathie diabétique en révélant que l'Eplérénone est capable de réduire la protéinurie, la glomérulosclérose et la fibrose rénale [262, 263].

L'une des conséquences notables de l'administration chronique d'Eplérénone en monothérapie observée au cours de notre étude est une réduction de la mortalité des rats $SHHF^{cp/cp}$ traités dont la survie devient équivalente à celle des rats $SHHF^{+/+}$. Cette similitude entre ces deux groupes d'animaux a été également observée au niveau de l'analyse du transcriptome et miRNome qui a été réalisée sur les échantillons de cœur et de TA au cours de l'étude. Nos résultats révèlent que le traitement à l'Eplérénone s'accompagne d'une prise de poids significativement plus faible chez les rats $SHHF^{cp/cp}$ traités par rapport aux animaux non traités, et ce, dès 1,5 mois de traitement continu. Ces résultats suggèrent l'action anti-adipogénique de l'Eplérénone sur le développement de l'obésité, et sont en accord avec les données de la littérature montrant le rôle crucial du RM dans les processus d'adipogenèse [184, 185]. Par ailleurs, l'antagonisation du RM a permis d'induire un effet anti-

hypertrophique sur les adipocytes des rats SHHF$^{cp/cp}$ observés sur les coupes histologiques de tissus adipeux confirmant ainsi l'impact direct de l'ARM sur le métabolisme lipidique au sein de ces cellules. De façon intéressante, il est important de noter que la différence de masse corporelle obtenue entre les rats SHHF$^{cp/cp}$ traités et non traités au bout de 1.5 mois de traitement ne s'amplifie pas au cours du temps, même au bout de 11 mois de traitement (-10 % de prise de poids) mais reste constante entre les animaux jusqu'à la fin du protocole. Ceci suggère que l'action du RM sur l'adipogenèse se met en place dans les tout premiers stades et n'aurait que peu d'effets une fois l'adipogenèse enclenchée. En effet, les études cliniques ou expérimentales ayant utilisé un ARM chez des patients alors que leur obésité est déjà installée, ne mettent pas en évidence chez ces derniers une diminution de la masse corporelle [264, 265]. L'implication du RM dans les premiers stades de l'adipogenèse semble se confirmer également par les résultats de l'exploration du transcriptome et du miRNome adipeux viscéral montrant aucun effet de l'ARM sur l'activité transcriptionnelle chez les rats SHHF$^{cp/cp}$ à 12.5 mois d'âge, suggérant que les mécanismes transcriptionnels faisant intervenir le RM ont déjà été mis en place et ne sont plus visibles à ce stade.

Il faut également se rendre compte que nous n'avons pas totalement empêché la survenue de l'obésité en antagonisant le RM, mais seulement 10% de la masse corporelle. Peut-on extrapoler ce pourcentage à la part jouée par le RM dans l'obésité? Donc 90 % des processus favorisant l'adipogenèse seraient liés à d'autres effecteurs importants. Sans aucun doute que la mutation du récepteur de la leptine et la disparition de sa signalisation chez les rats SHHF$^{cp/cp}$ intervient dans une part très importante des effets pro-adipogénique et l'obésité des SHHF$^{cp/cp}$. Notons cependant, qu'une étude très récente indique un rôle crucial du RG (récepteur des glucocorticoïdes) dans l'adipogenèse en comparaison au RM [266]. Les auteurs ont en effet testés le rôle différentiel joué par le RM et le RG dans l'adipogenèse en éteignant respectivement l'expression de ces deux récepteurs par des ARN interférents dans des cultures primaires de pré-adipocytes et adipocytes provenant de sujets sains. Ils montrent que l'extinction de l'expression du RG bloque les effets pro-adipogéniques induit par le cortisol en diminuant l'expression de la leptine, de l'adiponectine et en augmentant l'expression de la cytokine pro-inflammatoire IL-6. Alors que l'extinction de l'expression du RM induit une augmentation de l'expression d'adiponectine, de leptine et réduit la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires (IL-6, TNFα et MCP-1). Ainsi, les 2 récepteurs semblent avoir des effets opposés au cours de l'adipogenèse et réguleraient alors des voies de

signalisation différentes. Au cours de notre étude nous n'avons pas évalué l'effet du GR et du cortisol sur le développement de l'obésité. L'étude du transcriptome adipeux des SHHF$^{cp/cp}$ nous a permis en revanche de montrer une augmentation significative de l'expression du RM et du RG avec l'âge (12.5 mois d'âge *vs*. 1.5 mois d'âge) chez les SHHF$^{cp/cp}$. Ces résultats ne nous permettent cependant pas de distinguer un effet différentiel du RG ou du RM dans le TA par le biais de l'analyse transcriptomique. Peut-on alors dans ce contexte suggérer que la double antagonisation à la fois du RG et du RM puisse apporter des effets bénéfiques supplémentaires sur le développement de l'obésité ? Cette hypothèse resterait à vérifier.

Sur le plan métabolique, nos résultats ne montrent pas de modifications de l'insulino-résistance sous l'effet de l'Eplérénone chez les SHHF$^{cp/cp}$. Une amélioration de la sensibilité à l'insuline et une diminution de l'hyperglycémie à jeun induites par l'antagonisation du RM ont cependant été observées dans deux modèles de souris obèses mutées pour la leptine et son récepteur: souris ob/ob et souris db/db respectivement [182]. De même, en clinique l'administration d'ARM a permis de réduire l'insulino-résistance [265, 267, 268] chez des patients présentant un SMet. La littérature suggère l'implication cruciale du stress oxydatif et des espèces réactives de l'oxygène (ERO) dans les mécanismes d'insulino-résistance. L'Aldo via le RM, augmente la génération d'ERO qui vont participer à l'aggravation de l'insulino-résistance [269], et les ARM améliore la sensibilité à l'insuline en réduisant la production d'ERO [182]. Cependant, Shulman GI. *et al.* ont déjà montré que les AG libres participent aux mécanismes d'insulino-résistance en inhibant la phosphorylation du récepteur de l'insuline [270]. Nos résultats ont montré que l'Eplérenone n'a pas permis non plus de diminuer les taux circulants d'AG libres chez les SHHF$^{cp/cp}$, ceci laisse suggérer que l'absence d'effets sur l'insulino-résistance dans notre étude provienne de l'absence d'effets de l'ARM sur les AG.

Si le traitement chronique avec l'Eplérenone n'a pas d'effets sur les taux d'AG libres dans notre étude, il a permis de réduire de manière significative les taux de cholestérol total et particulièrement le LDL cholestérol ainsi que les TG contribuant ainsi à l'amélioration de la dyslipidémie chez les rats SHHF$^{cp/cp}$. Ceci est en accord avec les données issues de diverses études expérimentales et cliniques. Ainsi, Wada T *et al.* ont montré que l'antagonisation du RM dans un modèle de souris soumis à un régime gras permet d'améliorer leur métabolisme lipidique [271]. De plus, chez l'Homme, des études cliniques ont montré chez des patients

présentant des troubles métaboliques ou un SMet, que l'utilisation d'un ARM permet de réduire leur dyslipidémie [152, 183, 185, 255, 256, 272, 273]. Avec le TA, le foie joue un rôle primordial dans le métabolisme lipidique et pourrait donc être une cible importante, directe ou indirecte, de l'action de l'Eplérénone. Dans le cadre de notre étude, si nous avons pu mettre en évidence que la dyslipidémie des rats SHHF$^{cp/cp}$ non traités est effectivement accompagnée d'une stéatose hépatique, nous n'avons pas eu le temps matériel de caractériser complètement l'impact de l'ARM au niveau hépatique. Les prélèvements biologiques de foie existent, et des analyses histologiques et du transcriptome devraient pouvoir être réalisées afin de vérifier si l'Eplérénone a permis de moduler la stéatose hépatique chez les animaux SHHF$^{cp/cp}$. Cependant nos résultats préliminaires de dosage des transaminases hépatiques : l'aspartate amino transférase (ASAT) et l'alanine amino transférase (ALAT) montrent que l'Eplérenone a permis de réduire significativement les taux d'ALAT sériques. Ceci est en accord avec les travaux de Wada T.*et al.* montrant que l'Eplérénone est capable de prévenir la stéatose hépatique dans un modèle de souris surexprimant SREBP-1c (*sterol response element binding protein-1c*) au niveau du foie en réduisant les taux de ALAT [272].

Sur le plan hémodynamique, nous n'avons pas observé d'effets sur la PA, ni sur les propriétés mécaniques artérielles (*echotracking* vasculaire). Il faut noter que les données disponibles dans la littérature concernant l'effet de l'Eplérénone sur la PA, à des doses équivalentes à la nôtre, sont assez mitigées, certaines études montrent un effet hypotenseur [274, 275] dans d'autres aucun effet hypotenseur n'est observé [250, 276]. Il est probable que ces résultats divergents soient le reflet de différences méthodologiques dans la mesure de la PA. En effet, certaines études considèrent la PA centrale alors que d'autres prennent en compte la PA périphérique. Dans notre cas, nous avons mesuré à la fois la PA périphérique et centrale (invasive) et dans les deux situations, aucun effet presseur de l'Eplérénone n'a été constaté.

Si une absence d'amélioration de l'HTA sous ARM a été relevée dans notre étude, nos résultats indiquent cependant une amélioration des paramètres cardiaques structuraux et fonctionnels chez les rats SHHF$^{cp/cp}$ traités. L'amélioration des performances cardiaques sous l'action d'un traitement chronique à l'Eplérénone a également été obtenue lors d'une étude chez des rats SHR [277]. Cependant, toujours chez le rat SHR, Cezar *et al.* ont montré que

l'antagonisation du RM améliore la survie des rats sans modifier leurs paramètres de fonction et de remodelage myocardique [278]. Dans cette même optique, une étude clinique randomisée a récemment mis en évidence que l'ajout d'un ARM (Spironolactone) au traitement antihypertenseur (IEC et ARA II) donné à des patients présentant un SMet permet d'améliorer leurs performances cardiaques, de prévenir l'hypertrophie myocardique mais également de diminuer les taux circulants de propeptides carboxy-terminale du collagène de type I (PICP), un marqueur du remodelage myocardique [264]. Appuyant nos études fonctionnelles, nos résultats d'analyse du transcriptome et du miRNome cardiaques montrent que l'Eplérénone induit la diminution de l'expression de gènes impliqués dans le remodelage cardiaque et l'inflammation tels que le collagène (Col3a1), la fibronectine (FN1), la vimentine (Vim), le facteur de croissance transformant β2 (TGFβ2) mais également des MMP et TIMP tels que la MMP12, la MMP2 et TIMP1. Par ailleurs, l'analyse du miRNome cardiaque des rats SHHF$^{cp/cp}$ traités à l'Eplérénone par rapport aux SHHF$^{cp/cp}$ non traités nous a permis d'identifier 6 miRs cibles du traitement dont l'expression est systématiquement diminuée : miR-377-5p, -34c-3p, -31-5p, 31-3p, -146a-5p, et -147. Ces miRs n'ont jamais été décrits dans la littérature comme étant en liaison avec l'action du RM et leur expression était fortement augmentée avec le vieillissement des SHHF$^{cp/cp}$ (12.5 mois *vs* 1.5 mois d'âge). Nous proposons donc ici par notre étude, ces miRs comme des marqueurs de la signature thérapeutique de l'ARM au niveau cardiaque. Afin de mieux comprendre leurs rôles dans la régulation des processus profibrotiques ralentis par l'Eplérénone, nous avons utilisés les outils de prédiction bioinformatique permettant d'étudier les cibles de ces miRs dans nos données. Nous avons identifiés que les miRs-146a-5p et 31-5p participant à la régulation de l'expression du facteur de transcription NFκB un intermédiaire majeur dans les processus pro-inflammatoires initiant les évènements pro-fibrotiques. Ce résultat est également cohérent avec l'analyse des coupes histologiques qui révèle une moindre fibrose cardiaque dans les sections de cœurs issus de rats SHHF$^{cp/cp}$ traités par rapport aux animaux non traités. Si la littérature est très abondante sur les preuves expérimentales et cliniques impliquant le rôle de l'Aldo et du RM dans les processus pro-fibrotiques, pro-hypertrophiques et pro-inflammatoires dans le cœur [103, 107, 277], elle est pratiquement inexistante sur l'implication du RM dans la régulation du métabolisme énergétique au niveau cardiaque. Notre étude a révélé une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la fonction de métabolisme énergétique cardiaque des AG (β-oxydation des AG) sous l'effet

du traitement chronique à l'Eplérénone. Ainsi, nous avons montré chez les SHHF$^{cp/cp}$ traités par rapport aux non traités une surexpression de gènes tels que la HADH (hydroxyacyl CoA déshydrogénase), ACOX2 (AcylCoA oxydase), UCP3 (uncoupling protein 3), EHHADH (Enoyl CoA hydratase), DGAT1 (diacylglycérol acyltransférase) et AGPAT9 (1 acylglycérol-3-phosphate-O-acyltransferase) qui sont impliqués dans l'oxydation des AG. Une seule étude récente menée par Ramirez *et al.* a montrée des effets sur quelques-uns des effecteurs de cette voie dans le cœur de rat Zucker diabetic fatty (ZDF) non hypertendus en révélant une diminution d'expression cette fois au niveau protéique de la DGAT1 et GPAT1 [103]. Les auteurs montrent que la diminution de l'expression de ces deux protéines associée à celle de FABP3, qui est impliqué dans le transport des lipides dans les cardiomyocytes, contribuent à la réduction de la stéatose myocardique observée chez ces rats. Nos résultats montrent à l'inverse que les transcrits de ces protéines sont augmentés suite au traitement chronique à l'Eplérénone, mais son impact au niveau protéique n'a pas encore été analysé dans notre étude, de même que la stéatose cardiaque chez nos rats. De façon intéressante, dans la littérature ces phénomènes de régulation du métabolisme énergétique des AG au niveau cardiaque ont été beaucoup étudiés avec l'agent pharmacologique anti-diabétique Metformine [254, 279] qui agit en diminuant l'insulino-résistance. Les travaux de Cittadini *et al.* en particulier ont en effet montré que le traitement chronique avec la Metformine en monothérapie chez les rats SHHF$^{cp/cp}$ permettait de prévenir la progression vers l'IC en atténuant le remodelage cardiaque, la fibrose et l'accumulation de lipides au niveau cardiaque. Ces effets contribuent à l'amélioration des fonctions systoliques et diastoliques cardiaques de ces rats. Les résultats de Cittadini sont très similaires à ceux obtenus dans notre étude en utilisant l'agent pharmacologique Eplérénone en monothérapie chronique. Les travaux de Ramirez *et al.* montrent ensuite chez des rats diabétiques et insulino-résistants (rats ZDF) que l'Eplérénone permet d'obtenir une moindre stéatose cardiaque appuyant ainsi le lien entre RM et l'insulino-résistance cardiaque. Dans la littérature, il n'existe pas de lien mécanistique décrivant la relation entre le RM et l'oxydation des AG au niveau cardiaque. Au vue de nos résultats et ceux obtenus par Ramirez *et al*. il est fort probable que l'Eplérénone ait modulé cette fonction en agissant sur l'insulino-résistance cardiaque. Les techniques d'analyses transcriptomique par *microarrays* employées dans notre étude ne permettent pas de répondre à cette question. Nous ne pouvons en effet conclure sur l'effet mécanistique entre insulino-résistance et RM cardiaque par le biais de

cette technique mais elle nous a permis de mettre en évidence un l'impact thérapeutique de l'Eplérénone sur cette fonction biologique. En revanche, l'intégration des données obtenues sur le miRNome cardiaque avec l'expression des gènes impliqués dans l'oxydation des AG nous a permis d'identifier miR-31-5p comme participant à la régulation de cette fonction au niveau cardiaque. Les outils de prédiction bio-informatiques montrent que miR-31-5p dont l'expression est diminuée chez les $SHHF^{cp/cp}$ ayant reçu le traitement chronique à l'Eplérénone est capable de réguler l'expression de la HADH et ACDSB (acyl- CoA déshydrogénase, chaîne courte/ramifiée spécifique) impliqués dans la β-oxydation des AG. D'autres investigations sont nécessaires afin de valider le lien entre miR-31-5p et cette fonction mais nos résultats permettent dans un premier temps en tant que phase exploratoire expérimentale, de proposer ce lien. Par ailleurs, l'amélioration des troubles liés au métabolisme énergétique des AG sous l'effet de l'Eplérénone a pu contribuer à l'amélioration des processus de remodelage cardiaque également observé dans nos données d'analyse trancriptomique. Il est difficile de dire avec exactitude laquelle de ces deux grandes fonctions biologiques qui ont été modulés par l'Eplérénone (métabolisme énergétique et remodelage cardiaque) a permis de contribuer à l'amélioration de l'autre compte tenu de notre design expérimental ne faisant intervenir que les deux âges extrêmes (1.5 et 12.5 mois d'âge sans points intermédiaires).

Il est cependant certain que l'effet conjoint de l'amélioration des troubles métaboliques, de l'amélioration de ceux obtenus sur quelques-uns des paramètres rénaux et possiblement de la fonction hépatique encore à explorer aient participé à l'amélioration du phénotype cardiaque observé dans notre étude. Nous ne pouvons cependant pas exclure des effets cardioprotecteurs directs de l'Eplérénone au niveau du tissu cardiaque indépendamment d'un passage initial par l'amélioration des composants du SMet. En effet, bien que faible, les animaux $SHHF^{+/+}$ présentent tout de même une amélioration de leur hypertrophie cardiaque alors qu'ils ne développent pas de symptômes du SMet. Donc un effet anti-minéralocorticoïdes cardiaque direct a du partiellement contribuer aux effets de l'amélioration du phénotype d'IC. Si nos résultats ne permettent pas de distinguer la contribution de chaque paramètre du SMet dans l'amélioration du phénotype cardiaque, une analyse de co-expression du transcriptome/miRNome de chacun des organes étudié (cœur et TA viscéral) et du phénome (tous les paramètres phénotypiques analysés sur le

plan cardiaque, métabolique, vasculaire et rénal) ont permis d'identifier des profils de gènes et miRs statistiquement fortement associés. En effet, nous avons par exemple identifié les gènes HDC (histidine décarboxylase), GRIA4 (récepteur ionotrope du glutamate AMPA4) et ADAMTS19 (A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 19) et miR-127 comme étant des éléments fortement inversement corrélés (r= -0,9) avec le paramètre masse corporelle des animaux de manière systématique quel que soit l'âge (1.5 ou 12.5 mois), le génotype ($^{+/+}$ et $^{cp/cp}$) et s'ils sont traités ou non à l'Eplérénone. Ces gènes ou miRs identifiés sont encore en cours d'exploration afin de comprendre quel pourrait être leurs rôles dans la physiopathologie de l'obésité. Le fait que l'expression de ces gènes varie de manière similaire à l'évolution du paramètre auxquels ils sont associés indique qu'ils sont de potentiels marqueurs de la physiopathologie impliquant ce paramètre. Ainsi, l'étude intégrative du phénome, du transcriptome et du miRNome permet d'avoir une vue d'ensemble des phénomènes physiopathologiques s'opérant au cours des maladies.

CONCLUSIONS

et

PERSPECTIVES

CONCLUSIONS et PERSPECTIVES

Cette étude a permis d'apporter de nouvelles preuves expérimentales en faveur de l'apport bénéfique des ARM dans le SMet et l'IC. Si l'ajout d'ARM au traitement conventionnel de l'IC a permis en clinique d'améliorer la morbi-mortalité des patients, nous proposons qu'un traitement préventif de l'IC en agissant sur les facteurs de risques métaboliques peut constituer une nouvelle stratégie peut-être plus efficace pour la prise en charge des patients présentant un SMet et à risque d'IC. Cette stratégie nous a permis de cibler l'obésité et la dyslipidémie, deux acteurs importants du SMet, sans effet sur l'HTA. Cela a pour conséquence une amélioration des structures et fonctions cardiaques des rats $SHHF^{cp/cp}$. Il est en effet montre qu'une diminution de 5 à 10 % de la masse corporelle permet de réduire de manière significative le risque de MCV [280].
L'action bénéfique de l'Eplérénone sur la survie des animaux vient témoigner de l'efficacité de ce traitement préventif. Possiblement que l'adjonction d'un traitement anti-hypertenseur à la thérapie ARM aurait permis d'apporter des effets bénéfiques supplémentaires par le contrôle de l'HTA, un acteur majeur dans la progression vers l'IC.

Si le traitement chronique à l'Eplérénone a permis de moduler l'obésité, la dyslipidémie mais également le phénotype d'IC, l'analyse des impacts moléculaires de l'Eplérénone n'a pu être observée au niveau du TA. En effet, cela est due au fait que notre protocole expérimental n'a pas prévu de temps intermédiaires plus précoce d'analyse du transcriptome/miRNome d'organe dont les modifications transcriptionnelles liées au RM s'opèrent de manière plus précoce tel que le TA. Ainsi, il serait intéressant d'envisager une étude longitudinale explorant les paramètres phénotypiques et moléculaires sur des temps intermédiaires et plus rapprochés. Ainsi nous pourrions investiguer les évènements moléculaires ayant été impactés dans le TA en explorant le transcriptome/miRNome à 3 mois d'âge, au moment où débutent les premiers effets de l'ARM sur la masse corporelle. Par ailleurs, il serait également informatif d'étudier le transcriptome/miRNome de la graisse péri-cardique afin de montrer un impact plus direct de la graisse viscérale sur le cœur. Dans le contexte de

notre étude, le choix de l'analyse de la graisse viscérale péri-rénale ne permet pas de faire ce lien direct.

L'étude des fonctions biologiques impactées par l'Eplérénone au niveau cardiaque a permis d'identifier son effet connu sur le remodelage myocardique mais nous a permis également de mettre en évidence un nouveau mécanisme d'action de l'Eplérénone jusque-là très peu décrit dans la littérature et impliquant le métabolisme énergétique des AG cardiaque dans un contexte de SMet et d'IC. Le biais des *microarrays* ne permet pas d'identifier par quel processus exacte le RM module cette fonction biologique, ainsi des systèmes d'études in vitro sur cardiomyocytes en culture permettrait d'étudier spécifiquement cette voie et de valider son rôle dans l'insulino-résistance cardiomyocytaire. Ceci permettrait également d'identifier les voies de régulations cellulaires de ce processus par l'utilisation par exemple d'inhibiteurs de la voie PI3K-Akt ainsi que eNOS qui jouent un rôle majeur dans les mécanismes d'insulino-résistance cardiaque. L'expression diminuée des ARNm de PI3K et eNOS dans le cœur vieillissant des $SHHF^{cp/cp}$ appuie le fait que cette voie semble jouer un rôle dans ce mécanisme. De plus, l'Eplérenone permet d'empêcher la diminution de leur expression. La relation entre cette voie de signalisation et le RM, est l'une des pistes de nos investigations futures.

L'intérêt majeur de ce projet est la prévention de l'IC, c'est pourquoi nos objectifs se sont tournées dans un premier temps à cibler les composants du SMet pour prévenir le développement de l'IC mais implique également l'identification des mécanismes ou biomarqueurs pouvant être à l'origine de l'évolution de l'IC. Ainsi, nous avons adopté une approche analytique originale couplant les données phénotypiques avec les données transcriptomiques. Cette approche nous a permis de révéler des profils d'expression de gènes et miRs tissulaires candidats pouvant servir de marqueurs potentiels de la pathologie cardiaque et de celle de l'obésité. Par ailleurs, ces dernières années, une recherche intensive au niveau expérimental et clinique s'est dirigée vers l'identification de biomarqueurs miRs circulants indicateurs de la souffrance tissulaire liée à l'installation d'une pathologie. Ces investigations font l'objet de dépôts massifs de brevet dans la Recherche car ces miRs circulants pourraient apporter une valeur ajoutée dans le diagnostic de l'IC et du SMet ou de stratifier les patients selon leurs facteurs de risque pour optimiser leurs traitements thérapeutique. Ainsi dans le contexte de notre projet, des études préliminaires

nous ont permis d'identifier des profils de miRs circulants dont l'exploitation est en cours afin de les corréler et valider dans des cohortes de patients présentant un SMet et une IC.

Enfin, si l'effet multi-cibles des ARM permet d'obtenir des effets bénéfiques de plusieurs ordres (métabolique, cardiaque, rénal, hépatique), ils peuvent aussi contribuer à des effets secondaires multiples. Ainsi, des études à très long terme suite à l'utilisation des ARM sont encore nécessaires afin de garantir la sûreté de ces traitements. L'effet secondaire majeur connu des ARM est l'hyperkaliémie pouvant à long-terme avoir des répercussions adverses sur la fonction rénale et la fonction cardiaque. Une nouvelle génération d'antagonistes non stéroïdiens des RM fait actuellement surface par l'industrie pharmaceutique Bayer® : la « Finerenone » et montrent des effets plus sélectifs pour le RM que l'Eplérénone en n'ayant pas d'effets secondaires d'hyperkaliémie [281]. L'utilisation de cette molécule dans le contexte d'un SMet pour prévenir la survenue de l'IC pourrait être une stratégie potentiellement intéressante.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

1. Alberti, K.G., P. Zimmet, and J. Shaw, *The metabolic syndrome--a new worldwide definition.* Lancet, 2005. **366**(9491): p. 1059-62.

2. McKee, P.A., et al., *The natural history of congestive heart failure: the Framingham study.* N Engl J Med, 1971. **285**(26): p. 1441-6.

3. Ho, K.K., et al., *The epidemiology of heart failure: the Framingham Study.* J Am Coll Cardiol, 1993. **22**(4 Suppl A): p. 6a-13a.

4. McMurray JJ, A.S., Anker SD, Auricchio A, Böhm M, Dickstein K, Falk V, Filippatos G, Fonseca C, Gomez-Sanchez MA, Jaarsma T, Køber L, Lip GY, Maggioni AP, Parkhomenko A, Pieske BM, Popescu BA, Rønnevik PK, Rutten FH, Schwitter J, Seferovic P, Stepinska J, Trindade PT, Voors AA, Zannad F, Zeiher A; Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology, Bax JJ, Baumgartner H, Ceconi C, Dean V, Deaton C, Fagard R, Funck-Brentano C, Hasdai D, Hoes A, Kirchhof P, Knuuti J, Kolh P, McDonagh T, Moulin C, Popescu BA, Reiner Z, Sechtem U, Sirnes PA, Tendera M, Torbicki A, Vahanian A, Windecker S, McDonagh T, Sechtem U, Bonet LA, Avraamides P, Ben Lamin HA, Brignole M, Coca A, Cowburn P, Dargie H, Elliott P, Flachskampf FA, Guida GF, Hardman S, Iung B, Merkely B, Mueller C, Nanas JN, Nielsen OW, Orn S, Parissis JT, Ponikowski P;, *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 J Heart Fail., 2012 **14**(8): p. 803-869.

5. Nielsen OW, H.J., Larsen CT, Hansen JF., *Cross sectional study estimating prevalence of heart failure and left ventricular systolic dysfunction in community patients at risk.* Heart., 2001. **86**(2): p. 172-178.

6. WRITING GROUP MEMBERS, L.-J.D., Adams RJ, Brown TM, Carnethon M, Dai S, De Simone G, Ferguson TB, Ford E, Furie K, Gillespie C, Go A, Greenlund K, Haase N, Hailpern S, Ho PM, Howard V, Kissela B, Kittner S, Lackland D, Lisabeth L, Marelli A, McDermott MM, Meigs J, Mozaffarian D, Mussolino M, Nichol G, Roger VL, Rosamond W, Sacco R, Sorlie P, Roger VL, Thom T, Wasserthiel-Smoller S, Wong ND, Wylie-Rosett J; American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee., *Heart disease and stroke statistics--2010 update: a report from the American Heart Association.* Circulation, 2010. **121**(7): p. e46-e215.

7. Ferlay J, S.I., Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F, *Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11.* GLOBOCAN 2012, 2012.

8. Organization, W.H., *Global summary of the AIDS epidemic* Global health observatory, 2013.

9. Curtis, L.H., et al., *Incidence and prevalence of heart failure in elderly persons, 1994-2003.* Arch Intern Med, 2008. **168**(4): p. 418-24.

10. Morgan S, S.H., Simpson I, Liddiard GS, Raphael H, Pickering RM, Mant D., *Prevalence and clinical characteristics of left ventricular dysfunction among elderly patients in general practice setting: cross sectional survey.* BMJ, 1999. **318**(7180): p. 368-372.

11. Redfield MM, J.S., Burnett JC Jr, Mahoney DW, Bailey KR, Rodeheffer RJ., *Burden of systolic and diastolic ventricular dysfunction in the community: appreciating the scope of the heart failure epidemic.* JAMA, 2003. **289**(2): p. 194-202.

12. Roger, V.L., *Epidemiology of heart failure.* Circ Res, 2013. **113**(6): p. 646-59.

13. Beltran-Sanchez, H., et al., *Prevalence and trends of metabolic syndrome in the adult U.S. population, 1999-2010.* J Am Coll Cardiol, 2013. **62**(8): p. 697-703.

14. Stewart S, M.K., Capewell S, McMurray JJ., *Heart failure and the aging population: an increasing burden in the 21st century?* Heart., 2003. **89**(1): p. 49-53.

15. Cowie MR, F.K., Wood DA, Metcalfe C, Thompson SG, Coats AJ, Poole-Wilson PA, Sutton GC., *Hospitalization of patients with heart failure: a population-based study.* Eur Heart J., 2002. **23**(11): p. 877-885.

16. Mosterd A, H.A., *Clinical epidemiology of heart failure.* Heart., 2007 **93**(9): p. 1137-1146.

17. Massetti, M. and P. Bruno, *Mechanical circulatory support for acute heart failure in 2013: an update on available devices, indications and results.* Minerva Anestesiol, 2014. **80**(3): p. 373-81.

18. Mentz, R.J., et al., *Learning from recent trials and shaping the future of acute heart failure trials.* Am Heart J, 2013. **166**(4): p. 629-35.

19. Nieminen MS, B.M., Cowie MR, Drexler H, Filippatos GS, Jondeau G, Hasin Y, Lopez-Sendon J, Mebazaa A, Metra M, Rhodes A, Swedberg K, Priori SG, Garcia MA, Blanc JJ, Budaj A, Cowie MR, Dean V, Deckers J, Burgos EF, Lekakis J, Lindahl B, Mazzotta G, Morais J, Oto A, Smiseth OA, Garcia MA, Dickstein K, Albuquerque A, Conthe P, Crespo-Leiro M, Ferrari R, Follath F, Gavazzi A, Janssens U, Komajda M, Morais J, Moreno R, Singer M, Singh S, Tendera M, Thygesen K; ESC Committe for Practice Guideline (CPG). *Executive summary of the guidelines on the diagnosis and treatment of acute heart failure: the Task Force on Acute Heart Failure of the European Society of Cardiology.* Eur Heart J., 2005 **26**(4): p. 384-416.

20. Dar O, C.M., *Acute heart failure in the intensive care unit: epidemiology.* Crit Care Med., 2008 **36**(1 Suppl): p. S3-S8.

21. Yancy, C.W., et al., *2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines.* J Am Coll Cardiol, 2013. **62**(16): p. e147-239.

22. Hogg K, S.K., McMurray J., *Heart failure with preserved left ventricular systolic function; epidemiology, clinical characteristics, and prognosis.* J Am Coll Cardiol., 2004. **43**(3): p. 317-327.

23. Fischer M, B.A., Hense HW, Hengstenberg C, Muscholl M, Holmer S, Döring A, Broeckel U, Riegger G, Schunkert H., *Prevalence of left ventricular diastolic dysfunction in the community. Results from a Doppler echocardiographic-based survey of a population sample.* Eur Heart J, 2003. **24**(4): p. 320-328.

24. Komamura, K., *Similarities and Differences between the Pathogenesis and Pathophysiology of Diastolic and Systolic Heart Failure.* Cardiol Res Pract., 2013. **2013**.

25. Paulus WJ, T.C., Sanderson JE, Rusconi C, Flachskampf FA, Rademakers FE, Marino P, Smiseth OA, De Keulenaer G, Leite-Moreira AF, Borbély A, Edes I, Handoko ML, Heymans S, Pezzali N, Pieske B, Dickstein K, Fraser AG, Brutsaert DL., *How to diagnose diastolic heart failure: a consensus statement on the diagnosis of heart failure with normal left ventricular ejection fraction by the Heart Failure and Echocardiography Associations of the European Society of Cardiology.* Eur Heart J., 2007. **28**(20): p. 2539-2550.

26. Borlaug BA, P.W., *Heart failure with preserved ejection fraction: pathophysiology, diagnosis, and treatment.* Eur Heart J., 2011. **32**(6): p. 670-679.

27. Kemp, C.D. and J.V. Conte, *The pathophysiology of heart failure.* Cardiovasc Pathol, 2012. **21**(5): p. 365-71.

28. McMurray JJ, P.M., *Heart failure.* The Lancet, 2005. **365**(9474): p. 1877-1889.

29. Florea, V.G. and J.N. Cohn, *The autonomic nervous system and heart failure.* Circ Res, 2014. **114**(11): p. 1815-26.

30. Wachter, S.B. and E.M. Gilbert, *Beta-adrenergic receptors, from their discovery and characterization through their manipulation to beneficial clinical application.* Cardiology, 2012. **122**(2): p. 104-12.

31. Milano, C.A., et al., *Enhanced myocardial function in transgenic mice overexpressing the beta 2-adrenergic receptor.* Science, 1994. **264**(5158): p. 582-6.

32. Engelhardt, S., et al., *Progressive hypertrophy and heart failure in beta1-adrenergic receptor transgenic mice.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(12): p. 7059-64.

33. Rockman, H.A., W.J. Koch, and R.J. Lefkowitz, *Cardiac function in genetically engineered mice with altered adrenergic receptor signaling.* Am J Physiol, 1997. **272**(4 Pt 2): p. H1553-9.

34. Bisognano, J.D., et al., *Myocardial-directed overexpression of the human beta(1)-adrenergic receptor in transgenic mice.* J Mol Cell Cardiol, 2000. **32**(5): p. 817-30.

35. Asai, K., et al., *Beta-adrenergic receptor blockade arrests myocyte damage and preserves cardiac function in the transgenic G(salpha) mouse.* J Clin Invest, 1999. **104**(5): p. 551-8.

36. Babick, A., et al., *Reversal of cardiac dysfunction and subcellular alterations by metoprolol in heart failure due to myocardial infarction.* J Cell Physiol, 2013. **228**(10): p. 2063-70.

37. Ni, L., et al., *beta-AR blockers suppresses ER stress in cardiac hypertrophy and heart failure.* PLoS One, 2011. **6**(11): p. e27294.

38. Bogaard, H.J., et al., *Adrenergic receptor blockade reverses right heart remodeling and dysfunction in pulmonary hypertensive rats.* Am J Respir Crit Care Med, 2010. **182**(5): p. 652-60.

39. Packer, M., et al., *The effect of carvedilol on morbidity and mortality in patients with chronic heart failure. U.S. Carvedilol Heart Failure Study Group.* N Engl J Med, 1996. **334**(21): p. 1349-55.

40. MacGregor, J.F., et al., *Carvedilol produces sustained long-term benefits: follow-up at 12 years.* Congest Heart Fail, 2009. **15**(1): p. 5-8.

41. Hawkins, U.A., et al., *The ubiquitous mineralocorticoid receptor: clinical implications.* Curr Hypertens Rep, 2012. **14**(6): p. 573-80.

42. Nakamura, Y., et al., *Hypertrophic growth of cultured neonatal rat heart cells mediated by vasopressin V(1A) receptor.* Eur J Pharmacol, 2000. **391**(1-2): p. 39-48.

43. Naitoh, M., et al., *Neurohormonal antagonism in heart failure; beneficial effects of vasopressin V(1a) and V(2) receptor blockade and ACE inhibition.* Cardiovasc Res, 2002. **54**(1): p. 51-7.

44. Tilley, D.G., et al., *beta-Adrenergic Receptor-Mediated Cardiac Contractility is Inhibited via Vasopressin Type 1A-Receptor-Dependent Signaling.* Circulation, 2014.

45. Greene, S.J., et al., *The prognostic significance of heart rate in patients hospitalized for heart failure with reduced ejection fraction in sinus rhythm: insights from the EVEREST (Efficacy of Vasopressin Antagonism in Heart Failure: Outcome Study With Tolvaptan) trial.* JACC Heart Fail, 2013. **1**(6): p. 488-96.

46. Rohini, A., et al., *Molecular targets and regulators of cardiac hypertrophy.* Pharmacol Res, 2010. **61**(4): p. 269-80.

47. Tamura, N., et al., *Cardiac fibrosis in mice lacking brain natriuretic peptide.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(8): p. 4239-44.

48. Crivellente, F., et al., *Atrial natriuretic peptides in Han Wistar, Sprague-Dawley and spontaneously hypertensive rats.* J Appl Toxicol, 2012. **32**(7): p. 521-6.

49. Sergeeva, I.A., et al., *A transgenic mouse model for the simultaneous monitoring of ANF and BNP gene activity during heart development and disease.* Cardiovasc Res, 2014. **101**(1): p. 78-86.

50. Troughton, R.W. and A.M. Richards, *B-type natriuretic peptides and echocardiographic measures of cardiac structure and function.* JACC Cardiovasc Imaging, 2009. **2**(2): p. 216-25.

51. Fauci AS, K.D., Braunwald E, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Loscalzo J, *Principles of internal Medicine.* Harrison's, 2005. **17**.

52. Rodriguez-Pascual, F., O. Busnadiego, and J. Gonzalez-Santamaria, *The profibrotic role of endothelin-1: Is the door still open for the treatment of fibrotic diseases?* Life Sci, 2013.

53. Heiden, S., et al., *Vascular endothelium derived endothelin-1 is required for normal heart function after chronic pressure overload in mice.* PLoS One, 2014. **9**(2): p. e88730.

54. Callanan, E.Y., et al., *Renal and cardiac neuropeptide Y and NPY receptors in a rat model of congestive heart failure.* Am J Physiol Renal Physiol, 2007. **293**(6): p. F1811-7.

55. Wong, H.K., T.T. Cheung, and B.M. Cheung, *Adrenomedullin and cardiovascular diseases.* JRSM Cardiovasc Dis, 2012. **1**(5).

56. Kakkar, R. and R.T. Lee, *ST2 and adrenomedullin in heart failure.* Heart Fail Clin, 2009. **5**(4): p. 515-27.

57. Xue, Y., et al., *Mid-region pro-adrenomedullin adds predictive value to clinical predictors and Framingham risk score for long-term mortality in stable outpatients with heart failure.* Eur J Heart Fail, 2013. **15**(12): p. 1343-9.

58. Sharma, J.N., *Cardiovascular activities of the bradykinin system.* ScientificWorldJournal, 2008. **8**: p. 384-93.

59. Pang, H., et al., *Effect of apelin on the cardiac hemodynamics in hypertensive rats with heart failure.* Int J Mol Med, 2014. **34**(3): p. 756-64.

60. Falcao-Pires, I. and A.F. Leite-Moreira, *Apelin: a novel neurohumoral modulator of the cardiovascular system. Pathophysiologic importance and potential use as a therapeutic target.* Rev Port Cardiol, 2005. **24**(10): p. 1263-76.

61. Doenst, T., T.D. Nguyen, and E.D. Abel, *Cardiac metabolism in heart failure: implications beyond ATP production.* Circ Res, 2013. **113**(6): p. 709-24.

62. Kolwicz, S.C., Jr., S. Purohit, and R. Tian, *Cardiac metabolism and its interactions with contraction, growth, and survival of cardiomyocytes.* Circ Res, 2013. **113**(5): p. 603-16.

63. Nickel, A., J. Loffler, and C. Maack, *Myocardial energetics in heart failure.* Basic Res Cardiol, 2013. **108**(4): p. 358.

64. Ventura-Clapier, R., et al., *Bioenergetics of the failing heart.* Biochim Biophys Acta, 2011. **1813**(7): p. 1360-72.

65. Aubert, G., R.B. Vega, and D.P. Kelly, *Perturbations in the gene regulatory pathways controlling mitochondrial energy production in the failing heart.* Biochim Biophys Acta, 2013. **1833**(4): p. 840-7.

66. Finck, B.N., *The PPAR regulatory system in cardiac physiology and disease.* Cardiovasc Res, 2007. **73**(2): p. 269-77.

67. Finck, B.N., et al., *The cardiac phenotype induced by PPARalpha overexpression mimics that caused by diabetes mellitus.* J Clin Invest, 2002. **109**(1): p. 121-30.

68. Park, S.Y., et al., *Cardiac-specific overexpression of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha causes insulin resistance in heart and liver.* Diabetes, 2005. **54**(9): p. 2514-24.

69. Yang, J., et al., *CD36 deficiency rescues lipotoxic cardiomyopathy.* Circ Res, 2007. **100**(8): p. 1208-17.

70. Panagia, M., et al., *PPAR-alpha activation required for decreased glucose uptake and increased susceptibility to injury during ischemia.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. **288**(6): p. H2677-83.

71. Karbowska, J., Z. Kochan, and R.T. Smolenski, *Peroxisome proliferator-activated receptor alpha is downregulated in the failing human heart.* Cell Mol Biol Lett, 2003. **8**(1): p. 49-53.

72. Wang, P., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor {delta} is an essential transcriptional regulator for mitochondrial protection and biogenesis in adult heart.* Circ Res, 2010. **106**(5): p. 911-9.

73. Son, N.H., et al., *Cardiomyocyte expression of PPARgamma leads to cardiac dysfunction in mice.* J Clin Invest, 2007. **117**(10): p. 2791-801.

74. Barbieri, M., et al., *Effects of PPARs agonists on cardiac metabolism in littermate and cardiomyocyte-specific PPAR-gamma-knockout (CM-PGKO) mice.* PLoS One, 2012. **7**(4): p. e35999.

75. Sihag, S., et al., *PGC-1alpha and ERRalpha target gene downregulation is a signature of the failing human heart.* J Mol Cell Cardiol, 2009. **46**(2): p. 201-12.

76. Garnier, A., et al., *Control by circulating factors of mitochondrial function and transcription cascade in heart failure: a role for endothelin-1 and angiotensin II.* Circ Heart Fail, 2009. **2**(4): p. 342-50.

77. Arany, Z., et al., *Transverse aortic constriction leads to accelerated heart failure in mice lacking PPAR-gamma coactivator 1alpha.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(26): p. 10086-91.

78. Riehle, C., et al., *PGC-1beta deficiency accelerates the transition to heart failure in pressure overload hypertrophy.* Circ Res, 2011. **109**(7): p. 783-93.

79. Konstam, M.A., et al., *Left ventricular remodeling in heart failure: current concepts in clinical significance and assessment.* JACC Cardiovasc Imaging, 2011. **4**(1): p. 98-108.

80. Gjesdal, O., D.A. Bluemke, and J.A. Lima, *Cardiac remodeling at the population level--risk factors, screening, and outcomes.* Nat Rev Cardiol, 2011. **8**(12): p. 673-85.

81. Berridge, M.J., M.D. Bootman, and H.L. Roderick, *Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(7): p. 517-29.

82. Muller, A.L. and N.S. Dhalla, *Role of various proteases in cardiac remodeling and progression of heart failure.* Heart Fail Rev, 2012. **17**(3): p. 395-409.

83. Hutchinson, K.R., J.A. Stewart, Jr., and P.A. Lucchesi, *Extracellular matrix remodeling during the progression of volume overload-induced heart failure.* J Mol Cell Cardiol, 2010. **48**(3): p. 564-9.

84. Gaggin, H.K. and J.L. Januzzi, Jr., *Biomarkers and diagnostics in heart failure.* Biochim Biophys Acta, 2013. **1832**(12): p. 2442-50.

85. Nagaya, N., et al., *Plasma brain natriuretic peptide is a biochemical marker for the prediction of progressive ventricular remodeling after acute myocardial infarction.* Am Heart J, 1998. **135**(1): p. 21-8.

86. Anwaruddin, S., et al., *Renal function, congestive heart failure, and amino-terminal pro-brain natriuretic peptide measurement: results from the ProBNP Investigation of Dyspnea in the Emergency Department (PRIDE) Study.* J Am Coll Cardiol, 2006. **47**(1): p. 91-7.

87. Madamanchi, C., et al., *Obesity and natriuretic peptides, BNP and NT-proBNP: Mechanisms and diagnostic implications for heart failure.* Int J Cardiol, 2014. **176**(3): p. 611-617.

88. Gregori, M., et al., *Synergic effect of high renin and aldosterone levels on inappropriate left ventricular mass and systolic function: a tissue Doppler study.* Int J Cardiol, 2013. **168**(5): p. 4934-6.

89. Girerd, N., et al., *Serum aldosterone is associated with mortality and re-hospitalization in patients with reduced ejection fraction hospitalized for acute heart failure: analysis from the EVEREST trial.* Eur J Heart Fail, 2013. **15**(11): p. 1228-35.

90. von Haehling, S., et al., *Mid-regional pro-adrenomedullin as a novel predictor of mortality in patients with chronic heart failure.* Eur J Heart Fail, 2010. **12**(5): p. 484-91.

91. Lopez, B., et al., *Association of plasma cardiotrophin-1 with stage C heart failure in hypertensive patients: potential diagnostic implications.* J Hypertens, 2009. **27**(2): p. 418-24.

92. Song, K., et al., *Plasma cardiotrophin-1 levels are associated with hypertensive heart disease: a meta-analysis.* J Clin Hypertens (Greenwich), 2014. **16**(9): p. 686-92.

93. Schillaci, G., G. Pucci, and S. Perlini, *From hypertension to hypertrophy to heart failure: the role of cardiotrophin-1.* J Hypertens, 2013. **31**(3): p. 474-6.

94. Ky, B., et al., *High-sensitivity ST2 for prediction of adverse outcomes in chronic heart failure.* Circ Heart Fail, 2011. **4**(2): p. 180-7.

95. Lainscak, M., et al., *Clinical trials update from the Heart Failure Society of America Meeting 2009: FAST, IMPROVE-HF, COACH galectin-3 substudy, HF-ACTION nuclear substudy, DAD-HF, and MARVEL-1.* Eur J Heart Fail, 2010. **12**(2): p. 193-6.

96. Cohn, J.N., *Is activation of the renin-angiotensin system hazardous to your health?* Eur Heart J, 2011. **32**(17): p. 2096-7.

97. *Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure. Results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS). The CONSENSUS Trial Study Group.* N Engl J Med, 1987. **316**(23): p. 1429-35.

98. S., Y., *Effect of enalapril on survival in patients with reduced left ventricular ejection fractions and congestive heart failure. The SOLVD Investigators.* N Engl J Med, 1991. **325**(5): p. 293-302.

99. Wong, E., *Cours de Pharmacologie Cardiovasculaire.* McMaster Pathophysiology review, 2013.

100. Pitt, B., et al., *Effect of losartan compared with captopril on mortality in patients with symptomatic heart failure: randomised trial--the Losartan Heart Failure Survival Study ELITE II.* Lancet, 2000. **355**(9215): p. 1582-7.

101. 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, 1999. **341**(10): p. 709-17.

102. Pitt, B., et al., *Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction.* N Engl J Med, 2003. **348**(14): p. 1309-21.

103. Ramirez, E., et al., *Eplerenone attenuated cardiac steatosis, apoptosis and diastolic dysfunction in experimental type-II diabetes.* Cardiovasc Diabetol, 2013. **12**: p. 172.

104. Yasuoka, S., et al., *Blood pressure variability activates cardiac mineralocorticoid receptor and induces cardiac remodeling in hypertensive rats.* Circ J, 2013. **77**(6): p. 1474-81.

105. Azibani, F., et al., *Aldosterone inhibits antifibrotic factors in mouse hypertensive heart.* Hypertension, 2012. **59**(6): p. 1179-87.

106. Baldo, M.P., et al., *Long-term use of low-dose spironolactone in spontaneously hypertensive rats: effects on left ventricular hypertrophy and stiffness.* Pharmacol Rep, 2011. **63**(4): p. 975-82.

107. 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, 2009. **119**(18): p. 2471-9.

108. Lavall, D., et al., *The mineralocorticoid receptor promotes fibrotic remodeling in atrial fibrillation.* J Biol Chem, 2014. **289**(10): p. 6656-68.

109. Li, X., et al., *Impact of mineralocorticoid receptor antagonists on changes in cardiac structure and function of left ventricular dysfunction: a meta-analysis of randomized controlled trials.* Circ Heart Fail, 2013. **6**(2): p. 156-65.

110. Ubaid-Girioli, S., et al., *Aldosterone escape with diuretic or angiotensin-converting enzyme inhibitor/angiotensin II receptor blocker combination therapy in patients with mild to moderate hypertension.* J Clin Hypertens (Greenwich), 2007. **9**(10): p. 770-4.

111. Pitt, B., *The role of mineralocorticoid receptor antagonists in patients with American College of Cardiology/American Heart Association stage B heart failure.* Heart Fail Clin, 2012. **8**(2): p. 247-53.

112. Alberti KG, Z.P., *The metabolic syndrome: time to reflect.* Curr Diab Rep. , 2006. **6**(4): p. 259-261.

113. Kaur, J., *A comprehensive review on metabolic syndrome.* Cardiol Res Pract, 2014. **2014**: p. 943162.

114. De Onis M, B.M., Borghi E., *Global prevalence and trends of overweight and obesity among preschool children.* Am J Clin Nutr. , 2010. **92**(5): p. 1257-1264.

115. He J, O.L., Bazzano LA, Vupputuri S, Loria C, Whelton PK., *Risk factors for congestive heart failure in US men and women: NHANES I epidemiologic follow-up study.* Arch Intern Med., 2001 **161**(7): p. 996-1002.

116. Ingelsson E, A.J., Lind L, Sundström J., *Metabolic syndrome and risk for heart failure in middle-aged men.* Heart, 2006. **92**(10): p. 1409-1413.

117. Azevedo A, B.P., Almeida PB, Santos AC, Abreu-Lima C, Hense HW, Barros H., *Increasing number of components of the metabolic syndrome and cardiac structural and functional abnormalities--cross-sectional study of the general population.* BMC Cardiovasc Disord. , 2007: p. 7:17.

118. Tang ZH, W.L., Zeng F, Zhang K., *Association and predictive value analysis for metabolic syndrome on systolic and diastolic heart failure in high-risk patients.* BMC Cardiovasc Disord., 2014. **14**(1).

119. Madonna, R. and R. De Caterina, *Atherogenesis and diabetes: focus on insulin resistance and hyperinsulinemia.* Rev Esp Cardiol (Engl Ed), 2012. **65**(4): p. 309-13.

120. Cusi, K., et al., *Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle.* J Clin Invest, 2000. **105**(3): p. 311-20.

121. Gudbjornsdottir, S., et al., *Insulin increases forearm vascular resistance in obese, insulin-resistant hypertensives.* J Hypertens, 1996. **14**(1): p. 91-7.

122. Sloboda, N., et al., *Fatty acids impair endothelium-dependent vasorelaxation: a link between obesity and arterial stiffness in very old Zucker rats.* J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2012. **67**(9): p. 927-38.

123. Qi, Y., et al., *Myocardial loss of IRS1 and IRS2 causes heart failure and is controlled by p38alpha MAPK during insulin resistance.* Diabetes, 2013. **62**(11): p. 3887-900.

124. Kumar, A., et al., *Fat cell-specific ablation of rictor in mice impairs insulin-regulated fat cell and whole-body glucose and lipid metabolism.* Diabetes, 2010. **59**(6): p. 1397-406.

125. Rask-Madsen, C. and C.R. Kahn, *Tissue-specific insulin signaling, metabolic syndrome, and cardiovascular disease.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012. **32**(9): p. 2052-9.

126. Pradhan, A.D., et al., *C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus.* Jama, 2001. **286**(3): p. 327-34.

127. Khan, M. and F. Joseph, *Adipose tissue and adipokines: the association with and application of adipokines in obesity.* Scientifica (Cairo), 2014. **2014**: p. 328592.

128. Ouchi, N., et al., *Adipokines in inflammation and metabolic disease.* Nat Rev Immunol, 2011. **11**(2): p. 85-97.

129. Weisberg, S.P., et al., *Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue.* J Clin Invest, 2003. **112**(12): p. 1796-808.

130. Xu, H., et al., *Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance.* J Clin Invest, 2003. **112**(12): p. 1821-30.

131. Cancello, R., et al., *Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss.* Diabetes, 2005. **54**(8): p. 2277-86.

132. Khan, T., et al., *Metabolic dysregulation and adipose tissue fibrosis: role of collagen VI.* Mol Cell Biol, 2009. **29**(6): p. 1575-91.

133. Dong, F., X. Zhang, and J. Ren, *Leptin regulates cardiomyocyte contractile function through endothelin-1 receptor-NADPH oxidase pathway.* Hypertension, 2006. **47**(2): p. 222-9.

134. Palanivel, R., et al., *Distinct effects of short- and long-term leptin treatment on glucose and fatty acid uptake and metabolism in HL-1 cardiomyocytes.* Metabolism, 2006. **55**(8): p. 1067-75.

135. Schram, K., et al., *Leptin regulates MMP-2, TIMP-1 and collagen synthesis via p38 MAPK in HL-1 murine cardiomyocytes.* Cell Mol Biol Lett, 2010. **15**(4): p. 551-63.

136. Karmazyn, M., X.T. Gan, and V. Rajapurohitam, *The potential contribution of circulating and locally produced leptin to cardiac hypertrophy and failure.* Can J Physiol Pharmacol, 2013. **91**(11): p. 883-8.

137. Smith, C.C., et al., *Leptin-induced cardioprotection involves JAK/STAT signaling that may be linked to the mitochondrial permeability transition pore.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010. **299**(4): p. H1265-70.

138. Rossi, A., et al., *Obesity paradox in patients with aortic valve stenosis. Protective effect of body mass index independently of age, disease severity, treatment modality and non-cardiac comorbidities.* Int J Cardiol, 2014. **176**(3): p. 1441-3.

139. Lavie, C.J., A. De Schutter, and R.V. Milani, *Healthy obese versus unhealthy lean: the obesity paradox.* Nat Rev Endocrinol, 2014.

140. Ouchi, N., R. Shibata, and K. Walsh, *Cardioprotection by adiponectin.* Trends Cardiovasc Med, 2006. **16**(5): p. 141-6.

141. Ding, W.X., et al., *Adiponectin protects rat heart from left ventricular remodeling induced by chronic intermittent hypoxia via inhibition of TGF-beta/smad2/3 pathway.* J Thorac Dis, 2014. **6**(9): p. 1278-84.

142. Shibata, R., et al., *Adiponectin protects against the development of systolic dysfunction following myocardial infarction.* J Mol Cell Cardiol, 2007. **42**(6): p. 1065-74.

143. Pischon, T., et al., *Plasma adiponectin levels and risk of myocardial infarction in men.* Jama, 2004. **291**(14): p. 1730-7.

144. Briet, M. and E.L. Schiffrin, *The role of aldosterone in the metabolic syndrome.* Curr Hypertens Rep, 2011. **13**(2): p. 163-72.

145. Tigerstedt R, B.P., *Niere und Kreislauf.* Scand Arch Physiol., 1898: p. 223–271.

146. de Kloet, A.D., et al., *Central angiotensin II has catabolic action at white and brown adipose tissue.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2011. **301**(6): p. E1081-91.

147. Garg, M., et al., *Review article: the pathophysiological roles of the renin-angiotensin system in the gastrointestinal tract.* Aliment Pharmacol Ther, 2012. **35**(4): p. 414-28.

148. Hilzendeger, A.M., et al., *A brain leptin-renin angiotensin system interaction in the regulation of sympathetic nerve activity.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2012. **303**(2): p. H197-206.

149. Probstfield, J.L. and K.D. O'Brien, *Progression of cardiovascular damage: the role of renin-angiotensin system blockade.* Am J Cardiol, 2010. **105**(1 Suppl): p. 10a-20a.

150. Ferrao, F.M., L.S. Lara, and J. Lowe, *Renin-angiotensin system in the kidney: What is new?* World J Nephrol, 2014. **3**(3): p. 64-76.

151. Delcayre, C., et al., *Cardiac aldosterone production and ventricular remodeling.* Kidney Int, 2000. **57**(4): p. 1346-51.

152. Zennaro, M.C., M. Caprio, and B. Feve, *Mineralocorticoid receptors in the metabolic syndrome.* Trends Endocrinol Metab, 2009. **20**(9): p. 444-51.

153. Arriza, J.L., et al., *Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor.* Science, 1987. **237**(4812): p. 268-75.

154. Fan, Y.S., et al., *The human mineralocorticoid receptor gene (MLR) is located on chromosome 4 at q31.2.* Cytogenet Cell Genet, 1989. **52**(1-2): p. 83-4.

155. Zennaro, M.C., et al., *Human mineralocorticoid receptor genomic structure and identification of expressed isoforms.* J Biol Chem, 1995. **270**(36): p. 21016-20.

156. Zennaro, M.C., et al., *A new human MR splice variant is a ligand-independent transactivator modulating corticosteroid action.* Mol Endocrinol, 2001. **15**(9): p. 1586-98.

157. Vazquez, D.M., et al., *Alpha, beta, and gamma mineralocorticoid receptor messenger ribonucleic acid splice variants: differential expression and rapid regulation in the developing hippocampus.* Endocrinology, 1998. **139**(7): p. 3165-77.

158. Trevino, L.S. and N.L. Weigel, *Phosphorylation: a fundamental regulator of steroid receptor action.* Trends Endocrinol Metab, 2013. **24**(10): p. 515-24.

159. Nagase, M. and T. Fujita, *Role of Rac1-mineralocorticoid-receptor signalling in renal and cardiac disease.* Nat Rev Nephrol, 2013. **9**(2): p. 86-98.

160. Yang, J., et al., *Identification of ligand-selective peptide antagonists of the mineralocorticoid receptor using phage display.* Mol Endocrinol, 2011. **25**(1): p. 32-43.

161. Chai, W. and A.H. Danser, *Why are mineralocorticoid receptor antagonists cardioprotective?* Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2006. **374**(3): p. 153-62.

162. Yang, J. and P.J. Fuller, *Interactions of the mineralocorticoid receptor--within and without.* Mol Cell Endocrinol, 2012. **350**(2): p. 196-205.

163. Lastra, G., et al., *Salt, aldosterone, and insulin resistance: impact on the cardiovascular system.* Nat Rev Cardiol, 2010. **7**(10): p. 577-84.

164. Grossmann, C., et al., *Human mineralocorticoid receptor expression renders cells responsive for nongenotropic aldosterone actions.* Mol Endocrinol, 2005. **19**(7): p. 1697-710.

165. Brilla, C.G., et al., *Collagen metabolism in cultured adult rat cardiac fibroblasts: response to angiotensin II and aldosterone.* J Mol Cell Cardiol, 1994. **26**(7): p. 809-20.

166. Robert, V., et al., *Increased cardiac types I and III collagen mRNAs in aldosterone-salt hypertension.* Hypertension, 1994. **24**(1): p. 30-6.

167. Lacolley, P., et al., *Increased carotid wall elastic modulus and fibronectin in aldosterone-salt-treated rats: effects of eplerenone.* Circulation, 2002. **106**(22): p. 2848-53.

168. Gilbert, K.C. and N.J. Brown, *Aldosterone and inflammation.* Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes, 2010. **17**(3): p. 199-204.

169. Messaoudi, S., et al., *Aldosterone-specific activation of cardiomyocyte mineralocorticoid receptor in vivo.* Hypertension, 2013. **61**(2): p. 361-7.

170. Ghosh, A.K., et al., *Genetic deficiency of plasminogen activator inhibitor-1 promotes cardiac fibrosis in aged mice: involvement of constitutive transforming growth factor-beta signaling and endothelial-to-mesenchymal transition.* Circulation, 2010. **122**(12): p. 1200-9.

171. Stow, L.R., et al., *Aldosterone modulates steroid receptor binding to the endothelin-1 gene (edn1).* J Biol Chem, 2009. **284**(44): p. 30087-96.

172. Jaffe, I.Z., et al., *Placental growth factor mediates aldosterone-dependent vascular injury in mice.* J Clin Invest, 2010. **120**(11): p. 3891-900.

173. Irita, J., et al., *Osteopontin deficiency protects against aldosterone-induced inflammation, oxidative stress, and interstitial fibrosis in the kidney.* Am J Physiol Renal Physiol, 2011. **301**(4): p. F833-44.

174. Calvier, L., et al., *Galectin-3 mediates aldosterone-induced vascular fibrosis.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2013. **33**(1): p. 67-75.

175. Noda, K., et al., *Additive amelioration of oxidative stress and cardiac function by combined mineralocorticoid and angiotensin receptor blockers in postinfarct failing hearts.* J Cardiovasc Pharmacol, 2012. **60**(2): p. 140-9.

176. Gravez, B., A. Tarjus, and F. Jaisser, *Mineralocorticoid receptor and cardiac arrhythmia.* Clin Exp Pharmacol Physiol, 2013. **40**(12): p. 910-5.

177. Ouvrard-Pascaud, A., et al., *Conditional mineralocorticoid receptor expression in the heart leads to life-threatening arrhythmias.* Circulation, 2005. **111**(23): p. 3025-33.

178. Zannad, F., et al., *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, 2000. **102**(22): p. 2700-6.

179. Kidambi S, K.J., Grim CE, Raff H, Mao J, Singh RJ, Kotchen TA., *Association of adrenal steroids with hypertension and the metabolic syndrome in blacks.* Hypertension, 2007. **49**(3): p. 704-711.

180. Ehrhart-Bornstein M, L.-Z.V., Schraven A, Langenbach J, Willenberg HS, Barthel A, Hauner H, McCann SM, Scherbaum WA, Bornstein SR., *Human adipocytes secrete mineralocorticoid-releasing factors.* Proc Natl Acad Sci U S A. , 2003. **100**(24): p. 14211-14216.

181. Briones, A.M., et al., *Adipocytes produce aldosterone through calcineurin-dependent signaling pathways: implications in diabetes mellitus-associated obesity and vascular dysfunction.* Hypertension, 2012. **59**(5): p. 1069-78.

182. Hirata, A., et al., *Blockade of mineralocorticoid receptor reverses adipocyte dysfunction and insulin resistance in obese mice.* Cardiovasc Res, 2009. **84**(1): p. 164-72.

183. 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, 2014. **28**(8): p. 3745-57.

184. Feraco, A., et al., *Role of mineralocorticoid receptor and renin-angiotensin-aldosterone system in adipocyte dysfunction and obesity.* J Steroid Biochem Mol Biol, 2013. **137**: p. 99-106.

185. Caprio, M., et al., *Antiadipogenic effects of the mineralocorticoid receptor antagonist drospirenone: potential implications for the treatment of metabolic syndrome.* Endocrinology, 2011. **152**(1): p. 113-25.

186. Iaconetti, C., et al., *Non-coding RNAs: the "dark matter" of cardiovascular pathophysiology.* Int J Mol Sci, 2013. **14**(10): p. 19987-20018.

187. Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros, *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14.* Cell, 1993. **75**(5): p. 843-54.

188. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function.* Cell, 2004. **116**(2): p. 281-97.

189. Latronico, M.V. and G. Condorelli, *RNA silencing: small RNA-mediated posttranscriptional regulation of mRNA and the implications for heart electropathophysiology.* J Cardiovasc Electrophysiol, 2009. **20**(2): p. 230-7.

190. Siomi, H. and M.C. Siomi, *Posttranscriptional regulation of microRNA biogenesis in animals.* Mol Cell, 2010. **38**(3): p. 323-32.

191. Kozomara, A. and S. Griffiths-Jones, *miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data.* Nucleic Acids Res, 2014. **42**(Database issue): p. D68-73.

192. Bronze-da-Rocha, E., *MicroRNAs expression profiles in cardiovascular diseases.* Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 985408.

193. Chen, J.J., et al., *Reproducibility of microarray data: a further analysis of microarray quality control (MAQC) data.* BMC Bioinformatics, 2007. **8**: p. 412.

194. Xu, W., et al., *Human transcriptome array for high-throughput clinical studies.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(9): p. 3707-12.

195. Nanni L, R.C., Maseri A, Lanfranchi G., *Differential gene expression profiling in genetic and multifactorial cardiovascular diseases.* J Mol Cell Cardiol. , 2006. **41**(6): p. 934-948.

196. Seo D, G.G., Goldschmidt-Clermont PJ., *Gene expression analysis of cardiovascular diseases: novel insights into biology and clinical applications.* J Am Coll Cardiol., 2006. **48**(2): p. 227-235.

197. Steenman M, L.G., Le Meur N, Léger JJ., *Gene expression profiling in human cardiovascular disease.* Clin Chem Lab Med., 2005. **43**(7): p. 696-701.

198. Asakura, M. and M. Kitakaze, *Global gene expression profiling in the failing myocardium.* Circ J, 2009. **73**(9): p. 1568-76.

199. Razeghi, P., et al., *Transcriptional regulators of ribosomal biogenesis are increased in the unloaded heart.* Faseb j, 2006. **20**(8): p. 1090-6.

200. Huss JM, K.D., *Mitochondrial energy metabolism in heart failure: a question of balance.* J Clin Invest., 2005. **115**(3): p. 547-555.

201. Grzeskowiak R, W.H., Drungowski M, Thermann R, Hennig S, Perrot A, Osterziel KJ, Klingbiel D, Scheid S, Spang R, Lehrach H, Ruiz P., *Expression profiling of human idiopathic dilated cardiomyopathy.* Cardiovasc Res., 2003. **59**(2): p. 400-411.

202. Sárközy M, Z.A., Gyémánt N, Fekete V, Kocsis GF, Pipis J, Szűcs G, Csonka C, Puskás LG, Ferdinandy P, Csont T., *Metabolic syndrome influences cardiac gene expression pattern at the transcript level in male ZDF rats.* Cardiovasc Diabetol. , 2013. **15**: p. 12-16.

203. Philip-Couderc P, S.F., Pelat M, Vidal C, Verwaerde P, Pathak A, Buys S, Galinier M, Senard JM, Rouet P., *Cardiac transcriptome analysis in obesity-related hypertension.* Hypertension. , 2003. **41**(3): p. 414-421.

204. Lopaschuk, G.D., C.D. Folmes, and W.C. Stanley, *Cardiac energy metabolism in obesity.* Circ Res, 2007. **101**(4): p. 335-47.

205. Lopaschuk, G.D., et al., *Myocardial fatty acid metabolism in health and disease.* Physiol Rev, 2010. **90**(1): p. 207-58.

206. van Rooij E, O.E., *microRNAs put their signatures on the heart.* Physiol Genomics. , 2007. **31**(3): p. 365-366.

207. Belevych AE, S.S., Terentyeva R, Ho HT, Nishijima Y, Martin MM, Jindal HK, Rochira JA, Kunitomo Y, Abdellatif M, Carnes CA, Elton TS, Györke S, Terentyev D., *MicroRNA-1 and -133 increase arrhythmogenesis in heart failure by dissociating phosphatase activity from RyR2 complex.* PLoS One. , 2011. **6**(12).

208. Carè A, C.D., Felicetti F, Bonci D, Addario A, Gallo P, Bang ML, Segnalini P, Gu Y, Dalton ND, Elia L, Latronico MV, Høydal M, Autore C, Russo MA, Dorn GW 2nd, Ellingsen O, Ruiz-Lozano P, Peterson KL, Croce CM, Peschle C, Condorelli G., *MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy.* Nat Med., 2007. **13**(5): p. 613-618.

209. van Rooij, E. and E.N. Olson, *microRNAs put their signatures on the heart.* Physiol Genomics, 2007. **31**(3): p. 365-6.

210. da Costa Martins PA, L.S., Salic K, De Windt LJ., *MicroRNA regulation in cardiovascular disease.* Curr Drug Targets. , 2010. **11**(8): p. 900-906.

211. Carrer M, L.N., Grueter CE, Williams AH, Frisard MI, Hulver MW, Bassel-Duby R, Olson EN., *Control of mitochondrial metabolism and systemic energy homeostasis by microRNAs 378 and 378*.* Proc Natl Acad Sci U S A., 2012. **109**(38): p. 15330-15335.

212. Toubal, A., et al., *Genomic and epigenomic regulation of adipose tissue inflammation in obesity.* Trends Endocrinol Metab, 2013. **24**(12): p. 625-34.

213. Sun, K., et al., *Fibrosis and adipose tissue dysfunction.* Cell Metab, 2013. **18**(4): p. 470-7.

214. O'Hara, A., et al., *Microarray analysis identifies matrix metalloproteinases (MMPs) as key genes whose expression is up-regulated in human adipocytes by macrophage-conditioned medium.* Pflugers Arch, 2009. **458**(6): p. 1103-14.

215. Chao, L.C., et al., *Inhibition of adipocyte differentiation by Nur77, Nurr1, and Nor1.* Mol Endocrinol, 2008. **22**(12): p. 2596-608.

216. Rottiers V, N.A., *MicroRNAs in metabolism and metabolic disorders.* Nat Rev Mol Cell Biol. , 2012. **13**(4): p. 239-250.

217. Mitchell, P.S., et al., *Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(30): p. 10513-8.

218. Hunter, M.P., et al., *Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles.* PLoS One, 2008. **3**(11): p. e3694.

219. Montecalvo, A., et al., *Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes.* Blood, 2012. **119**(3): p. 756-66.

220. Vickers, K.C., et al., *MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins.* Nat Cell Biol, 2011. **13**(4): p. 423-33.

221. Gupta, S.K., C. Bang, and T. Thum, *Circulating microRNAs as biomarkers and potential paracrine mediators of cardiovascular disease.* Circ Cardiovasc Genet, 2010. **3**(5): p. 484-8.

222. Kumarswamy R, T.T., *Non-coding RNAs in cardiac remodeling and heart failure.* Circ Res., 2013. **113**(6): p. 676-689.

223. Endo, K., et al., *MicroRNA 210 as a biomarker for congestive heart failure.* Biol Pharm Bull, 2013. **36**(1): p. 48-54.

224. Thum, T., et al., *MicroRNAs in the human heart: a clue to fetal gene reprogramming in heart failure.* Circulation, 2007. **116**(3): p. 258-67.

225. van Rooij, E., et al., *A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(48): p. 18255-60.

226. Goren, Y., et al., *Serum levels of microRNAs in patients with heart failure.* Eur J Heart Fail, 2012. **14**(2): p. 147-54.

227. Fukushima, Y., et al., *Assessment of plasma miRNAs in congestive heart failure.* Circ J, 2011. **75**(2): p. 336-40.

228. Karolina, D.S., et al., *Circulating miRNA profiles in patients with metabolic syndrome.* J Clin Endocrinol Metab, 2012. **97**(12): p. E2271-6.

229. Trajkovski, M., et al., *MicroRNAs 103 and 107 regulate insulin sensitivity.* Nature, 2011. **474**(7353): p. 649-53.

230. Williams, M.D. and G.M. Mitchell, *MicroRNAs in insulin resistance and obesity.* Exp Diabetes Res, 2012. **2012**: p. 484696.

231. Wang, Y.C., et al., *Circulating miR-130b mediates metabolic crosstalk between fat and muscle in overweight/obesity.* Diabetologia, 2013. **56**(10): p. 2275-85.

232. Oliveira-Carvalho, V., et al., *MicroRNAs: new players in heart failure.* Mol Biol Rep, 2013. **40**(3): p. 2663-70.

233. Mao, X., et al., *Hypertension, hypercoagulability and the metabolic syndrome: a cluster of risk factors for cardiovascular disease.* Biomed Mater Eng, 2012. **22**(1-3): p. 35-48.

234. Panchal, S.K. and L. Brown, *Rodent models for metabolic syndrome research.* J Biomed Biotechnol, 2011. **2011**: p. 351982.

235. Fellmann, L., et al., *Murine models for pharmacological studies of the metabolic syndrome.* Pharmacol Ther, 2013. **137**(3): p. 331-40.

236. Rafikova, O., E.M. Salah, and S.P. Tofovic, *Renal and metabolic effects of tempol in obese ZSF1 rats--distinct role for superoxide and hydrogen peroxide in diabetic renal injury.* Metabolism, 2008. **57**(10): p. 1434-44.

237. Tofovic, S.P., et al., *Early renal injury induced by caffeine consumption in obese, diabetic ZSF1 rats.* Ren Fail, 2007. **29**(7): p. 891-902.

238. Tofovic, S.P., et al., *Long-term caffeine consumption exacerbates renal failure in obese, diabetic, ZSF1 (fa-fa(cp)) rats.* Kidney Int, 2002. **61**(4): p. 1433-44.

239. Kelley, R., et al., *A population of selected renal cells augments renal function and extends survival in the ZSF1 model of progressive diabetic nephropathy.* Cell Transplant, 2013. **22**(6): p. 1023-39.

240. Bilan, V.P., et al., *Diabetic nephropathy and long-term treatment effects of rosiglitazone and enalapril in obese ZSF1 rats.* J Endocrinol, 2011. **210**(3): p. 293-308.

241. Altschuld RA, H.B., Radin MJ, McCune SA, *The failing SHHF rat heart.* Cardiac remodeling and failure, 2003: p. 67–75.

242. Sylvia A. McCune, P.B.B.a.H.F.S.J., *SHHF/Mcc-cp Rat: Model of Obesity, Non-insulin-dependent Diabetes, and Congestive Heart Failure.* ILAR J 1990. **32**(3): p. 23-27.

243. Farooqi, I.S., et al., *Clinical and molecular genetic spectrum of congenital deficiency of the leptin receptor.* N Engl J Med, 2007. **356**(3): p. 237-47.

244. Dorothy D. Greenhouse, C.T.H.a.O.E.M., *Development of Fatty and Corpulent Rat Strains.* ILAR J 1990. **32**(3).

245. Dunn, R., S. McCune, and B. Summers. *SUPPRESSIVE EFFECTS OF ANF INFUSION ON RENIN AND ALDOSTERONE IN CONGESTIVE HEART-FAILURE PRONE RATS (MCC-SHR-CP OBESE HYPERTENSIVE SUBSTRAIN)*. in *FASEB JOURNAL*. 1988. FEDERATION AMER SOC EXP BIOL 9650 ROCKVILLE PIKE, BETHESDA, MD 20814-3998.

246. Holycross, B.J., et al., *Plasma renin activity in heart failure-prone SHHF/Mcc-facp rats.* Am J Physiol, 1997. **273**(1 Pt 2): p. H228-33.

247. Sharkey, L.C., et al., *Obese female SHHF/Mcc-fa(cp) rats resist antihypertensive effects of renin-angiotensin system inhibition.* Clin Exp Hypertens, 2001. **23**(3): p. 227-39.

248. Radin, M.J., et al., *Gender modulates activation of renin-angiotensin and endothelin systems in hypertension and heart failure.* J Appl Physiol (1985), 2002. **92**(3): p. 935-40.

249. Wright, M.A. and G.M. Church, *An open-source oligomicroarray standard for human and mouse.* Nat Biotechnol, 2002. **20**(11): p. 1082-3.

250. Watson, L.E., et al., *Echocardiographic effects of eplerenone and aldosterone in hypertensive rats.* Front Biosci (Elite Ed), 2013. **5**: p. 922-7.

251. Fraccarollo, D., et al., *Additive improvement of left ventricular remodeling and neurohormonal activation by aldosterone receptor blockade with eplerenone and ACE inhibition in rats with myocardial infarction.* J Am Coll Cardiol, 2003. **42**(9): p. 1666-73.

252. Eudy, R.J., et al., *The use of plasma aldosterone and urinary sodium to potassium ratio as translatable quantitative biomarkers of mineralocorticoid receptor antagonism.* J Transl Med, 2011. **9**: p. 180.

253. Radin, M.J., et al., *Increased salt sensitivity secondary to leptin resistance in SHHF rats is mediated by endothelin.* Mol Cell Biochem, 2003. **242**(1-2): p. 57-63.

254. Cittadini, A., et al., *Metformin prevents the development of chronic heart failure in the SHHF rat model.* Diabetes, 2012. **61**(4): p. 944-53.

255. Caprio, M., et al., *Pivotal role of the mineralocorticoid receptor in corticosteroid-induced adipogenesis.* Faseb j, 2007. **21**(9): p. 2185-94.

256. Marzolla, V., et al., *The role of the mineralocorticoid receptor in adipocyte biology and fat metabolism.* Mol Cell Endocrinol, 2012. **350**(2): p. 281-8.

257. Marzolla, V., et al., *Mineralocorticoid receptor in adipocytes and macrophages: A promising target to fight metabolic syndrome.* Steroids, 2014.

258. Pitt, B. and F. Zannad, *Eplerenone: is it time to add this drug to current heart failure therapy?* Ther Adv Chronic Dis, 2012. **3**(1): p. 5-9.

259. Barnes, B.J. and P.A. Howard, *Eplerenone: a selective aldosterone receptor antagonist for patients with heart failure.* Ann Pharmacother, 2005. **39**(1): p. 68-76.

260. Karagiannis, A., et al., *Eplerenone relieves spironolactone-induced painful gynaecomastia in a patient with primary aldosteronism.* Nephrol Dial Transplant, 2007. **22**(1): p. 293.

261. Resch, M., et al., *Eplerenone prevents salt-induced vascular stiffness in Zucker diabetic fatty rats: a preliminary report.* Cardiovasc Diabetol, 2011. **10**: p. 94.

262. Nagase, M., et al., *Podocyte injury underlies the glomerulopathy of Dahl salt-hypertensive rats and is reversed by aldosterone blocker.* Hypertension, 2006. **47**(6): p. 1084-93.

263. Kang, Y.S., et al., *Effect of eplerenone, enalapril and their combination treatment on diabetic nephropathy in type II diabetic rats.* Nephrol Dial Transplant, 2009. **24**(1): p. 73-84.

264. Kosmala, W., et al., *A randomized study of the beneficial effects of aldosterone antagonism on LV function, structure, and fibrosis markers in metabolic syndrome.* JACC Cardiovasc Imaging, 2011. **4**(12): p. 1239-49.

265. Derosa, G., et al., *Effects of canrenone in patients with metabolic syndrome.* Expert Opin Pharmacother, 2013. **14**(16): p. 2161-9.

266. Lee, M.J. and S.K. Fried, *The glucocorticoid receptor, not the mineralocorticoid receptor, plays the dominant role in adipogenesis and adipokine production in human adipocytes.* Int J Obes (Lond), 2014. **38**(9): p. 1228-33.

267. Costa, M.B., et al., *Aldosterone antagonist decreases blood pressure and improves metabolic parameters in obese patients with the metabolic syndrome.* J Clin Hypertens (Greenwich), 2010. **12**(9): p. 753-5.

268. Ezequiel, D.G., et al., *[Spironolactone reduces blood pressure and albuminuria of obese hypertensive patients with metabolic syndrome].* J Bras Nefrol, 2013. **35**(1): p. 69-72.

269. Wei, Y., et al., *Skeletal muscle insulin resistance: role of inflammatory cytokines and reactive oxygen species.* Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2008. **294**(3): p. R673-80.

270. Shulman, G.I., *Cellular mechanisms of insulin resistance.* J Clin Invest, 2000. **106**(2): p. 171-6.

271. Wada, T., et al., *Spironolactone improves glucose and lipid metabolism by ameliorating hepatic steatosis and inflammation and suppressing enhanced gluconeogenesis induced by high-fat and high-fructose diet.* Endocrinology, 2010. **151**(5): p. 2040-9.

272. Wada, T., et al., *Eplerenone ameliorates the phenotypes of metabolic syndrome with NASH in liver-specific SREBP-1c Tg mice fed high-fat and high-fructose diet.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2013. **305**(11): p. E1415-25.

273. Long, H.D., et al., *Spironolactone prevents dietary-induced metabolic syndrome by inhibiting PI3-K/Akt and p38MAPK signaling pathways.* J Endocrinol Invest, 2013. **36**(11): p. 923-30.

274. Kobayashi, N., et al., *Cardioprotective mechanisms of eplerenone on cardiac performance and remodeling in failing rat hearts.* Hypertension, 2006. **47**(4): p. 671-9.

275. Bayorh, M.A., et al., *Effects of enalapril, tempol, and eplerenone on salt-induced hypertension in dahl salt-sensitive rats.* Clin Exp Hypertens, 2006. **28**(2): p. 121-32.

276. Miana, M., et al., *Effect of eplerenone on hypertension-associated renal damage in rats: potential role of peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPAR-gamma).* J Physiol Pharmacol, 2011. **62**(1): p. 87-94.

277. Susic, D., et al., *Long-term mineralocorticoid receptor blockade reduces fibrosis and improves cardiac performance and coronary hemodynamics in elderly SHR.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **292**(1): p. H175-9.

278. Cezar, M.D., et al., *Aldosterone blockade reduces mortality without changing cardiac remodeling in spontaneously hypertensive rats.* Cell Physiol Biochem, 2013. **32**(5): p. 1275-87.

279. Wang C, L.F., Yuan Y, Wu J, Wang H, Zhang L, Hu P, Li Z, Li Q, Ye J., *Metformin suppresses lipid accumulation in skeletal muscle by promoting fatty acid oxidation.* Clin Lab., 2014. **60**(6): p. 887-896.

280. Wing, R.R., et al., *Benefits of modest weight loss in improving cardiovascular risk factors in overweight and obese individuals with type 2 diabetes.* Diabetes Care, 2011. **34**(7): p. 1481-6.

281. Kolkhof, P., et al., *Finerenone, a novel selective nonsteroidal mineralocorticoid receptor antagonist protects from rat cardiorenal injury.* J Cardiovasc Pharmacol, 2014. **64**(1): p. 69-78.

RESUME

L'utilisation d'antagonistes du récepteur aux minéralocorticoïdes (ARM) a prouvé son efficacité dans le traitement de l'insuffisance cardiaque (IC). Un des facteurs de risque majeur de l'IC, le syndrome métabolique (SMet), est également associé à une production augmentée d'aldostérone et une activation excessive de son récepteur. Dans ce contexte, nous avons émis l'hypothèse que l'utilisation des ARM pouvait être appliquée pour cibler les facteurs de risques du SMet et prévenir la progression subséquente vers l'IC.
Dans ce projet, des rats Spontanément Hypertendus et développant une IC (rats SHHF) portant ou non une mutation du récepteur de la leptine (« cp ») conduisant à un SMet (respectivement $SHHF^{cp/cp}$ et $SHHF^{+/+}$) ont été utilisés comme modèle expérimental. Les animaux ont reçu soit un placebo soit le traitement ARM (Eplérénone, Eplé) dès l'âge de 1.5 à 12.5 mois et leurs paramètres métaboliques et cardiovasculaires ont été régulièrement évalués. Les fonctions moléculaires altérées dans le cœur et le tissu adipeux lors du développement du SMet et la progression de l'IC, ainsi que celles modulées par l'action de l'Eplé ont été caractérisées par l'analyse du transcriptome et miRNome des animaux.
Nos résultats montrent que les rats $SHHF^{cp/cp}$ développent à 12.5 mois une hypertrophie cardiaque excentrique associée à une dilatation du ventricule gauche (VG) et une fraction d'éjection diminuée comparés aux $SHHF^{+/+}$. Alors que l'Eplé ne modifie pas les paramètres métaboliques et cardiovasculaires des $SHHF^{+/+}$, Les rats Eple-$SHHF^{cp/cp}$ présentent une moindre prise de masse corporelle ainsi qu'une moindre dyslipidémie. Sans effet sur la pression artérielle (PA), ni le transcriptome et miRNome adipeux, les animaux $SHHF^{cp/cp}$ traités présentent en outre une moindre dilatation et hypertrophie de leur VG, une fraction d'éjection, un temps de relaxation isovolumique et un ratio E/A plus élevés. Les analyses du transcriptome et miRNome cardiaques révèlent que l'Eplé induit une diminution significative de l'expression de gènes impliqués dans le remodelage et l'inflammation myocardiques ainsi qu'une augmentation de l'expression de gènes relatifs à l'oxydation des acides gras dans le cœur. L'intégration et l'exploration bioinformatique des profils d'expression du transcriptome et du miRNome ont permis d'établir des réseaux de régulation de l'expression génique potentiellement impliqués dans les mécanismes physiopathologiques à l'œuvre chez les rats SHHF obèses et dans ceux impactés par le traitement.
Dans leur ensemble, nos données montrent que l'initiation d'un traitement ARM lors du développement du SMet permet d'atténuer l'obésité et la dyslipidémie et d'améliorer les paramètres de structure et fonction cardiaque. De façon intéressante, ces effets cardioprotecteurs sont obtenus via des mécanismes indépendants de la diminution de la PA, les analyses du transcriptome/miRNome cardiaque indiquent un mécanisme basé sur une diminution des processus de remodelage et d'inflammation ainsi qu' une restauration de la fonction de métabolisme énergétique des acides gras au niveau myocardique.

Mots clés: Insuffisance Cardiaque, Syndrome Métabolique, Aldostérone, Récepteur aux minéralocorticoïdes

ABSTRACT

Mineralocorticoid Receptor Antagonists (MRA) are clinically beneficial in individuals with chronic heart failure (HF). One of the major risk factors for HF, the metabolic syndrome (MetS), has been also reported to be associated with increased aldosterone production and excessive MR activation. In this context, we hypothesized that the use of MRA could be applied to target the MetS features and prevent the subsequent progression towards HF.
In this project, Spontaneously Hypertensive Heart failure rats (SHHF) carrying or not a mutation in the leptin receptor (« cp ») leading to MetS development ($SHHF^{cp/cp}$ and $SHHF^{+/+}$respectively) were used as experimental model. Animals from both genotypes were given either the selective MRA (Eplerenone, Eple) or placebo from 1.5 to 12.5 months of age and their metabolic and cardiovascular parameters were regularly monitored. The molecular functions altered in the heart and visceral adipose tissues as MetS develops and progresses towards HF as well as those modulated by Eple action were characterized by the analysis of animal's transcriptome and miRNome.
Our data showed that $SHHF^{cp/cp}$ exbiting MetS developed at 12.5 months of age eccentric cardiac hypertrophy associated with left ventricular (LV) dilatation and reduced ejection fraction (EF) as compared to $SHHF^{+/+}$. While Eple did not induced differences in metabolic and cardiovascular phenotypes in $SHHF^{+/+}$ rats, Eple-$SHHF^{cp/cp}$ had lower body weight gain and less dyslipidemia. Without effects on blood pressure (BP) and adipose transcriptome and miRNome, Eple-$SHHF^{cp/cp}$ rats had lower LV dilatation and hypertrophy, higher ejection fraction, isovolumic relaxation time and E/A ratio. Transcriptome and miRNome analysis of cardiac tissues revealed that Eple markedly reduced the expression of several genes involved in cardiac remodeling and inflammatory processes and increased the expression of genes related to cardiac fatty acid oxidation and metabolism. The integration and the bioinformatic exploration of transcriptome and miRNome expression profiles allowed the construction of gene regulatory networks potentially involved in the physiopathological mechanisms occuring in the $SHHF^{cp/cp}$ rats and those impacted by the treatment.
Altogether, our data demonstrated that treatment with Eple during MetS development attenuated $SHHF^{cp/cp}$ weight gain and dyslipidemia contributing to the amelioration of their cardiac structural and functional parameters. Interestingly, those beneficial cardioprotective effects were obtained via mechanisms independent of BP lowering, the analysis of cardiac transcriptome/miRnome revealed that Eple may have acted by depressing cardiac remodeling and inflammatory processes and restoring the function of fatty acid metabolism in the myocardium.

Key words: Heart Failure, metabolic syndrome, aldosterone, mineralocorticoid receptor